

УДК 581.1633.358577.13

## ВЛИЯНИЕ НАРИНГЕНИНА НА РОСТ ПЛАНКТОННОЙ КУЛЬТУРЫ И БИОПЛЕНОК, А ТАКЖЕ УРОВЕНЬ цАМФ И АКТИВНОСТЬ ПЕКТИНАЗЫ *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

© 2025 г. Л. А. Ломоватская<sup>1</sup>\*, А. М. Гончарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН), Иркутск, 664033 Россия

\*e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 09.10.2024 г.

После доработки 28.02.2025 г.

Принята к публикации 03.03.2025 г.

Изучено влияние нарингенина на динамику роста планктонной культуры, плотность биопленки, а также на концентрацию цАМФ и активность пектиназы *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Показано, что нарингенин не влиял на динамику роста планктонной культуры *P. syringae*, но титр клеток культуры *R. leguminosarum* снижался при его концентрации 1 нМ. Концентрация нарингенина 500 пМ уменьшала плотность биопленок *P. syringae* и увеличивала у ризобий. Уровень цАМФ под влиянием обеих концентраций нарингенина в разной степени увеличивался как в планктонных клетках, так и в биопленках. Нарингенин полностью подавлял активность пектиназы в биопленках *P. syringae*, но стимулировал ее у *R. leguminosarum*. Таким образом, нарингенин можно рассматривать как экзогенный регулятор, перспективный для практического применения в борьбе с патогеном *P. syringae* pv. *pisi*.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, биопленки, нарингенин, цАМФ, пектиназа

DOI: 10.7868/S3036576X25040067

Ризосфера растений содержит весьма богатый и разнообразный микробиом, который во многом зависит от состава корневых экссудатов растения-хозяина [1]. Горох отличается наличием широкого спектра биологически активных молекул в составе корневых выделений, которые содержат как позитивные, так и негативные аллелопатические соединения и сигнальные молекулы [2]. Наряду с этим корневые выделения гороха содержат и разнообразные сигнальные молекулы, выполняющие специфические функции в растительно-микробном диалоге. Горох является растением-хозяином как для патогена *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, так и для мутуалиста и азотфиксирующего микросимбионта *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [3]. В молекулярном диалоге, возникающем уже на самых ранних этапах взаимного узнавания между растением и бактериями, существенная роль принадлежит сигнальным молекулам обоих партнеров. Со стороны растений гороха важная роль

принадлежит нарингенину, триггеру и регулятору азотфиксирующего симбиоза [4]. Установлено, что различные концентрации нарингенина, индуктора *nod* генов бактерий, могут как стимулировать рост *Rhizobium* sps., так и ингибировать его [5]. В то же время нарингенин оказывает модулирующий эффект не только на ризобии, но и на патогены животных. Он подавляет образование биопленок *Vibrio harveyi* и *Escherichia coli* и изменяет экспрессию генов, кодирующих систему секреции III типа в *V. harveyi* [6]. В *Pseudomonas aeruginosa* нарингенин существенно ингибирует синтез токсинов, пиоцинина и таксифолина, а также гены кворум-сенсинга (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *lasA*, *lasB*, *phzA1* и *rhlA*). Кроме того, под его влиянием значительно снижается концентрация аутоиндукторов ацилгомосеринлактона и N-бутанол-L-гомосеринлактона [7]. Аналогичный эффект нарингенин оказывает на *Staphylococcus aureus*, подавляя активность одного из его факторов вирулентности – α-токсина [8].

Все перечисленные метаболические пути, затронутые влиянием нарингенина, находятся под контролем сигнальных систем бактерий, и в частности, его аденилатциклазной сигнальной системы, где цАМФ выполняет роль регулятора факторов транскрипции для многих генов бактерий [9]. В то же время роль нарингенина в регуляции физиологических функций и сигналинге фитопатогенов, являющихся возбудителями болезней гороха, в литературе практически не исследуется. Между тем данное направление представляется весьма актуальным, поскольку сравнительный анализ влияния нарингенина на рост и метаболические процессы у фитопатогенных и мутуалистических бактерий, как например, *P. syringae* pv. *pisi* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*, могут способствовать прогнозированию развития заболеваний растений, связанных с распространением патогенной микрофлоры, и в то же время позволят оптимизировать процессы симбиотической азотфиксации у бобовых.

Цель настоящего исследования – изучение влияния нарингенина на взаимосвязанные метаболические процессы у *P. syringae* pv. *pisi* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*: динамику роста планктонной культуры, плотность биопленок, а также концентрацию цАМФ и активность эндо- и экзопектиназы.

