

© А. В. Цыганова¹,
В. Е. Цыганов¹, А. Ю. Борисов¹,
И. А. Тихонович¹, Н. Дж. Бревин²

¹ Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии

² Центр Джона Иннеса (Великобритания, Норвич, Колни Лейн)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА У НЕЭФФЕКТИВНОГО МУТАНТА ГОРОХА *SGEFIX⁻ 1 (SYM40)* И ИСХОДНОЙ ЛИНИИ *SGE*

✿ Сравнительный цитохимический анализ выявил различия в распределении перекиси водорода в симбиотических клубеньках гороха исходной линии *SGE* и мутанта *SGEFix⁻ 1 (sym40)*. У исходной линии *SGE* преципитаты пергидроксида церия откладывались в стенках и матриксе инфекционных нитей. У мутанта *SGEFix⁻ 1* наблюдалось увеличенное отложение преципитатов пергидроксида церия в матриксе гипертрофированных инфекционных капелек, вокруг содержащихся в них бактерий, а также вокруг ювенильных бактериоидов. Наблюдаемый характер распределения перекиси водорода указывает на то, что бактерии в инфицированных клетках клубеньков мутанта подвергаются более сильному окислительному стрессу по сравнению с исходной линией.

✿ **Ключевые слова:** растительно-микробные взаимодействия; бобово-ризобияльный симбиоз; симбиотические мутанты; симбиотический клубенек; инфекционная нить; инфекционная капля; азотфиксация.

Поступила в редакцию 20.11.2008
Принята к публикации 30.03.2009

ВВЕДЕНИЕ

Ризобии (клубеньковые бактерии) вступают в симбиотические взаимоотношения с растениями из семейства бобовых с формированием азотфиксирующих клубеньков в условиях нехватки азота. В основе формирования эффективного симбиоза лежит обмен молекулярными сигналами между двумя партнерами (Schultze, Kondorosi, 1998; Oldroyd, Downie, 2008). Бактерии отвечают на растительные сигналы — флавоноиды — продукцией Nod факторов, которые запускают скручивание корневых волосков и индукцию делений в коре корня, приводящие к формированию примордия клубенька (Schultze, Kondorosi, 1998). Ризобии проникают внутрь примордия через скрученный корневой волосок посредством специальной трубчатой структуры — инфекционной нити, окруженной клеточной стенкой и заполненной матриксом, состоящим преимущественно из арабиногалактанпротеинов экстензинов (Brewin, 2004). Из инфекционной нити ризобии эндоцитируются через места истончения клеточной стенки, получившие названия инфекционных капелек. Эндоцитированные бактерии дифференцируются в специализированные для азотфиксации формы — бактериоиды. Бактериоид, окруженный мембраной растительного происхождения — симбиосомной мембраной, — называется симбиосомой. Когда азотфиксирующая активность прекращается, симбиосомы и растительные клетки клубенька дегенерируют и подвергаются старению (Brewin, 1991).

Бактериальная нитрогеназа, будучи ключевым ферментом азотфиксации, восстанавливает атмосферный азот до аммония. При этом она необратимо инактивируется кислородом и активными формами кислорода (**АФК**) (Minchin et al., 2008). С другой стороны, для процесса восстановления азота требуется высокая интенсивность дыхания, так как это очень энергоемкий процесс (Robson, Postgate, 1980). Для решения этого «кислородного парадокса» (Minchin et al., 2008) клетками эпидермиса в коре клубенька формируется «кислородный барьер», призванный ограничить диффузию свободного кислорода, в то время как необходимый кислород для дыхания доставляется белком растительного происхождения — леггемоглобином (Appleby, 1984; Kawashima et al., 2001). АФК генерируются во время аэробного дыхания как результат восстановления молекулярного кислорода и последующих реакций этих продуктов с металлами и другими компонентами. АФК разрушают липиды, белки и нуклеиновые кислоты (Imlay, 2002, 2003). Несмотря на стратегию, обеспечивающую низкую концентрацию свободного кислорода внутри клу-

бенька, высокая интенсивность дыхания и автоокисление леггемоглобина неизбежно приводят к увеличению концентрации АФК в клубеньке (Dalton et al., 1993; Vecana et al., 2000; Matamoros et al., 2003).

