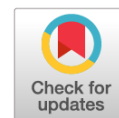


DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen53771>

# Анализ экспрессии генов синтеза полиаминов в клубеньках гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и влияние экзогенной обработки полиаминами на их развитие



© К.А. Иванова, В.Е. Цыганов

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт Петербург, г. Пушкин, Россия

**Введение.** Концентрация полиаминов в симбиотических клубеньках некоторых бобовых в 5–10 раз превышает их концентрацию в других органах, что указывает на их важную роль в формировании и функционировании симбиотических клубеньков.

**Материалы и методы.** В рамках данной работы был проведен анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза полиаминов, в симбиотических клубеньках, а также изучено влияние экзогенных полиаминов на клубенькообразование у растений линии дикого типа SGE и симбиотических мутантов гороха SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*) и SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*).

**Результаты.** Было показано, что основной путь синтеза путресцина в симбиотических клубеньках растений дикого типа — аргининовый, тогда как у мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*) активируется также орнитиновый путь. Обработка корневой системы 0,1 мМ раствором смеси полиаминов приводила к увеличению среднего веса клубенька у растений дикого типа и мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*).

**Заключение.** Таким образом, полиамины, действуя, по-видимому, через этилен, влияют на функционирование меристемы клубеньков.

**Ключевые слова:** растительно-микробные взаимодействия; развитие симбиотического клубенька; полиамины; путресцин; спермидин; спермин.

## Как цитировать:

Иванова К.А., Цыганов В.Е. Анализ экспрессии генов синтеза полиаминов в клубеньках гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и влияние экзогенной обработки полиаминами на их развитие // Экологическая генетика. 2021. Т. 19. № 3. С. 197–208. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen53771>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen53771>

# Analysis of the expression of polyamine biosynthesis genes in nodules of the garden pea (*Pisum sativum* L.) and the effect of exogenous treatment with polyamines on their development

© Kira A. Ivanova, Viktor E. Tsyganov

All Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Pushkin, Russia

**BACKGROUND:** Polyamines are acting as signaling molecules during adaptation to stressful environment and as regulators of plant development. In plants, polyamines are represented mainly by putrescine, spermidine and spermine. The concentration of polyamines in symbiotic nodules of some legumes is 5–10 times higher than in the other organs, which indicates their important role in the formation and functioning of symbiotic nodules.

**MATERIALS AND METHODS:** We analyzed the expression of genes encoding polyamine biosynthesis enzymes in symbiotic nodules, as well as the effect of exogenous polyamines on the nodule number and the average nodule weight in wild-type SGE plants and symbiotic pea mutants SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*) and SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*).

**RESULTS:** The comparable expression level of arginine decarboxylase gene (*PsADC*) was observed in all analyzed nodules, whereas the expression level of ornithine decarboxylase gene (*PsODC*), was highly increased in nodules of SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*) mutant. Treatment of the root system with a 0.1 mM solution of polyamines mixture led to an increase in the average weight of the nodule in wild-type plants and in the SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*) mutant plants.

**CONCLUSIONS:** It was shown that the main pathway of putrescine synthesis in wild-type pea symbiotic nodules is the arginine pathway, while the ornithine pathway is probably associated with activation of plant defense reactions. Polyamines acting, apparently, through ethylene, affect the functioning of the nodule meristem.

**Keywords:** plant-microbial interactions; symbiotic nodule development; polyamines; putrescine; spermidine; spermine.

## To cite this article:

Ivanova KA, Tsyganov VE. Analysis of the expression of polyamine biosynthesis genes in nodules of the garden pea (*Pisum sativum* L.) and the effect of exogenous treatment with polyamines on their development. *Ecological genetics*. 2021;19(2):197–208. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen53771>

Received: 07.12.2020

Accepted: 10.08.2021

Published: 24.09.2021

## ВВЕДЕНИЕ

Полиамины — низкомолекулярные органические катионы, найденные во всех живых организмах [1]. В растениях полиамины изучаются как сигнальные соединения при адаптации к негативному воздействию окружающей среды, и как регуляторы роста и развития. В растениях полиамины представлены, в основном, диамином путресцином, триамином спермидином и тетраамином спермином. Они встречаются в клетке в свободной форме или в виде конъюгатов, связанные с фенольными кислотами и другими низкомолекулярными соединениями, или с макромолекулами, такими как белки и нуклеиновые кислоты [2].

Биосинтез полиаминов инициируется с образования диамина путресцина. У млекопитающих и грибов путресцин формируется из орнитина в реакции, катализируемой орнитиндекарбоксилазой. Однако в растениях и бактериях существует альтернативный путь образования путресцина, который синтезируется из аргинина в реакции, катализируемой аргининдекарбоксилазой.

Аргининовый путь биосинтеза является основным для большинства растений. Полиамины, образующиеся из аргинина, в основном, участвуют в процессах растяжения клеток и адаптации растений к абиотическим стрессам [3, 4]. Полиамины, образующиеся из орнитина, играют роль в пролиферации клеток в активно растущих растительных тканях. Предполагается, что орнитиндекарбоксилаза локализована в основном в цитоплазме, тогда как аргининдекарбоксилаза — в тилакоидных мембранах хлоропластов [5–8].

Путресцин образуется через промежуточное вещество агматин, которое синтезируется из аргинина (рис. 1). Затем путресцин трансформируется в спермидин и спермин путем последовательного переноса аминокпропильных групп от декарбоксилированного S-аденозилметионина, катализируемого спермидин- и сперминсинтазами (рис. 1). Аминокпропильные группы образуются из метионина, который сначала превращается в S-аденозилметионин, а затем декарбоксилируется в реакции, катализируемой S-аденозилметионин декарбоксилазой (рис. 1). S-аденозилметионин — предшественник как полиаминов, так и этилена [9].

В растениях полиамины вовлечены в деление и растяжение клеток, ризогенез, морфогенез, цветение, созревание плодов [10] и старение растений [11]. Полиамины могут стабилизировать ДНК, РНК, хроматин и клеточные мембраны, благодаря своей способности связываться с отрицательно заряженными молекулами и ингибировать перекисное окисление липидов [12, 13]. Было показано, что обработка растений спермидином или спермином предотвращает потерю хлорофилла, стабилизирует молекулярный состав тилакоидных мембран и задерживает старение [14].