## МЕТОДИКА

В работе использовали вирулентный штамм 1865 *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* из коллекции ВНИИ фитопатологии (п. Большие Вяземы, Московская область, Россия) и эффективный по азотфиксации штамм 1022 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, полученный из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (г. Пушкин, Россия).

**Культивирование планктонной культуры бактерий с нарингенином.** Планктонную культуру обоих видов бактерий культивировали в колбах на среде, содержащей осветленный гороховый отвар, глюкозу – 15 г/л и  $\text{CaCO}_3$  – 5 г/л, перемешивали и доводили pH до 7.0. Титр бактерий определяли при 655 нм на планшетном спектрофотометре “Immunochem-2100” (“High Technology Inc.”, США) и выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ). Для определения влияния нарингенина, 5-суточную культуру бактерий доводили до титра  $0.3 \times 10^8$  кл./мл и добавляли нарингенин в конечной концентрации 500 пМ или 1 нМ. Далее бактерии культивировались в течение 3–5 суток при температуре 27°C.

**Культивирование биопленок с нарингенином.** Для приготовления биопленок использовали чашки Петри с вложенным в них диском из полиэтилена. В чашки Петри вносили по 8 мл планктонной культуры бактерий с титром  $0.3 \times 10^8$  кл./мл, а также 500 пМ или 1 нМ нарингенина в конечной концентрации и инкубировали 3 сут при 27°C. Затем среду сливали для удаления не прикрепившихся

планктонных клеток, заливали чистой средой (8 мл) с добавлением нарингенина (в концентрациях, соответствующих ранее вносимым) и продолжали культивирование еще 3 сут в тех же условиях. Плотность биопленки определяли после 6 сут культивирования. Для этого осторожно сливали культуральную жидкость, биопленку фиксировали на полиэтиленовом диске 96%-ным этанолом, окрашивали 0.1%-ным кристаллическим фиолетовым (“Аллерген”, Россия) и трижды промывали дистиллированной водой. Окрашенную пленку инкубировали в 2 мл дистиллированной воды в течение 2 мин и измеряли интенсивность окраски полученного раствора при 495 мкм на спектрофотометре “Immunochem-2100” (“High Technology”, США). Плотность биопленки была пропорциональна интенсивности окраски раствора. Результаты выражали в единицах оптической плотности (OD).

**Определение концентрации цАМФ.** Планктонную культуру бактерий центрифугировали 5 мин при 3000 g. Осадок бактерий или снятые с полиэтиленовой пленки бактерии, образовавшие биопленки, ресуспендировали в среде выделения следующего состава: фосфатный буфер – 0.02 М, pH 7.2; теофиллин – 10 мМ (ингибитор 3',5'-цАМФ фосфодиэстеразы); дитиотреитол – 1 мМ; фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) – 50 мкг/мл; гидроксимеркурийбензоат (ГМБ) – 50 мкг/мл; лейпептин – 1 мкг/мл, (все реактивы “Sigma-Aldrich”, США) и разрушали на соникаторе (“Branson Ultrasonic corp”, США), 2 цикла по 5 мин. Гомогенат центрифугировали 15 мин 16000 g и уровень цАМФ определяли в супернатанте методом ИФА [10]. Отдельно тем же методом определяли цАМФ в среде культивирования планктонной культуры и биопленок. Расчет концентрации цАМФ производили по калибровочной кривой, которую строили по цАМФ (“Sigma-Aldrich”, США) и пересчитывали на содержание белка.

**Определение содержания белка в бактериях.** Белок в клетках бактерий и культуральной жидкости определяли по методу Брэдфорда [11].

**Определение активности пектиназы.** Активность пектиназы в бактериях и культуральной жидкости определяли по содержанию редуцирующих сахаров в реакционной смеси. Для этого бактерии осаждали центрифугированием и разрушали в соникаторе, 2 цикла по 5 мин. В экспериментах по определению влияния нарингенина на активность пектиназы *in vitro* использовали планктонную культуру бактерий, культивируемую без нарингенина. К разрушенным бактериям добавляли нарингенин в конечной концентрации 500 пМ или 1 нМ, свекловичный пектин в качестве субстрата и инкубировали 3 ч при 27°C. Содержание сахаров определяли на планшетном спектрофотометре

при  $\lambda = 670$  нм, активность пектиназы выражали в мг/мл редуцирующих сахаров [12].