Продукция АФК, в частности O_2^- -радикалов и H_2O_2 , наблюдалась в инфекционных нитях клубеньков люцерны, гороха и *Sesbania rostrata* (Santos et al., 2001; D'Haese et al., 2003; Rubio et al., 2004). Более того, H_2O_2 является частью сигнального каскада, ведущего к формированию корневых клубеньков у *Sesbania rostrata* (D'Haese et al., 2003). Цитохимическое исследование выявило значительную продукцию АФК (O_2^- -радикалов и H_2O_2) в меристеме и зоне инфекции в клубеньках гороха (Groten et al., 2005). На поздних стадиях симбиоза в результате метаболизма в клубеньке генерируется повышенный уровень АФК (Mathieu et al., 1998; Evans et al., 1999; Alesandrini et al., 2003). Таким образом, АФК играют важную роль во время инфекционного процесса, в развитии клубенька и во время активной азотфиксации, а также при старении клубеньков (Vecana et al., 2000; Hérouart et al., 2002; Puppo et al., 2005).

В настоящем исследовании было показано распределение АФК, в частности H_2O_2 , в клубеньках симбиотически неэффективного мутанта гороха SGEFix⁻¹ (*sym40*), который формирует мелкие белые клубеньки и характеризуется ранним старением. Локализация перекиси водорода у мутанта сильно отличалась от таковой у исходной линии SGE.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал

В исследовании были использованы растения исходной линии гороха посевного (*Pisum sativum* L.) SGE (Kosterin, Rozov, 1993) и неэффективный (неспособный к эффективной азотфиксации) мутант SGEFix⁻¹ (*sym40*), характеризующийся гипертрофированным развитием инфекционных капель и ранним старением (Tsyganov et al., 1998).

Условия выращивания и инокуляции

Растения выращивались в климатических камерах HeraeusVöthch HPS2000 (день/ночь — 16/8 ч, температура — 21/19° С, относительная влажность воздуха 75 %, освещенность 38 тыс. люкс). Семена были стерилизованы серной кислотой в течение 30 мин при комнатной температуре, промыты стерильной дистиллированной водой и в момент посадки проинокулированы штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* CIAM 1026 (Safironova, Novikova, 1996) (1 мл водной суспензии бактерий, содержащей 10^8 – 10^9 клеток на семя). В качестве субстрата был использован стерильный вермикулит, увлажненный питательным раствором без азота (Borisov et al., 1997). Клубеньки (с 10 растений на вариант) собирали на 14-й и 21-й день после инокуляции.

Цитохимическое выявление перекиси водорода

После сбора клубеньки были немедленно погружены в 10 мМ раствор хлорида церия ($CeCl_3$) в 50 мМ растворе MOPS (рН 7,0) на 1 ч в вакууме перед фиксацией в 2,5 % глутаральдегиде в 0,1 М какодилатном буфере. Клубеньки, обработанные и не обработанные (негативный контроль) хлоридом церия, были дополнительно зафиксированы в течение 1 ч в 1 % растворе четырехокси осмия в 0,1 М какодилатном буфере, затем были дегидратированы в серии спиртов возрастающей концентрации (30, 50, 70, 80, 90 % и 100 %) при комнатной температуре. Далее образцы были перенесены в ацетон и смеси ацетона и смолы, затем заключены в эпон при 60°С в течение 48 ч. Ультратонкие срезы (90–100 нм) контрастированы 2 % водным раствором уранилацетата в течение 10 мин и дополнительно контрастированы раствором цитрата свинца в течение 5 мин. Ткани клубенька были сфотографированы на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL JEM-1200 EM при 80 кВ. Перекись водорода была локализована как электронно-плотный преципитат пергидроксида церия (Bestwick et al., 1997).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В симбиотических клубеньках гороха исходной линии SGE наблюдалось разделение на меристему, зоны инфекции, азотфиксации и старения (данные не представлены). Инфицированные клетки имели характерное для клубеньков гороха дикого типа строение: центральная вакуоль, смещенное к периферии ядро и цитоплазма, заполненная симбиотическими органеллами — симбиосомами, содержащими по одному плейоморфному бактериоиду, окруженному симбиосомной мембраной (рис. 1, а). Также в инфицированных клетках встречались инфекционные нити небольшого диаметра и инфекционные капли, из которых наблюдался эндоцитоз бактерий в цитоплазму растительной клетки (данные не представлены).

У мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*) симбиотические клубеньки были лишены выраженной зональности (данные не представлены). Отличительной особенностью данного мутанта являлось формирование гипертрофированных инфекционных нитей и инфекционных капель, занимающих большую часть клетки, с массовым эндоцитозом бактерий в цитоплазму клетки хозяина (рис. 1, б). В инфицированных клетках наблюдались аномальные бактериоиды с матриксом повышенной плотности по периферии и просветленным в центре. Кроме того, клубеньки данного мутанта отличались ранним старением симбиотических структур с характерным образованием «теней» бактериоидов (рис. 1, б).

При изучении симбиотических клубеньков исходной линии SGE отложение преципитатов пергидроксида церия в зонах инфекции и азотфиксации наблюдалось в клеточных стенках инфицированных клеток, стенках инфекционных нитей (рис. 2, а), а также в матриксе зрелых

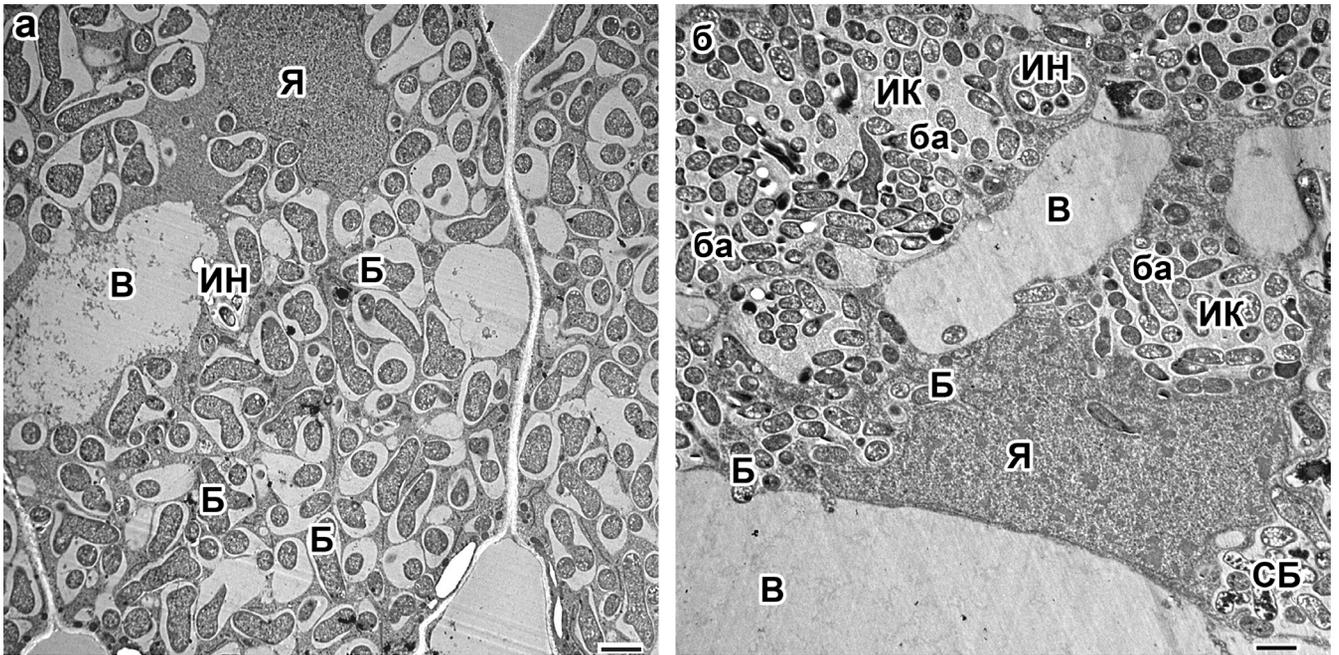


Рис. 1. Ультраструктурная организация инфицированных клеток в клубеньках: а) исходной линии SGE; б) мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*). Обозначения: Я — ядро, В — вакуоль, ИН — инфекционная нить, ИК — инфекционная капля, ба — бактерия, Б — бактериоид, СБ — стареющий бактериоид. Шкала: 2 мкм