Клеточный гомеостаз полиаминов поддерживается взаимными переходами одной формы полиаминов в другую, которые катализируются ферментами полиаминоксидазой и диаминоксидазой. Такие ферментативные реакции приводят к катаболизму полиаминов, а также к образованию пероксида водорода в качестве одного из продуктов [15, 16]. Диаминоксидаза, использующая  $\text{Cu}^{2+}$  и пиридоксальфосфат в качестве

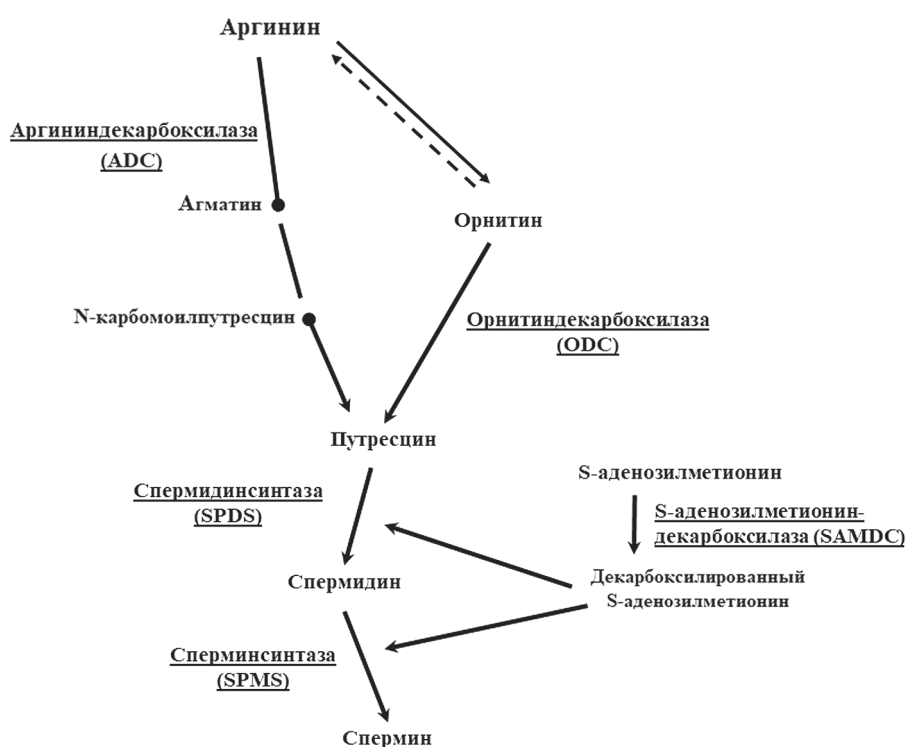


Рис. 1. Путь биосинтеза полиаминов в растениях. Описание стадий и ферментов дано в основном тексте

кофакторов, катализирует образование пероксида водорода, аммиака и 4-аминобутанала из путресцина. Полиаминоксидаза, связанная нековалентными связями с флавинадениндинуклеотидом, может окислять спермидин и спермин с образованием 4-аминобутанала, 3-аминопропил-4-аминобутанала, 1,3-диаминопропана и пероксида водорода [15, 16]. Полиамины также индуцируют синтез NO [17]. Это свидетельствует о важной роли этих соединений в метаболизме активных форм кислорода и азота. Кроме того, было показано, что путресцин может усиливать иммунные ответы, запускаемые патоген-ассоциированными молекулярными паттернами, приводя к повышению устойчивости растений к болезням, вызываемым бактериальными патогенами [18].

С использованием генетического подхода, транскриптомики и метаболомики были выявлены ключевые функции различных полиаминов в процессах развития, от цветения до старения, а также в регуляции устойчивости растений к стрессам. В последние годы многие исследования были сосредоточены на влиянии экзогенных полиаминов на рост и развитие плодовых и овощных культур или модельных растений [19–24]. Сейчас все более популярными становятся попытки увеличения выработки эндогенных полиаминов посредством генетических манипуляций. Однако до сих пор в значительной степени неизвестно, как биосинтетические и катаболические пути полиаминов регулируются на транскрипционном, трансляционном и посттранскрипционном уровнях. Метаболический путь полиаминов связан с путем промежуточного метаболизма азота и другими соединениями, защищающими от стресса, гормонами и сигнальными молекулами. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы раскрыть точный механизм накопления полиаминов для повышения устойчивости растений к стрессу и регуляции их роста. Многого предстоит узнать о метаболических отношениях между полиаминами и фитогормонами во время роста и развития растений, особенно о взаимосвязи между полиаминами и этиленом. Получение трансгенных растений с измененным метаболизмом

полиаминов представляется эффективным инструментом для изучения физиологических функций полиаминов у высших растений [25–27].

Для симбиотической системы *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti* было показано, что пероксид водорода, продуцируемый в процессе катаболизма полиаминов, участвует в ингибировании данного симбиоза [28]. В то же время клубеньки бобовых накапливают полиамины в концентрациях, которые в 5–10 раз превышают таковые в корнях или листьях [29]. В клубеньках *Lotus japonicus* экспрессия генов, участвующих в синтезе спермидина, спермина и путресцина, индуцируется на ранних стадиях развития клубеньков и снижается с возрастом, в то время как полиамины накапливаются постепенно при созревании клубеньков, что, вероятно, свидетельствует об их роли в делении и дифференцировке клеток клубенька, а также о других функциях, связанных с фиксацией азота [30, 31]. Роль полиаминов на ранних стадиях инфекции, их влияние на регуляцию развития клубенька и эффективность азотфиксации, а также влияние полиаминов на бактериального партнера для различных бобовых (*L. japonicus*, *Galega orientalis*, *M. sativa* и *M. truncatula*) освещены детально в обзорах [32, 33].

*Цель данной работы* — выявление роли полиаминов на поздних стадиях формирования и в функционировании симбиотических клубеньков гороха посевного. Для этой цели удобными моделями являются симбиотические мутанты гороха, позволяющие изучать как участие полиаминов в процессах формирования клубенька, так и в защитных ответах растения при формировании неэффективного симбиоза.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Растительный материал и штамм бактерий

В исследовании были использованы мутанты SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*) и SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*), формирующие белые неэффективные клубеньки [34], и исходная линия SGE [35] из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ (табл. 1).

**Таблица 1.** Растительный материал, используемый в работе

Линии	Мутантная аллель	Фенотип	Ссылки
SGE		Дикий тип	[35]
SGEFix <sup>-1</sup>	<i>sym40-1</i>	Гипертрофированные инфекционные капли, аномальные бактериоиды; накопление пероксида водорода, окислительный стресс, ранняя деградация симбиотических структур	[34, 39]
SGEFix <sup>-2</sup>	<i>sym33-3</i>	«Запертые» инфекционные нити, отсутствие инфекционных капель и выхода бактерий; в редких случаях наблюдается формирование инфекционных капель и выход бактерий; нечетко выраженный (leaky) фенотип	[34, 36, 37]

Блок развития клубеньков у мутанта *SGEFix<sup>-1</sup>* (*sym40-1*) происходит после выхода бактерий в растительную клетку [34]. В клубеньках мутанта *SGEFix<sup>-2</sup>* (*sym33-3*) формируются разветвленные инфекционные нити, из которых не происходит выход бактерий в цитоплазму растительных клеток, но в отдельных клетках формируются инфекционные капли [36] и выход бактерий может происходить [34, 37]. Растения были инокулированы штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 [38]

### Условия выращивания и сбор материала для анализа

Семена стерилизовались концентрированной серной кислотой в течение 15 мин и промывались стерильной водой 10 раз. Растения были выращены в пластиковых сосудах, содержащих 100 г стерильного вермикулита, в климатической камере MLR-352H (Sanyo Electric Co., Ltd., Моригучи, Япония) в режиме день/ночь 16/8 ч, 21 °С, относительной влажности 75 %, освещенности 280 мкМ фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>. Для полива растений использовали безазотный питательный раствор [40]. Для анализа экспрессии генов клубеньки (с 10 растений) были собраны через 2 и 3 нед. после инокуляции (НПИ).