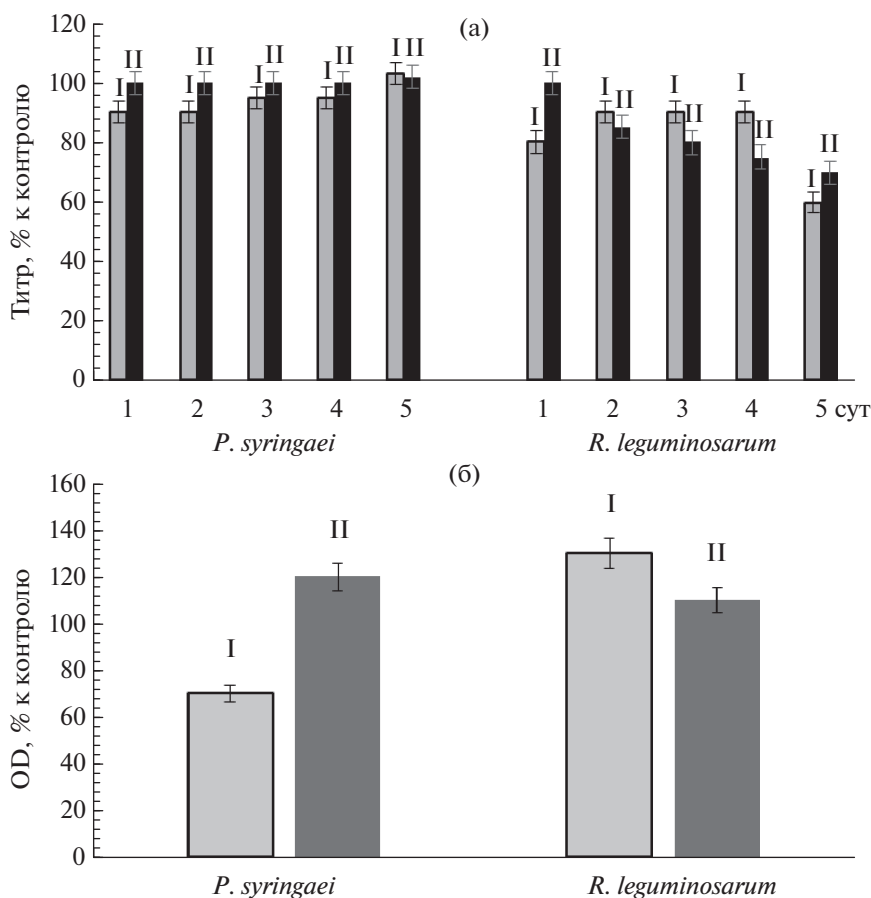
**Статистический анализ.** Эксперименты выполнены в трех биологических и четырех аналитических повторностях. Все статистические анализы сделаны с использованием пакета программ Statistica версии 13.3 (TIBCO Software Inc., США). Значимость различий в результатах экспериментов представлена на графиках как стандартное отклонение. Различия достоверны при  $p < 0.05$ . Непараметрический U-критерий Манна–Уитни использовался для определения различий между двумя независимыми группами результатов [13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

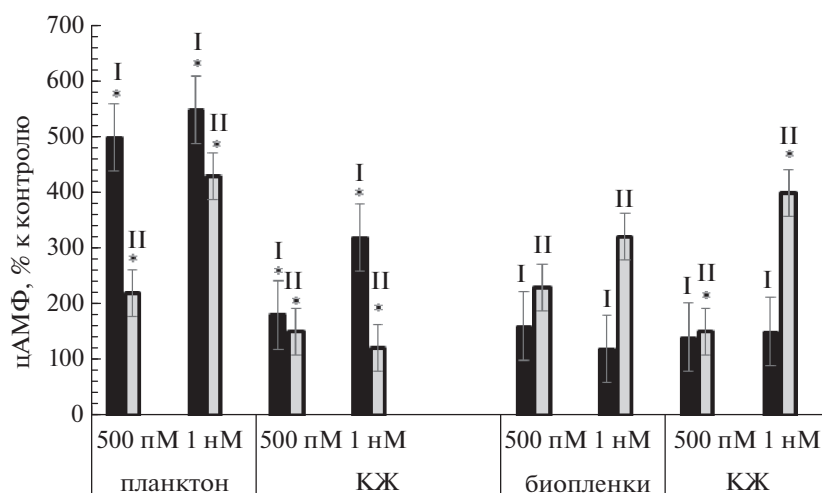
**Влияние нарингенина на динамику роста планктонной культуры и плотность биопленок *P. syringae* pv. *pisi* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*.** Результаты исследования показали, что концентрации 500 пМ, 1 нМ нарингенина оказывали весьма незначительное влияние на рост планктонной культуры *P. syringae*, тогда как клетки *R. leguminosarum* оказались более чувствительными. Под влиянием обеих концентраций титр бактериального микросимбионта