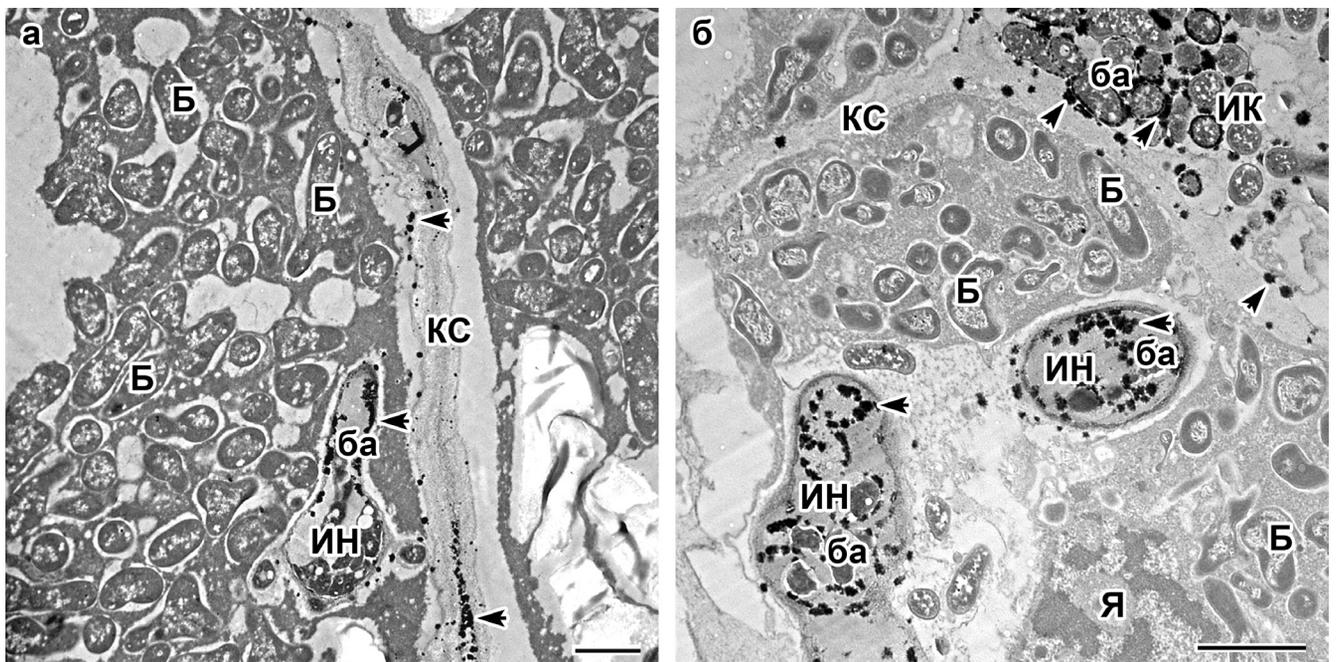


Рис. 2. Распределение электронно-плотных преципитатов пергидроксида церия в инфицированной ткани клубеньков: а) исходной линии SGE; б) мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*). Обозначения: Я — ядро, ИН — инфекционная нить, ИК — инфекционная капля, КС — клеточная стенка, ба — бактерия, Б — бактериоид, головки стрелок указывают на преципитаты пергидроксида церия. Шкала: 2 мкм.

инфекционных нитей и инфекционных каплях. Многочисленные преципитаты можно было наблюдать в межклеточном пространстве, особенно в зоне соединения

нескольких клеток (рис. 2, а). Отложение преципитатов не наблюдалось вокруг бактериоидов, как ювенильных, так и зрелых (рис. 3, а). В зоне старения преципитаты