Обработку корневых систем проростков гороха смесью полиаминов (0,1 мМ путресцином, спермидином и спермином) проводили через 40 ч после инокуляции. В дальнейшем обработка повторялась через день. Сбор материала для анализа влияния полиаминов на клубенькообразование производили через 2 НПИ.

### ПЦР-анализ в режиме реального времени

Собранные клубеньки гомогенизировались в жидком азоте, выделение РНК проводили согласно протоколу PureZol Isolation Reagent (Bio-Rad, США). Концентрацию и качество тотальной РНК определяли с помощью системы электрофореза на микрочипах для исследования нуклеиновых кислот MultiNA (Shimadzu Corporation, Япония). Синтез кДНК из 1,5 мкг тотальной РНК, обработанной ДНКазой I, осуществляли с помощью RevertAid Reverse Transcriptase (MBI Fermentas, Литва) в автоматическом амплификаторе C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Относительный ПЦР-анализ в режиме реального времени проводили с использованием iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США) по протоколу в автоматическом амплификаторе C1000™ Thermal Cycler, совмещенном с оптическим модулем CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии рассчитывали методом 2<sup>-ΔΔCT</sup> с использованием референсного гена *PsGapC1* (L07500.1) [41]. Дизайн праймеров проводили с помощью программного обеспечения VectorNTI Advanced 10 (Invitrogen, США). Результаты экспериментов были обработаны с помощью статистических методов с использованием среды программирования R и программы GraphPad Prism. Статистически достоверные различия определяли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ( $p \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе полиаминов, в клубеньках линии дикого типа *SGE* и мутантов *SGEFix<sup>-1</sup>* (*sym40-1*) и *SGEFix<sup>-2</sup>* (*sym33-3*)

У растений дикого типа в трехнедельных клубеньках уровень транскриптов гена *PsADC*, кодирующего аргининдекарбоксилазу, снижался по сравнению с таковым в двухнедельных клубеньках (рис. 2, а). У мутантов *SGEFix<sup>-1</sup>* (*sym40-1*) и *SGEFix<sup>-2</sup>* (*sym33-3*) так же наблюдалось снижение уровня транскриптов с возрастом, как и у дикого типа. Тем не менее уровень транскриптов *PsADC* у мутанта *SGEFix<sup>-1</sup>* (*sym40-1*) значительно превышал таковой у дикого типа на всех сроках анализа, в то время как у мутанта *SGEFix<sup>-2</sup>* (*sym33-3*) уровень транскриптов *PsADC* не отличался от дикого типа (рис. 2, а).

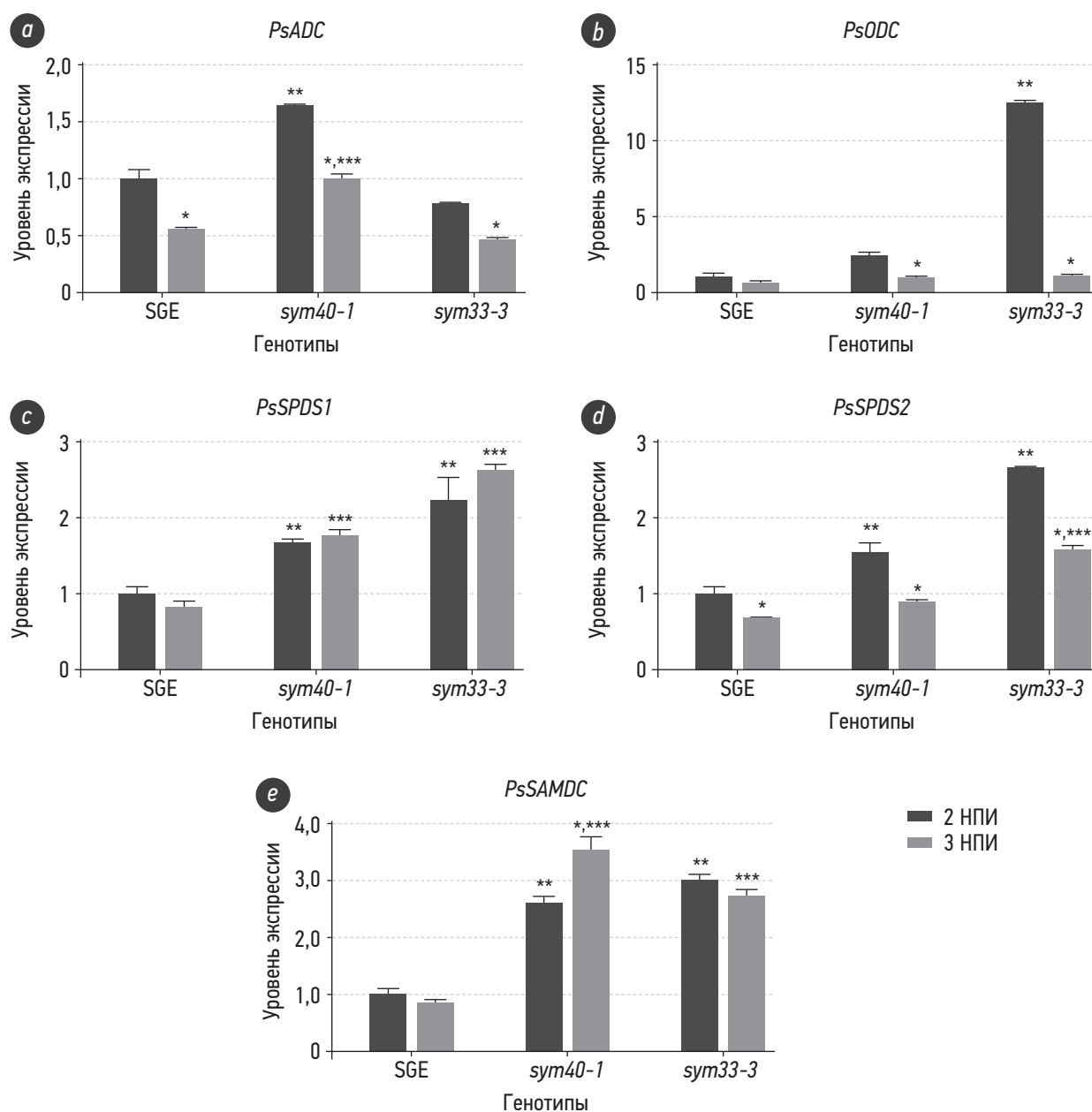
У растений дикого типа уровень транскриптов гена *PsODC* (рис. 2, б), кодирующего орнитиндекарбоксилазу, не изменялся с возрастом, в отличие от мутантных клубеньков, где уровень экспрессии в трехнедельных клубеньках был ниже, чем в двухнедельных. При этом в двухнедельных клубеньках мутанта *SGEFix<sup>-2</sup>* (*sym33-3*) наблюдалось активное накопление транскриптов гена *PsODC* (рис. 2, б).