на 4–5 день культивирования снижался на 20–25%, (рис. 1а). В то же время на биопленки нарингенин оказывал иное влияние: 500 пМ нарингенина снижали плотность пленок *P. syringae* на 40%, а 1 нМ на 20%. У ризобий, напротив, более низкая концентрация нарингенина стимулировала рост на 30%, тогда как 1 нМ концентрация также стимулировала рост, но только на 20% (рис. 1б).

**Влияние нарингенина на изменение концентрации цАМФ в планктонной культуре и биопленках *P. syringae* pv. *pisi* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*.** В клетках бактерий и среде культивирования цАМФ детектировался в наномолярных концентрациях. Его уровень под воздействием обеих концентраций нарингенина (500 пМ и 1 нМ) возрастал в различной степени и в планктоне, и в биопленках у обеих бактериальных культур (рис. 2). В большей степени отвечал на воздействие *P. syringae* в планктонной культуре, где концентрация этой сигнальной молекулы возрастала практически одинаково под воздействием обеих концентраций нарингенина. Эта тенденция также сохранялась и в среде для выращивания бактерий, только на более низком уровне. У ризобий нарингенин также стимулировал синтез цАМФ, хотя и в меньшей степени. При



**Рис. 1.** Влияние нарингенина на титр планктонной культуры (а) и плотность биопленок (б) *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: концентрация нарингенина 500 пМ (I) и 1 нМ (II),  $p \leq 0.05$  отмечены\*.



**Рис. 2.** Влияние нарингенина на изменение концентрации цАМФ (%) в планктонной культуре, био пленках *P. syringae* pv. *pisi* (I) и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (II) и культуральной жидкости (КЖ). Статистически значимые различия между группами нарингенина 500 пМ и 1 нМ (U-критерий Манна–Уитни;  $p \leq 0.05$ ) отмечены\*.

этом 1 нМ нарингенин оказывал более сильный стимулирующий эффект. В тоже время в среде культивирования ризобий уровень цАМФ только незначительно превышал контроль.

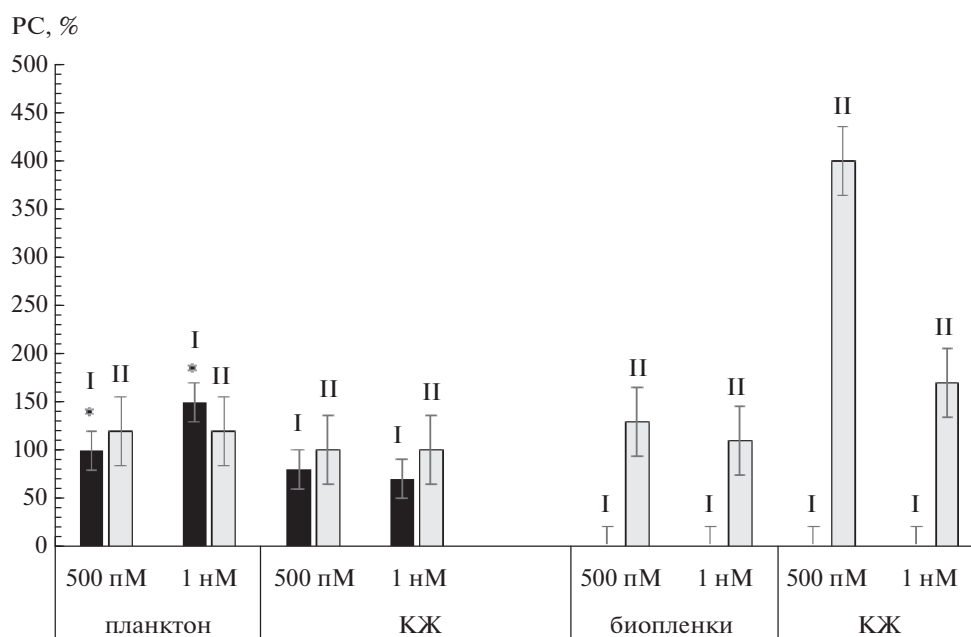
В био пленках наблюдалась совсем иная закономерность. В био пленках *P. syringae* под воздействием 500 пМ нарингенина уровень цАМФ превышал контроль на 60%, и всего лишь на 20% при культивировании с 1 нМ нарингенина. В тоже время в био пленках ризобий этот показатель возрастал на 230 и 320% соответственно. Обращает на себя внимание изменение уровня цАМФ в среде культивирования *R. leguminosarum*. Под влиянием низкой концентрации нарингенина его уровень возрастал всего на 50, а 1 нМ стимулировал его синтез на 300% (рис. 2).