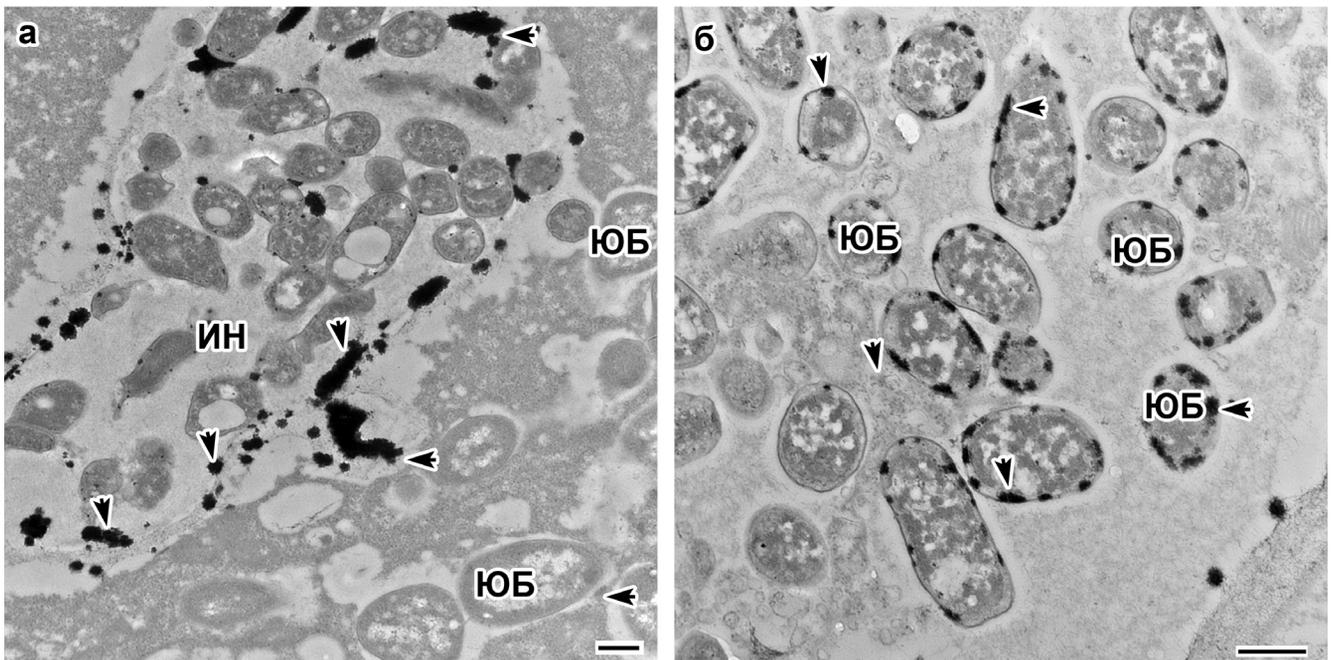


Рис. 3. Локализация преципитатов пергидроксида церия вокруг ювенильных бактериоидов: а) отсутствие преципитатов вокруг ювенильных бактериоидов в инфицированной клетке исходной линии SGE; б) наличие преципитатов вокруг ювенильных бактериоидов в инфицированной клетке клубенька мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*). Обозначения: Б — бактериоид, ЮБ — ювенильный бактериоид, ИН — инфекционная нить, головки стрелок указывают на преципитаты пергидроксида церия. Шкала: 500 нм

пергидроксида церия локализовались в симбиосомных и бактериоидных мембранах деградирующих бактериоидов (данные не представлены).

Анализ симбиотических клубеньков мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*) выявил отличный характер распределения перекиси водорода. Крупные отложения преципитатов пергидроксида церия наблюдались в матриксе инфекционных нитей, инфекционных каплях, а также вокруг бактерий, располагающихся в просветах инфекционных структур (рис. 2, б). Отличительной чертой мутанта в распределении перекиси водорода является отложение преципитатов вокруг ювенильных бактериоидов (рис. 3, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании как у исходной линии SGE, так и мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*) наблюдалась характерная для этих линий гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков (Tsyganov et al., 1998).

С помощью цитохимического анализа было исследовано распределение H₂O₂ в симбиотических клубеньках у исходной линии SGE и неэффективного мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*). Было обнаружено, что в клубеньках исходной линии H₂O₂ локализуется в стенках и матриксе инфекционных нитей и каплей. Ранее подобный характер отложений H₂O₂ был описан для симбиотических клубеньков дикого типа гороха, люцерны и *Sesbania rostrata* (Santos et al., 2001; D'Haese et al., 2003; Rubio

et al., 2004). H₂O₂ в инфекционных нитях недетерминированных клубеньков участвует в перекрестном связывании гликопротеинов матрикса и в его отвердевании, которое, вероятно, необходимо для дальнейшего роста и развития инфекционных нитей (Wisniewski et al., 2000; Brewin, 2004). Также отложения преципитатов пергидроксида церия наблюдались в симбиосомных и бактериоидных мембранах стареющих бактериоидов, что было описано ранее для клубеньков дикого типа гороха и люцерны (Herouart et al., 2002; Rubio et al., 2004).

В клубеньках мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*) наблюдалось чрезмерное накопление преципитатов пергидроксида церия в инфекционных нитях и инфекционных каплях по сравнению с клубеньками дикого типа. Это может объясняться развитием мощного окислительного стресса, схожего с таковым при развитии несовместимого взаимодействия, например между растениями и патогенами (Lamb, Dixon, 1997; Hancock et al., 2002).