Уровень транскриптов гена *PsSPDS1*, кодирующего спермидинсинтазу-1, не изменялся в трехнедельных клубеньках по сравнению с двухнедельными у всех проанализированных генотипов (рис. 2, в), однако уровень экспрессии данного гена у мутантов *SGEFix<sup>-1</sup>* (*sym40-1*) и *SGEFix<sup>-2</sup>* (*sym33-3*) был выше, чем у дикого типа на всех сроках анализа.

Уровень транскриптов гена *PsSPDS2* (спермидинсинтаза-2) снижался по сравнению с таковым в двухнедельных клубеньках (рис. 2, д) всех генотипов. Как и в случае *PsSPDS1*, уровень экспрессии данного гена в двухнедельных клубеньках мутантов *SGEFix<sup>-1</sup>* (*sym40-1*) и *SGEFix<sup>-2</sup>* (*sym33-3*) был выше, чем у дикого типа.

Уровень транскриптов гена *PsSAMDC*, кодирующего S-аденозилметионин декарбоксилазу, вовлеченную в промежуточный этап синтеза спермидина, у мутантов был повышен по сравнению с диким типом (рис. 2, е). У мутанта *SGEFix<sup>-1</sup>* (*sym40-1*) уровень транскриптов гена *PsSAMDC* увеличивался с возрастом клубеньков в отличие от дикого типа и у мутанта *SGEFix<sup>-2</sup>* (*sym33-3*) (рис. 2, е).

Транскрипты гена *PsSPMS*, кодирующего спермидинсинтазу, не детектировались на всех сроках у всех анализируемых генотипов.



**Рис. 2.** Уровень относительной экспрессии генов биосинтеза полиаминов: *a* — гена *PsADC*, кодирующего аргининдекарбоксилазу; *b* — гена *PsODC*, кодирующего орнитиндекарбоксилазу; *c* — гена *PsSPDS1*, кодирующего спермидинсинтазу-1; *d* — гена *PsSPDS2*, кодирующего спермидинсинтазу-2; *e* — гена *PsSAMDC*, кодирующего S-аденозилметионин декарбоксилазу в двух- и трехнедельных клубеньках гороха посевного дикого типа SGE и мутантов SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*) и SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*). \* — внутри генотипа при сравнении с двухнедельными клубеньками; \*\* — от линии дикого типа SGE на сроке 2 нед. после инокуляции (2 НПИ); \*\*\* — от линии дикого типа SGE на сроке 3 нед. после инокуляции (3 НПИ);  $p \leq 0,05$

### Анализ клубенькообразования у линии дикого типа SGE и мутантов SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*) и SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*) после обработки полиаминами

У растений дикого типа и у мутанта по гену SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*), в отличие от мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*), наблюдалось увеличение среднего веса клубенька при обработке смесью 0,1 мМ полиаминов. При этом обработка не влияла на число образованных клубеньков ни у одного из исследуемых генотипов (табл. 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее для гороха посевного было показано, что аргининдекарбоксилаза ответственна за биосинтез путресцина в завязях, плодах и листьях. Активность аргининдекарбоксилазы на ранних стадиях развития плодов коррелирует с высокими уровнями экспрессии гена *PsADC* в быстрорастущих тканях [42]. Повышенный уровень транскриптов гена *PsADC* (рис. 2, *a*), выявленный в данном исследовании в двухнедельных клубеньках гороха дикого типа, может быть связан с активными процессами

**Таблица 2.** Анализ влияния экзогенной обработки смесью 0,1 мМ полиаминов на клубенькообразование у разных генотипов гороха

Генотип	Средний сухой вес клубенька, мг		Число клубеньков, шт.	
	контроль	обработка 0,1 мМ раствором полиаминов	контроль	обработка 0,1 мМ раствором полиаминов
SGE	0,143 ± 0,025	0,192 ± 0,010 *	81,5 ± 10,7	76 ± 10,5
SGEFix <sup>-1</sup> ( <i>sym40-1</i> )	0,037 ± 0,003	0,034 ± 0,001	94 ± 12	100,8 ± 13,5
SGEFix <sup>-2</sup> ( <i>sym33-3</i> )	0,088 ± 0,007	0,172 ± 0,008 **	14,2 ± 1,3	15,1 ± 1,0

\*, \*\* — статистически достоверные отличия в среднем весе сухого клубенька у контрольных растений и растений, обработанных смесью полиаминов (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,0001$ ; тест Сидака).

дифференцировки инфицированных клеток, сопровождаемой увеличением размеров клетки [43]. У *L. japonicus* максимальный уровень транскриптов *LjADC* и *LjODC* наблюдался в молодых 10-дневных клубеньках, в дальнейшем наблюдалось снижение уровней транскриптов этих генов с увеличением возраста клубеньков [30]. При этом наблюдалась корреляция экспрессии генов *LjODC* и *LjADC* с экспрессией *LjCysD3*, кодирующего циклин D-типа. В растениях циклины D-типа участвуют в контроле клеточного цикла, а также в других программах развития растения [44]. Очевидно, что полиамины скорее участвуют в развитии клубеньков *L. japonicus*, чем в процессе фиксации азота, поскольку транскрипты гена, кодирующего нитрогеназу, обнаруживаются на высоких уровнях только через 2 НПИ [30].

Увеличение экспрессии гена *PsADC* у мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*) (рис. 2, а) может быть связано с накоплением пероксида водорода и окислительным стрессом, протекающим в этих клубеньках [39]. Катаболизм полиаминов приводит к образованию пероксида водорода и акролеина, таким образом, полиамины потенциально могут быть причиной повреждения клеток в стрессовых условиях [15, 16, 45]. Однако пероксид водорода также является сигнальной молекулой, которая может активировать систему антиоксидантной защиты растений [46]. Действительно, листья *Zea mays*, предварительно обработанные спермином и путресцином, показывали повышенную устойчивость к окислительному стрессу, вызванному паракватом [47]. Обработка экзогенным спермидином значительно увеличивала содержание спермидина и спермина и снижала содержание путресцина в корнях проростков *Cucumis sativus* в условиях гипоксического стресса. Эти изменения были связаны с повышенной активностью антиоксидантных ферментов и меньшим перекисным окислением мембранных липидов, что в итоге приводило к повышению устойчивости растений к гипоксии [48, 49]. Таким образом, вероятно, полиамины служат регуляторами окислительно-восстановительного гомеостаза и играют двойную роль в окислительном стрессе растений [50, 51].