**Влияние нарингенина на активность эндо- и экзопектиназ *P. syringae* pv. *pisi* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*.** Известно, что пектиназы являются важным фактором вирулентности у фитопатогенов и мутуалистов растений. На активность эндо- и экзопектиназы различных видов бактерий нарингенин также оказал неодинаковое воздействие (рис. 3). В планктонной культуре активность эндо- и экзопектиназ обеих видов бактерий почти не изменялись. Однако в био пленках активность пектиназы в бактериях и среде культивирования *P. syringae* ингибировалась полностью использованными концентрациями нарингенина, тогда как активность экзопектиназы *R. leguminosarum* возрастала весьма существенно, особенно при концентрации нарингенина 500 пМ (рис. 3).

В почве бактерии существуют в составе гетерогенных микробных сообществ, и все в одинаковой степени испытывают влияние различных метаболитов из корневых экссудатов растений [14]. На се-

годняшний день наиболее подробно изучено влияние нарингенина на процессы симбиотической азотфиксации, и, в частности, на метаболизм ризобий [15]. В литературе до сих пор нет однозначного мнения о концентрациях нарингенина, оказывающих положительный эффект на метаболизм полезных микроорганизмов. По некоторым сведениям, инфицирование *R. leguminosarum* корней гороха повышало уровень нарингенина в корневых экссудатах до 100 пМ [16]. Однако эксперименты *in vitro* показали, что на индукцию *nod*-генов и рост культуры *R. leguminosarum* наибольший активирующий эффект оказывал нарингенин в концентрации от 2.5 до 500 нМ [17]. При этом, экзогенное применение нарингенина в диапазоне 40 мМ–3.7 М ингибировало образование клубеньков у гороха [17, 18] и снижало число ризосферных микроорганизмов [19]. При фитопатогенной инфекции корней гороха, например, заражении *P. syringae*, концентрация нарингенина в корневых экссудатах повышалась до 400 пМ [16]. Если предположить, что в ризосфере растений гороха одновременно присутствуют *R. leguminosarum* и *P. syringae*, то возрастание уровня нарингенина до сотен пикомолей может оказывать ингибирующее рост действие на фитопатоген, не затрагивая специальную функцию этого соединения в регуляции азотфиксирующего симбиоза. Подтверждением этому могут служить представленные результаты, свидетельствующие о том, что более низкая концентрация нарингенина весьма существенно снижала плотность фитопатогена в био пленках, в то время как плотность био пленки мутуалиста *R. leguminosarum* значительно возрастала под влиянием нарингенина (рис. 1).

В природе био пленки состоят из различных видов бактерий [20], и хотя их образование является



**Рис. 3.** Влияние нарингенина на активность пектиназы (редуцирующие сахара, РС, % к контролю) в планктонной культуре и биопленках *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (I) и *Rhizobium leguminosum* bv. *viciae* (II). Статистически значимые различия между группами нарингенина 500 пМ и 1 нМ (U-критерий Манна–Уитни;  $p \leq 0.05$ ) отмечены\*.

сложным процессом и регулируемым несколькими различными факторами, некоторые модуляторы образования биопленок, такие как вторичные мессенджеры являются общими почти для всех видов бактерий [21]. Ингибирование роста биопленок *P. syringae* и стимуляция их у *R. leguminosarum* более низкой концентрацией (500 пМ) нарингенина представляются вполне закономерными, поскольку по литературным данным такая концентрация наиболее близка к физиологической [16]. В литературе есть сведения, что нарингенин, воздействуя на сигнальные системы бактерий, контролирует кворум-сенсинг, плотность биопленок, а также вирулентность [22].