Кроме того, нами наблюдалось отложение преципитатов пергидроксида церия на бактериальных мембранах ювенильных бактериоидов, недавно эндоцитированных в растительные клетки мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*). Однако в случае симбиоза люцерны — *Sinorhizobium meliloti* супероксид-радикалы и перекись водорода определяются в основном в инфекционных нитях (Santos et al., 2001), но никогда внутри бактерий и бактериоидов во время развития корневого клубенька. Это предполагает наличие бактериальной защиты, разрушающей H₂O₂. Следовательно, для

азотфиксации и задержки старения необходима эффективная защита против окислительного стресса.

Известно, что клубеньковые бактерии (свободно живущие формы) обладают более высокой чувствительностью к H_2O_2 , чем другие виды бактерий (Hérouart et al., 1996; Ohwada et al., 1999). Однако они являются симбиотическими микроорганизмами и во время дифференцировки в бактериоиды могут использовать защитные реакции растения-хозяина против токсических форм кислорода, таких как H_2O_2 . Так, например, продукция ферментов окислительной защиты растительными клетками в клубеньках положительно коррелирует с возрастанием нитрогеназной активности и содержанием леггемоглобина (Dalton et al., 1986).

Для того чтобы преодолеть окислительный стресс во время симбиотического взаимодействия, растение и ризобии обладают целым арсеналом антиоксидантов (Becana et al., 2000; Hérouart et al., 2002; Matamoros et al., 2003). Подобно другим бактериям, ризобии располагают определенными АФК-метаболизирующими ферментами, такими как каталазы, супероксиддисмутазы и пероксидазы.

Были проведены многочисленные исследования антиоксидантной защиты ризобий во время инфекционного процесса (Hérouart et al., 1996; Santos et al., 1999, 2000, 2001; Rubio et al., 2002; Jamet et al., 2003; Panek, O'Brian, 2004; Dombrecht et al., 2005; Harrison et al., 2005). Так, было показано, что нарушения в гене *sodA*, кодирующем супероксиддисмутазу, нарушают симбиотические свойства *S. meliloti* при симбиозе с люцерной. Большинство мутантных бактерий иницируют редкие клубеньки, при этом их дифференциация не доходит до стадии азотфиксирующих бактериоидов (Santos et al., 2000). У *S. meliloti* одиночные мутанты по генам *katA*, *katB* и *katC*, кодирующим различные изоформы каталазы, продемонстрировали схожую клубенькообразующую и азотфиксирующую способности в сравнении с линией дикого типа (Sigaud et al., 1999). В противоположность этому, значительное снижение эффективности инфекции и нитрогеназной активности было обнаружено у двойных мутантов *katB*, *katC* и *katA*, *katC* (Sigaud et al., 1999). Клубенькообразующая эффективность у мутантов *S. meliloti*, дефицитных по пути биосинтеза глутатиона, была исследована при инокуляции растений *M. sativa* штаммами *SmgshA* и *SmgshB* (Harrison et al., 2005). При проведении эксперимента было показано, что мутант *SmgshA*, не синтезирующий глутатион, был не способен образовывать клубеньки на *M. sativa*. Однако стадии раннего взаимодействия между мутантным штаммом и люцерной, такие как прикрепление, скручивание корневых волосков и формирование инфекционных нитей, все еще определялись. При инокуляции *M. sativa* мутантным штаммом *SmgshB*, синтезирующим предшественник глутатиона, наблюдалось замедленное клубенькообразование и значительная, до 75 %, редукция нитрогеназной активности.

Данный фенотип сопровождался также ранним старением мутантного штамма *SmgshB*.

Таким образом, можно предположить, что у мутанта *SGEFix⁻¹ (sym40)* происходит усиление окислительного стресса по сравнению с линией дикого типа, что проявляется в чрезмерном накоплении H_2O_2 . В результате усиления окислительных процессов бактериоиды *R. leguminosarum* bv. *viceae* становятся неспособны преодолеть этот стресс, и процесс дифференцировки идет неправильно, на что указывает наличие аномальных бактериоидов в цитоплазме инфицированных клеток клубеньков и их раннее старение.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была финансово поддержана INTAS (YSF 04-83-3196), Федеральным агентством по науке и инновациям (государственный контракт № 02.442.11.7130), Российским фондом фундаментальных исследований (05-04-49105-а), совместными грантами РФФИ — Netherlands' organization for scientific research (06-04-89000-НВОЦ-а) и U. S. Civilian Research & Development Foundation — Министерства образования и науки РФ (RUXO-012-ST-06, DP2M12), грантом Президента России (НШ 5399.2008.4). Н. Дж. Бревин является Emeritus Fellow в Центре Джона Иннеса.