Следует также отметить, что полиамины участвуют в защите растений от патогенных микроорганизмов. Было показано, что обработка экзогенным путресцином проростков *Arabidopsis thaliana* вызывает такие защитные

реакции как отложение каллозы и повышение экспрессии нескольких маркерных генов паттерн-активированного иммунитета. Эти ответы зависят от пероксида водорода и НАДФН-оксидаз, таким образом подтверждая, что активные формы кислорода опосредуют передачу сигналов, запускаемую путресцином. Путресцин усиливает ответы паттерн-активированного иммунитета за счет продукции активных форм кислорода, что приводит к повышению устойчивости растений к бактериальным патогенам [18].

Повышенный уровень экспрессии генов *PsSPDS1* и *PsSPDS2* (рис. 2, с, d) в клубеньках мутантных линий SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*) и SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*) может быть связан с участием полиаминов (а именно спермидина) в модуляции защитных реакций, активированных в этих клубеньках [41].

Накопление транскриптов гена *PsODC* у мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*) в двухнедельных клубеньках (рис. 2, b) может быть связано с сильной активацией специфических защитных реакций в клубеньках данного мутанта [41, 52], в результате чего наряду с аргининовым путем биосинтеза путресцина, активируется орнитиновый путь.

Обработка экзогенными полиаминами не повлияла на число клубеньков, однако привела к увеличению среднего веса клубенька у линии дикого типа SGE и мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*), но не у мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*) (табл. 2). Ранее было показано, что обработка листовых дисков *Glycine max* 1 мМ раствором спермидина и спермина увеличивала продукцию этилена [53]. Усиление продукции этилена наблюдалось и при обработке полиаминами сегментов *Oryza sativa* [54]. В то же время ранее было продемонстрировано, что экзогенный этилен (добавленный в форме этефона) вызывает увеличение среднего веса клубенька как у линии дикого типа SGE, так и у мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*) [55]. Таким образом, можно предположить, что эффект полиаминов на средний вес клубенька опосредован действием этилена. Отсутствие такого эффекта для клубеньков мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40-1*), вероятно, можно объяснить ранней остановкой функционирования меристемы в таких клубеньках [56], что проявляется в их малых размерах. Высокий уровень сигнала, выявляемый при иммунолокализации 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты в меристематических клетках клубеньков подтверждает важность этилена для функционирования меристемы [57].

Таким образом, показано, что у гороха основным путем синтеза путресцина в эффективных симбиотических клубеньках является аргининовый путь. В то же время, в неэффективных клубеньках мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33-3*) наряду с аргининовым путем активируется орнитининовый, что, возможно, связано с активацией сильных защитных реакций в неэффективных клубеньках данного мутанта. Кроме того, полиамины опосредованно через этилен, по всей видимости, влияют на функционирование мезостемы клубеньков.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines // *Ann Rev Biochem.* 1984. Vol. 53. P. 749–790. DOI: 10.1146/annurev.bi.53.070184.003533
2. Tiburcio A.F., Altabella T., Bitrián M., et al. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress // *Planta.* 2014. Vol. 240. No. 1. P. 1–18. DOI: 10.1007/s00425-014-2055-9
3. Galston A.W., Kaur-Sawhney R., Altabella T., et al. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress // *Bot Acta.* 1997. Vol. 110. No. 3. P. 197–207. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1997.tb00629.x
4. Bouchereau A., Aziz A., Larher F., et al. Polyamines and environmental challenges: recent development // *Plant Sci.* 1999. Vol. 140. No. 2. P. 103–125. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00218-0
5. Borrell A., Culianez-Macia F.A., Altabella T., et al. Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 109. No. 3. P. 771–776. DOI: 10.1104/pp.109.3.771
6. Walden R., Cordeiro A., Tiburcio A.F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development // *Plant Physiol.* 1997. Vol. 113. No. 4. P. 1009–1013. DOI: 10.1104/pp.113.4.1009
7. Kakkar R.K., Sawhney V.K. Polyamine research in plants – a changing perspective // *Physiol Plant.* 2002. Vol. 116. No. 3. P. 281–292. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1160302.x
8. Fuell C., Elliott K.A., Hanfrey C.C., et al. Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae // *Plant Physiol Biochem.* 2010. Vol. 48. No. 7. P. 513–520. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.02.008
9. Bitrián M., Zarza X., Altabella T., et al. Polyamines under abiotic stress: metabolic crossroads and hormonal cross-talks in plants // *Metabolites.* 2012. Vol. 2. No. 3. P. 516–528. DOI: 10.3390/metabo2030516
10. Kakkar R.K., Nagar P.K., Ahuja P.S., et al. Polyamines and plant morphogenesis // *Biol Plant.* 2000. Vol. 43. No. 1. P. 1–11. DOI: 10.1023/A:1026582308902
11. Pandey S., Ranade S.A., Nagar P.K., et al. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence // *J Biosci.* 2000. Vol. 25. No. 3. P. 291–299. DOI: 10.1007/BF02703938
12. Alcázar R., Altabella T., Marco F., et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance // *Planta.* 2010. Vol. 231. No. 6. P. 1237–1249. DOI: 10.1007/s00425-010-1130-0
13. Wimalasekera R., Tebartz F., Scherer G.F.E. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses // *Plant Sci.* 2011. Vol. 181. No. 5. P. 593–603. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002
14. Tadolini B. Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads // *Biochem J.* 1988. Vol. 249. No. 1. P. 33–36. DOI: 10.1042/bj2490033
15. Cona A., Rea G., Angelini R., et al. Functions of amine oxidases in plant development and defence // *Trends Plant Sci.* 2006. Vol. 11. No. 2. P. 80–88. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.12.009
16. Tavladoraki P., Cona A., Federico R., et al. Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants // *Amino Acids.* 2012. Vol. 42. No. 2. P. 411–426. DOI: 10.1007/s00726-011-1012-1
17. Yamasaki H., Cohen M.F. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? // *Trends Plant Sci.* 2006. Vol. 11. No. 11. P. 522–524. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.09.009
18. Liu C., Atanasov K.E., Tiburcio A.F., et al. The polyamine putrescine contributes to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *RbohD/F*-dependent positive feedback loop in *Arabidopsis* PAMP-triggered immunity // *Front Plant Sci.* 2019. Vol. 10. ID894. DOI: 10.3389/fpls.2019.00894
19. De Oliveira L.F., Elbl P., Navarro B.V., Al E. Elucidation of the polyamine biosynthesis pathway during Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seed development // *Tree Physiol.* 2016. Vol. 37. P. 116–130. DOI: 10.1093/treephys/tpw107
20. De Oliveira L.F., Navarro B.V., Cerruti G., Al E. Polyamines and amino acid related metabolism: the roles of arginine and ornithine are associated with the embryogenic potential // *Plant Cell Physiol.* 2018. Vol. 59. P. 1084–1098. DOI: 10.1093/pcp/pcy049
21. Mustafavi S.H., Badi H.N., Sekara A., Al E. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites // *Acta Physiol Plant.* 2018. Vol. 40. No. 6. P. 1–9. DOI: 10.1007/s11738-018-2671-2
22. Agudelo-Romero P., Bortolotti C., Pais M.S., Al E. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism // *Plant Physiol Biochem.* 2013. Vol. 67. P. 105–119. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.02.024
23. Pál M., Szalai G., Janda T. Speculation: polyamines are important in abiotic stress signaling // *Plant Sci.* 2015. Vol. 237. P. 16–23. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.05.003
24. Sequeramutiozabal M.I., Erban A., Kopka J., Al E. Global metabolic profiling of *Arabidopsis* polyamine oxidase 4 (*AtPAO4*) loss-of-function mutants exhibiting delayed dark-induced senescence // *Front Plant Sci.* 2016. Vol. 7. ID173. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.05.003

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность В.С. Грицкевич за помощь в постановке экспериментов.