Известно, что цАМФ регулирует переход обратимого прикрепления бактерий к необратимому, что было показано на *P. aeruginosa* [23]. Это может быть связано с тем, что в бактериальном планктоне при избыточном уровне цАМФ снижалась гидрофобность клеток [23], что способствовало их необратимому прикреплению к субстрату. Напротив, на модели *Serratia marcescens* показано, что существенное снижение уровня цАМФ также увеличивало плотность биопленки за счет активации фимбрий I типа [24]. Таким образом очевидно, что для различных по специализации видов бактерий необходим индивидуальный, строго определенный уровень цАМФ для регуляции различных этапов роста и метаболизма. Эта сигнальная молекула в основном взаимодействует с соответствующими факторами транскрипции, в частности, с регуляторным белком CRP (catabolite gene-activating pro-

tein) [25]. Эффективность такого взаимодействия опять же весьма индивидуальна и зависит от видовой принадлежности бактерий. Так, возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* способен проявлять свою вирулентность только при уровне внутриклеточного цАМФ не ниже 4 мМ, поскольку чувствительность CRP к цАМФ у этого возбудителя очень низкая [26]. В то же время почвенная непатогенная бактерия *Pseudomonas putida* синтезирует цАМФ в сверхнизких концентрациях, которые находятся ниже порога определения. Однако CRP этой бактерии обладает очень высоким сродством к цАМФ, что обуславливает возможность негативной регуляции экспрессии генов этим нуклеотидом. В то же время *E. coli* занимает промежуточное положение, ее CRP обладает средней по уровню степенью сродства к цАМФ [26].

Очевидно, что доступность нарингенина выше в планктонной культуре, чем в биопленках, которые из-за особенностей сложной структуры и клеточной иерархии более защищены от воздействия внешних факторов [20]. Вероятно, с этим можно связать более высокий уровень цАМФ в планктонной культуре обоих видов микроорганизмов, тем более что нарингенин способен в значительных количествах накапливаться в цитоплазматической мембране микроорганизмов [27]. Поскольку синтез цАМФ зависит от активности аденилатциклазы, ранее было исследовано его влияние на ее активность у ризобий и показан стимулирующий эффект этого соединения на трансмембранную аденилатциклазу (ТАЦ) как в планктонной куль-

туре, так и в биопленках. Более того, удалось выяснить, что активация тАЦ происходит с участием рецепторов, для которых нарингенин является лигандом [28]. Это подчеркивает специфичность действующей концентрации цАМФ у *R. leguminosarum* в этих условиях, необходимой для становления азотфиксирующего симбиоза, тогда как изменение этого показателя в планктонной культуре *P. syringae* свидетельствовало о сигнале тревоги, который реализуется в угнетении образующихся биопленок.

Кроме хорошо известной роли цАМФ в регуляции катаболической репрессии [29], цАМФ–CRP (сAMP receptor protein) является важным регулятором вирулентности у многих патогенов [30]. Например, у *Yersinia enterocolitica* цАМФ–CRP необходим для контроля генов вирулентности, кодирующих активатор плазмिनотгена и систему секреции III типа [31]. У многих фитопатогенов гомологом CRP является регулятор фактора вирулентности (Vfr – virulence factor regulator), который также участвует в настройке их вирулентности. Показано, что у мутанта *P. syringae* sp., дефицитного по гену *vfr*, была существенно снижена вирулентность [32] и сделан вывод о том, что Vfr может контролировать важные факторы вирулентности с помощью независимого от ацилгосеринлактона опосредованного механизма на ранней стадии заражения этой бактерией растений табака [33].

*P. syringae* относится к граммотрицательным видам бактерий, основным фактором вирулентности которых считаются эффекторные белки, доставляемые в растения системой секреции III типа [34]. Однако не следует забывать, что на ранних этапах инфицирования фитопатогену необходимы гидролитические ферменты для преодоления растительных клеточных барьеров и распространения по тканям растений [35]. Между тем роль и активность таких ферментов у *P. syringae* изучены весьма слабо. Ранее в работе [36] была определена активность пектиназы и целлюлазы у *P. syringae*, показана их активация при контакте с тканями растений и определена взаимосвязь с изменением уровня цАМФ и активностью тАЦ бактерий. Кроме того, некоторыми исследователями показано, что механизм регуляции активности пектиназ фитопатогенов заключается в активации транскрипции генов группы *pel*, кодирующих пектиназы, через связывание цАМФ–CRP с их промоторами и в дальнейшем связывании с участком РНК-полимеразы [37].