Литература

1. Alesandrini F., Mathis R., Van de Syde G. et al. Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence // *New Phytol.* 2003. Vol. 158. P. 131–138.
2. Appleby C. A. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1984. Vol. 35. P. 443–478.
3. Becana M., Dalton D. A., Moran J. F. et al. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules // *Physiol. Plant.* 2000. Vol. 109. P. 372–381.
4. Bestwick C. S., Brown I. R., Bennett M. R., Mansfield J. W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* // *Plant Cell.* 1997. Vol. 9. P. 209–221.
5. Borisov A. Y., Rozov S. M., Tsyganov V. E. et al. Sequential functioning of *Sym 13* and *Sym 31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // *Mol. Gen. Genet.* 1997. Vol. 254. P. 592–598.
6. Brewin N. J. Development of the legume root nodule // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991. Vol. 7. P. 191–226.
7. Brewin N. J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Critic. Rev. Plant Sci.* 2004. Vol. 23. P. 293–316.
8. D'Haese W., De Rycke R., Mathis R. et al. Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base

- nodulation of a semiaquatic legume // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P.11789–11794.
9. Dalton D. A., Baird L. M., Langeberg L. et al. Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules // Plant Physiol. 1993. Vol. 102. P.481–489.
 10. Dalton D. A., Russel S. A., Hanus F. J. et al. Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 3811–3815.
 11. Dombrecht B., Heusdens C., Beullens S. et al. Defence of *Rhizobium etli* bacteroids against oxidative stress involves a complexly regulated atypical 2-Cys peroxiredoxin // Mol. Microbiol. 2005. Vol. 55. P. 1207–1221.
 12. Evans P. J., Gallesi D., Mathieu C. et al. Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence // Planta. 1999. Vol. 208. P.73–79.
 13. Groten K., Vanacker H., Duttileul C. et al. The roles of redox processes in pea nodule development and senescence // Plant Cell Environ. 2005. Vol.28. P.1293–1304.
 14. Hancock J. T., Desikan R., Clarke A. et al. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species // Plant Physiol. Biochem. 2002. Vol. 40. P.611–617.
 15. Harrison J., Jamet A., Muglia C. I. et al. Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti* // J. Bacteriol. 2005. Vol. 187, N 1. P. 168–174.
 16. Hérouart D., Baudouin E., Frendo P. et al. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume–*Rhizobium symbiosis*? // Plant Physiol. Biochem. 2002. Vol. 40. P.619–624.
 17. Hérouart D., Sigaud S., Moreau S. et al. Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178, N23. P.6802–6809.
 18. Imlay J. A. How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis // Adv. Microb. Physiol. 2002. Vol. 46. P.111–153.
 19. Imlay J. A. Pathways of oxidative damage // Annu. Rev. Microbiol. 2003. Vol. 57. P.395–418.
 20. Jamet A., Sigaud S., Van de Sype G. et al. Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process // Mol. Plant Microbe Interact. 2003. Vol. 16. P.217–225.
 21. Kawashima K., Suganuma N., Tamaoki M., Kouchi H. Two types of pea leghemoglobin genes showing different O₂-binding affinities and distinct patterns of spatial expression in nodules // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P.641–651.
 22. 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.
 23. Lamb C., Dixon R. A. The oxidative burst in plant disease resistance // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 48. P.251–275.
 24. Matamoros M. A., Dalton D. A., Ramos J. et al. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis // Plant Physiol. 2003. Vol. 133. P.499–509.
 25. Mathieu C., Moreau S., Frendo P. et al. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes // Free Rad. Biol. Med. 1998. Vol. 24. P.1242–1249.
 26. Minchin F. R., James E. K., Becana M. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules // Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses / M. J. Dilworth et al. (eds.). Springer Science, Business Media B. V., 2008. P.321–362.
 27. Ohwada T., Shirakawa Y., Kusumoto M. et al. Susceptibility to hydrogen peroxide and catalase activity of root nodule bacteria // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1999. Vol. 63, N3. P.457–462.
 28. Oldroyd G. E. D., Downie J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. Vol. 59. P. 519–546.
 29. Panek H. R., O'Brian M. R. KatG is the primary detoxifier of hydrogen peroxide produced by aerobic metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* // J. Bacteriol. 2004. Vol. 186, N23. P.7874–7880.
 30. Puppo A., Groten K., Bastian F. et al. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process // New Phytol. 2005. Vol. 165. P.683–701.
 31. Robson R. L., Postgate J. R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation // Annu. Rev. Microbiol. 1980. Vol. 34. P.183–207.
 32. Rubio M. C., Gonzalez E. M., Minchin F. R. et al. Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases // Physiol. Plant. 2002. Vol. 115. P.531–540.
 33. Rubio M. C., James E. K., Clemente M. R. et al. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules // Mol. Plant Microbe Interact. 2004. Vol. 17, N 12. P.1294–1305.
 34. Safronova V. I., Novikova N. I. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: lyophilization and liquid nitrogen freezing // J. Microbiol. Methods. 1996. Vol. 24. P.231–237.
 35. Santos R., Bocquet S., Puppo A., Touati D. Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti* // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181, N 15. P.4509–4516.