**Источник финансирования.** Научное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 17-76-30016). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.



25. Kusano T., Berberich T., Tateda C., et al. Polyamines: essential factors for growth and survival // *Planta*. 2008. Vol. 228. No. 3. P. 367–381. DOI: 10.1007/s00425-008-0772-7
26. Handa A.K., Mattoo A.K. Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants // *Plant Physiol Biochem*. 2010. Vol. 48. No. 7. P. 540–546. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.02.009
27. Chen D., Shao Q., Yin L., et al. Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses // *Front Plant Sci*. 2019. Vol. 9. ID1945. DOI: 10.3389/fpls.2018.01945
28. Hidalgo-Castellanos J., Marín-Peña A., Jiménez-Jiménez S., et al. Polyamines oxidation is required in the symbiotic interaction *Medicago truncatula* — *Sinorhizobium meliloti* but does not participate in the regulation of polyamines level under salinity // *Plant Growth Regul*. 2019. Vol. 88. No. 3. P. 297–307. DOI: 10.1007/s10725-019-00508-z
29. Fujihara S., Abe H., Minakawa Y., et al. Polyamines in nodules from various plant-microbe symbiotic associations // *Plant Cell Physiol*. 1994. Vol. 35. No. 8. P. 1127–1134. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078705
30. Flemetakis E., Efrose R.C., Desbrosses G., et al. Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus* // *Mol Plant Microbe Interact*. 2004. Vol. 17. No. 12. P. 1283–1293. DOI: 10.1094/mpmi.2004.17.12.1283
31. Efrose R.C., Flemetakis E., Sfichi L., et al. Characterization of spermidine and spermine synthases in *Lotus japonicus*: induction and spatial organization of polyamine biosynthesis in nitrogen fixing nodules // *Planta*. 2008. Vol. 228. No. 1. P. 37–49. DOI: 10.1007/s00425-008-0717-1
32. Jiménez Bremont J., Marina M., Guerrero-González Md.L., et al. Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions // *Front Plant Sci*. 2014. Vol. 5. ID95. DOI: 10.3389/fpls.2014.00095
33. Becerra-Rivera V.A., Dunn M.F. Polyamine biosynthesis and biological roles in rhizobia // *FEMS Microbiol Lett*. 2019. Vol. 366. No. 7. ID fnz084. DOI: 10.1093/femsle/fnz084
34. Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y., et al. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Mol Gen Genet*. 1998. Vol. 259. No. 5. P. 491–503. DOI: 10.1007/s004380050840
35. Kosterin O.E., Rozov S.M. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I // *Pisum Genet*. 1993. Vol. 25. P. 27–31.
36. Tsyganov V.E., Seliverstova E., Voroshilova V., et al. Double mutant analysis of sequential functioning of pea (*Pisum sativum* L.) genes *Sym13*, *Sym33*, and *Sym40* during symbiotic nodule development // *Russ J Genet Appl Res*. 2011. Vol. 1. No. 5. P. 343. DOI: 10.1134/S2079059711050145
37. Voroshilova V.A., Boesten B., Tsyganov V.E., et al. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* // *Mol Plant Microbe Interact*. 2001. Vol. 14. No. 4. P. 471–476. DOI: 10.1094/mpmi.2001.14.4.471
38. Glenn A.R., Poole P.S., Hudman J.F. Succinate uptake by free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* // *Microbiology*. 1980. Vol. 119. No. 1. P. 267–271. DOI: 10.1099/00221287-119-1-267
39. Цыганова А.В., Цыганов В.Е., Борисов А.Ю., и др. Сравнительный цитохимический анализ распределения перекиси водорода у неэффективного мутанта гороха SGEFix-1 (*sym40*) и исходной линии SGE // *Экологическая генетика*. 2009. Т. 7, № 3. С. 3–9. DOI: 10.17816/ecogen733-9
40. Fähræus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique // *J Gen Microb*. 1957. Vol. 16. No. 2. P. 374–381. DOI: 10.1099/00221287-16-2-374
41. Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., et al. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations *sym40* (*PsEFD*), *sym33* (*PsIPD3/PsCYCLOPS*) and *sym42* // *Protoplasma*. 2015. Vol. 252. No. 6. P. 1505–1517. DOI: 10.1007/s00709-015-0780-y
42. Pérez-Amador M.A., Carbonell J., Granell A. Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.) // *Plant Mol Biol*. 1995. Vol. 28. No. 6. P. 997–1009. DOI: 10.1007/BF00032662
43. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Tsyganov V.E. Cell differentiation in nitrogen-fixing nodules hosting symbiosomes // *Funct Plant Biol*. 2018. Vol. 45. No. 2. P. 47–57. DOI: 10.1071/Fp16377
44. Meijer M., Murray J.A.H. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle // *Plant Mol Biol*. 2000. Vol. 43. No. 5. P. 621–633. DOI: 10.1023/A:1006482115915
45. Minocha R., Majumdar R., Minocha S.C. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship // *Front Plant Sci*. 2014. Vol. 5. ID175. DOI: 10.3389/fpls.2014.00175
46. Groppa M.D., Benavides M.P. Polyamines and abiotic stress: recent advances // *Amino Acids*. 2008. Vol. 34. P. 35–45. DOI: 10.1007/s00726-007-0501-8
47. Durmu N., Kadioglu A. Spermine and putrescine enhance oxidative stress tolerance in maize leaves // *Acta Physiol Plant*. 2005. Vol. 27. P. 515–522. DOI: 10.1007/s11738-005-0057-8
48. Jia Y., Guo S., Li J. Effects of exogenous putrescine on polyamines and antioxidant system in cucumber seedlings under root-zone hypoxia stress // *Acta Bot Boreali Occidentalia Sinica*. 2008. Vol. 28. P. 1654–1662.
49. Wu J., Shu S., Li C., et al. Spermidine-mediated hydrogen peroxide signaling enhances the antioxidant capacity of salt-stressed cucumber roots // *Plant Physiol Biochem*. 2018. Vol. 128. P. 152–162. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.05.002
50. Bors W., Langebartels C., Michel C., et al. Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage // *Phytochemistry*. 1989. Vol. 28. No. 6. P. 1589–1595. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)97805-1
51. Saha J., Brauer E.K., Sengupta A., Al E. Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants // *Front Environ Sci*. 2015. Vol. 3. ID21. DOI: 10.3389/fenvs.2015.00021
52. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Brewin N.J., et al. Bacterial release is accompanied by ectopic accumulation of cell wall material around the vacuole in nodules of *Pisum sativum* *sym33-3* allele encoding transcription factor *PsCYCLOPS/PsIPD3* // *Protoplasma*. 2019. Vol. 256. No. 5. P. 1449–1453. DOI: 10.1007/s00709-019-01383-1
53. Pennazio S., Roggero P. Exogenous polyamines stimulate ethylene synthesis by soybean leaf tissues // *Ann Bot*. 1990. Vol. 65. No. 1. P. 45–50. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a087907