Несмотря на то, что в клетках планктонной культуры и среде инкубации *P. syringae* активность пектиназы зафиксирована значительно ниже, чем у *R. leguminosarum*, нарингенин практически не оказывал влияния на ее активность у обоих видов бактерий. Однако в состоянии биопленок этот показатель принципиально менялся: у *P. syringae* активность пектиназы ингибировалась пол-

ностью, но повышалась в 2–4 раза у ризобий (рис. 3). Учитывая, что нарингенин *in vitro* не оказывал влияния на активность пектиназы, очевидно, что в биопленках менялись механизмы регуляции генов вирулентности, в частности пектиназы, у обоих видов бактерий. Можно предположить, что это определялось, в том числе, вариациями внутриклеточного бактериального уровня цАМФ.

Проведенные исследования позволили сделать заключение о том, что нарингенин в концентрации, приближенной к физиологической, способен оказывать прямо противоположный эффект на метаболизм фитопатогена и мутуалиста. При этом особенно важно, что наиболее четко регуляторный эффект нарингенина на факторы вирулентности проявлялся в биопленках бактерий. Стимуляция активности пектиназы у *R. leguminosarum* указывала на специфичность процесса регуляции вирулентности на ранних этапах азотфиксирующего симбиоза. В то же время представляется важным, что нарингенин в низкой концентрации способен подавлять активность пектиназы у *P. syringae*. Возможно, это может быть предпосылкой для создания метода борьбы с возбудителем бактериального ожога листьев гороха.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по проекту гос. задания № 0277-2025-0002, рег. № НИОКТР – 125021902466-4.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе не содержится никаких исследований с участием людей или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steinauer K., Thakur M.P., Hannula S.E., Weinhold A., Uthe A., van Dam N.M., Bezemer T.M. // Plant Cell Environ. 2023. V. 46. P. 1885–1899. <https://doi.org/10.1111/pce.14570>
2. Ali S., Glick B.R. // Impacting Plant Biocontrol Growth. Crops. 2024. V. 4. P. 43–54. <https://doi.org/10.3390/crops4010004>
3. Ломоватская Л.А., Макарова Л.Е., Кузакова О.В., Романенко А.С., Гончарова А.М. // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 3. С. 287–292. <https://doi.org/10.1134/S0003683816030108>
4. Dennis M.W., Karoney O., Muge E., Nyaboga E.N., Baraza D.L., Shibairo S.I., Naluyange V. // Front. Sustain. Food Systems. 2021. V. 4. Article 604396. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.604396>