36. Santos R., Herouart D., Puppo A., Touati D. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium-legume* symbiosis // *Mol. Microbiol.* 2000. Vol. 38. P.750–759.
37. Santos R., Herouart D., Sigaud S. et al. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2001. Vol. 14. P.86–89.
38. Schultze M., Kondorosi A. Regulation of symbiotic root nodule development // *Annu. Rev. Genet.* 1998. Vol. 32. P.33–57.
39. Sigaud S., Becquet V., Frenedo P. et al. Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HP-II-like catalases during free living growth and protective role of both catalases during symbiosis // *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181, N 8. P. 2634–2639.
40. 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 functioning // *Mol. Gen. Genet.* 1998. Vol. 259. P. 491–503.
41. Wisniewski J. P., Rathbun E. A., Knox J. P., Brewin N. J. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000. Vol. 13, N 4. P. 413–420.
- Comparative cytochemical analysis of hydrogen peroxide distribution in pea ineffective mutant SGEFix⁻¹ (*sym40*) and initial line SGE**
- A. V. Tsyganova, V. E. Tsyganov, A. Y. Borisov, I. A. Tikhonovich, N. J. Brewin
- ✳ **SUMMARY:** Comparative cytochemical analysis has revealed differences in hydrogen peroxide distribution in symbiotic nodules of pea initial line SGE and mutant SGEFix⁻¹ (*sym40*). In the initial line SGE, precipitates of cerium perhydroxide were deposited in the walls of infection threads and in adjacent material in the luminal matrix. In mutant SGEFix⁻¹, an increased deposition of cerium perhydroxide precipitates was observed in the matrix of hypertrophied infection droplets, round bacteria contained in infection threads and also around juvenile bacteroids. The observed pattern of hydrogen peroxide distribution indicates that bacteria in infected cells of mutant nodules are exposed to a stronger oxidative stress compared with nodules of the initial line.
- ✳ **KEY WORDS:** plant microbe interactions; legume *Rhizobium* symbiosis; symbiotic mutants; symbiotic nodule; infection thread; infection droplet; nitrogen fixation.

✳ Информация об авторах

Цыганов Виктор — заведующий лабораторией.
Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория молекулярной и клеточной биологии.
196608, Санкт-Петербург, Пушкин 8, ш. Подбельского, д. 3.
E-mail: Viktor_Tsyganov@arriam.spb.ru

Цыганова Анна Викторовна — ведущий научный сотрудник.
Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория молекулярной и клеточной биологии.
196608, Санкт-Петербург, Пушкин 8, ш. Подбельского, д. 3.
E-mail: anna_khodorenko@arriam.spb.ru

Борисов Алексей Юрьевич — заведующий лабораторией.
Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, отдел биотехнологии.
196608, Санкт-Петербург, Пушкин 8, ш. Подбельского, д. 3.
E-mail: ayborisov@yandex.ru

Тихонович Игорь Анатольевич — директор.
Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий
196608, Санкт-Петербург, Пушкин 8, ш. Подбельского, д. 3.
E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru

Бревин Николас — руководитель группы.
John Innes Centre,
NR4 7UH, Colney Lane, Norwich, United Kingdom.
E-mail: nick.brewin@bbsrc.ac.uk

Tsyganov Viktor — head of the laboratory.
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: Viktor_Tsyganov@arriam.spb.ru

Tsyganova Anna Viktorovna — senior researcher.
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: anna_khodorenko@arriam.spb.ru

Borisov Aleksei Yurievich — head of the laboratory.
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: ayborisov@yandex.ru

Tikhonovich Igor Anatolievich — director.
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru

Brewin Nicholas James — project leader.
John Innes Centre,
NR4 7UH, Colney Lane, Norwich, United Kingdom.
E-mail: nick.brewin@bbsrc.ac.uk