54. Chen S.L., Chen C.T., Kao C.H. Polyamines promote the biosynthesis of ethylene in detached rice leaves // *Plant Cell Physiol.* 1991. Vol. 32. No. 6. P. 813–819. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078148

55. Tsyganov V.E., Batagov A.O., Voroshilova V.A., et al. Pea (*Pisum sativum* L.) gene *Sym33* can play a role in ethylene dependent regulation of nodulation. In: Pedrosa F.O., Hungria M., Yates G., Newton W.E., editors. Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. 38. Dordrecht: Springer, 2002. 262 p. DOI: 10.1007/0-306-47615-0\_140

56. Voroshilova V.A., Demchenko K.N., Brewin N.J., et al. Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads // *New Phytol.* 2009. Vol. 181. No. 4. P. 913–923. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02723.x

57. Serova T.A., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization // *J Plant Physiol.* 2017. Vol. 212. P. 29–44. DOI: 10.1016/j.jplph.2017.01.012

## REFERENCES

1. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Ann Rev Biochem.* 1984;53:749–790. DOI: 10.1146/annurev.bi.53.070184.003533
2. Tiburcio AF, Altabella T, Bitrián M, et al. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta.* 2014;240(1):1–18. DOI: 10.1007/s00425-014-2055-9
3. Galston AW, Kaur-Sawhney R, Altabella T, et al. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta.* 1997;110(3):197–207. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1997.tb00629.x
4. Bouchereau A, Aziz A, Larher F, et al. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 1999;140(2):103–125. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00218-0
5. Borrell A, Culianez-Macia FA, Altabella T, et al. Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiol.* 1995;109(3):771–776. DOI: 10.1104/pp.109.3.771
6. Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol.* 1997;113(4):1009–1013. DOI: 10.1104/pp.113.4.1009
7. Kakkar RK, Sawhney VK. Polyamine research in plants – a changing perspective. *Physiol Plant.* 2002;116(3):281–292. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1160302.x
8. Fuell C, Elliott KA, Hanfrey CC, et al. Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiol Biochem.* 2010;48(7):513–520. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.02.008
9. Bitrián M, Zarza X, Altabella T, et al. Polyamines under abiotic stress: metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. *Metabolites.* 2012;2(3):516–528. DOI: 10.3390/metabo2030516
10. Kakkar RK, Nagar PK, Ahuja PS, et al. Polyamines and plant morphogenesis. *Biol Plant.* 2000;43(1):1–11. DOI: 10.1023/A:1026582308902
11. Pandey S, Ranade SA, Nagar PK, et al. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J Biosci.* 2000;25(3):291–299. DOI: 10.1007/BF02703938
12. Alcázar R, Altabella T, Marco F, et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta.* 2010;231(6):1237–1249. DOI: 10.1007/s00425-010-1130-0
13. Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GFE. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.* 2011;181(5):593–603. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002
14. Tadolini B. Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochem J.* 1988;249(1):33–36. DOI: 10.1042/bj2490033
15. Cona A, Rea G, Angelini R, et al. Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci.* 2006;11(2):80–88. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.12.009
16. Tavladoraki P, Cona A, Federico R, et al. Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids.* 2012;42(2):411–426. DOI: 10.1007/s00726-011-1012-1
17. Yamasaki H, Cohen MF. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* 2006;11(11):522–524. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.09.009
18. Liu C, Atanasov KE, Tiburcio AF, et al. The polyamine putrescine contributes to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *RbohD/F*-dependent positive feedback loop in *Arabidopsis* PAMP-triggered immunity. *Front Plant Sci.* 2019;9:94. DOI: 10.3389/fpls.2019.00894
19. De Oliveira LF, Elbl P, Navarro BV, Al E. Elucidation of the polyamine biosynthesis pathway during Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seed development. *Tree Physiol.* 2016;37:116–130. DOI: 10.1093/treephys/tpw107
20. De Oliveira LF, Navarro BV, Cerruti G, Al E. Polyamines and amino acid related metabolism: the roles of arginine and ornithine are associated with the embryogenic potential. *Plant Cell Physiol.* 2018;59:1084–1098. DOI: 10.1093/pcp/pcy049
21. Mustafavi SH, Badi HN, Sekara A, Al E. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. *Acta Physiol Plant.* 2018;40(6):1–9. DOI: 10.1007/s11738-018-2671-2
22. Agudelo-Romero P, Bortolotti C, Pais MS, Al E. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiol Biochem.* 2013;67:105–119. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.02.024
23. Pál M, Szalai G, Janda T. Speculation: polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci.* 2015;237:16–23. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.05.003
24. Sequeramutiozabal MI, Erban A, Kopka J, Al E. Global metabolic profiling of *Arabidopsis* polyamine oxidase 4 (*AtPAO4*) loss-of-function mutants exhibiting delayed dark-induced senescence. *Front Plant Sci.* 2016;7:173. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.05.003
25. Kusano T, Berberich T, Tateda C, et al. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta.* 2008;228(3):367–381. DOI: 10.1007/s00425-008-0772-7.
26. Handa AK, Mattoo AK. Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiol Biochem.* 2010;48(7):540–546. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.02.009
27. Chen D, Shao Q, Yin L, et al. Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Front Plant Sci.* 2019;10(9):1945. DOI: 10.3389/fpls.2018.01945

28. Hidalgo-Castellanos J, Marín-Peña A, Jiménez-Jiménez S, et al. Polyamines oxidation is required in the symbiotic interaction *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti* but does not participate in the regulation of polyamines level under salinity. *Plant Growth Regul.* 2019;88(3):297–307. DOI: 10.1007/s10725-019-00508-z
29. Fujihara S, Abe H, Minakawa Y, et al. Polyamines in nodules from various plant-microbe symbiotic associations. *Plant Cell Physiol.* 1994;35(8):1127–1134. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078705
30. Flemetakis E, Efröse RC, Desbrosses G, et al. Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004;17(12):1283–1293. DOI: 10.1094/mpmi.2004.17.12.1283
31. Efröse RC, Flemetakis E, Sfichi L, et al. Characterization of spermidine and spermine synthases in *Lotus japonicus*: induction and spatial organization of polyamine biosynthesis in nitrogen fixing nodules. *Planta.* 2008;228(1):37–49. DOI: 10.1007/s00425-008-0717-1
32. Jiménez Bremont J, Marina M, Guerrero-González MdL, et al. Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Front Plant Sci.* 2014;5:95. DOI: 10.3389/fpls.2014.00095
33. Becerra-Rivera VA, Dunn MF. Polyamine biosynthesis and biological roles in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366(7): fnz084. DOI: 10.1093/femsle/fnz084
34. Tsyganov VE, Morzhina EV, Stefanov SY, et al. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function. *Mol Gen Genet.* 1998;259(5): 491–503. DOI: 10.1007/s004380050840
35. Kosterin OE, Rozov SM. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I. *Pisum Genet.* 1993;25:27–31.
36. Tsyganov VE, Seliverstova E, Voroshilova V, et al. Double mutant analysis of sequential functioning of pea (*Pisum sativum* L.) genes *Sym13*, *Sym33*, and *Sym40* during symbiotic nodule development. *Russ J Genet Appl Res.* 2011;1(5):343. DOI: 10.1134/S2079059711050145
37. Voroshilova VA, Boesten B, Tsyganov VE, et al. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001;14(4):471–476. DOI: 10.1094/mpmi.2001.14.4.471
38. Glenn AR, Poole PS, Hudman JF. Succinate uptake by free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology.* 1980;119(1):267–271. DOI: 10.1099/00221287-119-1-267
39. Tsyganova AV, Tsyganov VE, Borisov AY, et al. Comparative cytochemical analysis of hydrogen peroxide distribution in pea ineffective mutant SGEFix-1 (*sym40*) and initial line SGE. *Ecological genetics.* 2009;7(3):3–9. (In Russ.) DOI: 10.17816/ecogen733-9
40. Fähræus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microb.* 1957;16(2):374–381. DOI: 10.1099/00221287-16-2-374
41. Ivanova KA, Tsyganova AV, Brewin NJ, et al. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations *sym40* (*PseFD*), *sym33* (*PsIPD3/PsCYCLOPS*) and *sym42*. *Protoplasma.* 2015;252(6):1505–1517. DOI: 10.1007/s00709-015-0780-y
42. Pérez-Amador MA, Carbonell J, Granell A. Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Mol Biol.* 1995;28(6):997–1009. DOI: 10.1007/BF00032662
43. Tsyganova AV, Kitaeva AB, Tsyganov VE. Cell differentiation in nitrogen-fixing nodules hosting symbiosomes. *Funct Plant Biol.* 2018;45(2):47–57. DOI: 10.1071/Fp16377
44. Meijer M, Murray JAH. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Mol Biol.* 2000;43(5):621–633. DOI: 10.1023/A:1006482115915
45. Minocha R, Majumdar R, Minocha SC. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Front Plant Sci.* 2014;5:175. DOI: 10.3389/fpls.2014.00175
46. Groppa MD, Benavides MP. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids.* 2008;34:35–45. DOI: 10.1007/s00726-007-0501-8
47. Durmu N, Kadioglu A. Spermine and putrescine enhance oxidative stress tolerance in maize leaves. *Acta Physiol. Plant.* 2005;27:515–522. DOI: 10.1007/s11738-005-0057-8
48. Jia Y, Guo S, Li J. Effects of exogenous putrescine on polyamines and antioxidant system in cucumber seedlings under root-zone hypoxia stress. *Acta Bot Boreali Occidentalia Sinica.* 2008;28:1654–1662.
49. Wu J, Shu S, Li C, et al. Spermidine-mediated hydrogen peroxide signaling enhances the antioxidant capacity of salt-stressed cucumber roots. *Plant Physiol Biochem.* 2018;128:152–162. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.05.002
50. Bors W, Langebartels C, Michel C, et al. Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry.* 1989;28(6):1589–1595. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)97805-1
51. Saha J, Brauer EK, Sengupta A, Al E. Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Front Environ Sci.* 2015;3:21. DOI: 10.3389/fenvs.2015.00021
52. Tsyganova AV, Seliverstova EV, Brewin NJ, et al. Bacterial release is accompanied by ectopic accumulation of cell wall material around the vacuole in nodules of *Pisum sativum sym33-3* allele encoding transcription factor *PsCYCLOPS/PsIPD3*. *Protoplasma.* 2019;256(5):1449–1453. DOI: 10.1007/s00709-019-01383-1
53. Pennazio S, Roggero P. Exogenous polyamines stimulate ethylene synthesis by soybean leaf tissues. *Ann Bot.* 1990;65(1):45–50. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a087907
54. Chen SL, Chen CT, Kao CH. Polyamines promote the biosynthesis of ethylene in detached rice leaves. *Plant Cell Physiol.* 1991;32(6):813–819. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078148
55. Tsyganov VE, Batagov AO, Voroshilova VA, et al. Pea (*Pisum sativum* L.) gene *Sym33* can play a role in ethylene dependent regulation of nodulation. In: Pedrosa FO, Hungria M, Yates G, Newton WE, editors. *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture.* 38. Dordrecht: Springer, 2002. 262 p. DOI: 10.1007/0-306-47615-0\_140
56. Voroshilova VA, Demchenko KN, Brewin NJ, et al. Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads. *New Phytol.* 2009;181(4):913–923. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02723.x
57. Serova TA, Tikhonovich IA, Tsyganov VE. Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization. *J Plant Physiol.* 2017;212:29–44. DOI: 10.1016/j.jplph.2017.01.012

## ОБ АВТОРАХ

**\*Виктор Евгеньевич Цыганов**, д-р биол. наук;  
адрес: Россия, 196608, Санкт Петербург, г. Пушкин, ш. Под-  
бельского, д. 3; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3105-8689>;  
Scopus: 7006136325; eLibrary SPIN: 6532-1332;  
e-mail: [vetsyganov@arriam.ru](mailto:vetsyganov@arriam.ru)

**Кира Андреевна Иванова**, мл. н. с.;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9119-065X>;  
eLibrary SPIN: 1104-7503; e-mail: [kivanova@arriam.ru](mailto:kivanova@arriam.ru)

## AUTHORS' INFO

**\*Viktor E. Tsyganov**, Dr. Sci. (Biol.); address: 3 Podbels-  
kogo chaussee, 196608, Pushkin, Saint Petersburg, Russia;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3105-8689>;  
Scopus: 7006136325; eLibrary SPIN: 6532-1332;  
e-mail: [vetsyganov@arriam.ru](mailto:vetsyganov@arriam.ru)

**Kira A. Ivanova**, junior researcher;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9119-065X>;  
eLibrary SPIN: 1104-7503; e-mail: [kivanova@arriam.ru](mailto:kivanova@arriam.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author