5. *Siczek A., Frac M., Nawrocka A., Wielbo J., Kidaj D.* // Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science. 2015. V. 65. № 2. P. 125–131. <http://dx.doi.org/10.1080/09064710.2014.975835>
6. *Vikram A., Jayaprakasha G.K., Jesudhasan P.R., Pillai S.D., Patil B.S.* // Internet J. Food Microbiol. 2010. V. 15. P. 109–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x>
7. *Hernando-Amado S., Alcalde-Rico M., Gil-Gil T., José R., Valverde J.R., Martínez J.L.* // Front. Mol. Bios. 2020. V. 7. Article 25. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00025>
8. *Zhang Y., Wang J.-F., Dong J., Wei J.-Y., Wang Y.-N., Dai X.-H. et al.* // Fitoterapia. 2013. V. 86. 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.02.001>
9. *Smith R.S., Wolfgang M.C., Lory S.* // Infect. Immun. 2004. V. 72. № 3. P. 677–1684. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1677-1684.2004>
10. *Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V.* // Plant Cell Reports. 2011. V. 30. № 1. P. 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>
11. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
12. *Вешняков В.А., Хабаров Ю.Г., Камакина Н.Д.* // Химия растительного сырья. 2008. Т. 6. № 4. С. 47–50.
13. *Kerby D.S.* // Comprehens. Psychol. 2014. V. 3. 11.1 Т. 3.1. <https://doi.org/10.2466/11.IT.3.1>
14. *Pantigoso H.A., Newberger D., Vivanco J.M.* // J. Appl. Microb. 2022. V. 133. № 5. P. 2864–2876. <https://doi.org/10.1111/jam.15686>
15. *Nouwen N., Gargani D., Giraud E.* // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2019. V. 32. №. 11. P. 1517–1525. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-19-0133-R16>
16. *Макарова Л.Е., Дударева Л.В., Петрова И.Г., Васильева Г.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 2. С. 205–213. <https://doi.org/10.7868/S0555109916020094>
17. *Tsvetkova G., Teofilova T., Georgiev G.I.* // General Appl. Plant Physiol. 2006. V. 1. P. 67–71.
18. *Novak K., Chovanec P., Škrdleta V., Kropáčová M., Lisá L., Němcová M. et al.* // 2002. V. 375. P. 1735–1745. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf016>
19. *Szoboszlai M., White-Monsant A., Moe L.A.* // PLoS One. 2016. V. 11. № 1. P. e 0146555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146555>
20. *Mir D.H., Rather M.A.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2024. V. 60. № 2. P. 264–279. <https://doi.org/10.1134/S000368382402011>
21. *Kalia D., Merey G., Nakayama S., Zheng Y., Zhou J., Luo Y.* // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. № 1. P. 305–341. <https://doi.org/10.1039/c2cs35206k>
22. *Meneses N., Taboada H., Dunn M.F., Vargas M.C., Buchs N., Heller M., Encarnación S.* // Archiv. Microbiol. 2017. V. 199. P. 737–755. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1351-8>
23. *Ono K., Oka R., Toyofuku M., Sakaguchi A., Hamada M., Yoshida S., Nomura N.* // Microbes Environ. 2014. V. 29. P. 104–106. <https://doi.org/10.1264/jisme.2014.13151>
24. *Kalivoda E., Brothers K., Stella M., Schmitt M., Shanks R.* // PLoS One. 2013. V. 8. № 7. P. 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071267>
25. *Liu C., Sun D., Zhu J., Jiawen Liu J., Liu W.* // Front. Microb. 2020. V. 11. Article 802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00802>
26. *Green J., Stapleton M.R., Smith L.J., Artymiuk P.J., Kahramanoglou C., Hunt D.M., Buxton R.S.* // Microbiol. 2014. V. 18. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.01.003>
27. *Recourt K., Van Brussel A.A., Driessen A.J., Lugtenberg B.J.* // J. Bacteriol. 1989. V. 171. P. 4370–4374. <https://doi.org/10.1128/jb.171.8.4370-4377.1989>
28. *Гончарова А.М., Ломоватская Л.А., Романенко А.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. № 3. С. 344–348. <https://doi.org/10.1134/S0003683823030079>
29. *West S.E., Sample A.K., Runyen-Janecky L.* // J. Bacteriol. 1994. V. 176. № 24. P. 7532–7542. <https://doi.org/10.1128/jb.176.24.7532-7542.1994>
30. *Zhan L., Han Y., Yang L., Geng J., Li Y., Gao H.* // Infect. Immun. 2008. V. 76. № 11. P. 5028–5037. <https://doi.org/10.1128/iai.00370-08>
31. *Lathem W.W., Schroeder J.A., Bellows L.E., Ritzert J.T., Koo J.T., Price P.A.* // mBio J. 2014. V. 5. № 1. e01038–e01013. <https://doi.org/10.1128/mBio.01038-13>
32. *Ogura K., Matsui H., Yamamoto M., Noutoshi M., Toyoda K., Fumiko T., Ichinose Y.* // Biochem. Biophys. Report. 2021. V. 26. 100944. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100944>
33. *Taguthi F., Ichinose Y.* // Mol. Plant Pathol. 2013. V. 14. № 3. P. 279–292. <https://doi.org/10.1111/mpp.12003>
34. *Crabill E., Joe A., Block A., van Rooyen J., Alfano J.* // Plant Physiol. 2010. V. 154. № 1. P. 233–244. <https://doi.org/10.1104/pp.110.159723>
35. *Magro P., Varvaro L., Chilosi G., Avanzo C., Balestra G.M.* // FEMS Microbiol. Letters. 1994. V. 117. № 1. P. 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06733.x>
36. *Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Рыкун О.В.* // Микробиол. 2015. Т. 84. № 4. С. 473–476. <https://doi.org/10.1134/S0026261715040116>
37. *Nasser W., Robert-Baudouy J., Reverchon S.* // Mol. Microb. 1997. V. 26. № 5. P. 1071–1082. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6472020.x>

## Effect of Naringenin on the Growth of Planktonic Culture and Biofilms as Well as the cAMP Level and Pectinase Activity of *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

L. A. Lomovatskaya<sup>a,\*</sup> and A. M. Goncharova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry (SIPPB SB RAS), Irkutsk, 664033 Russia*

\*e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

The aim of this study was to investigate the effect of naringenin on the growth dynamics of planktonic culture, biofilm density, as well as the concentration of cAMP and pectinase activity of *P. syringae* and *R. leguminosarum*. The studies showed that naringenin did not affect the growth dynamics of the planktonic culture of *P. syringae*, but the titer of the *R. leguminosarum* culture decreased at 1 nM naringenin. 500 pM naringenin suppressed the density of *P. syringae* biofilms and stimulated it in rhizobia. The cAMP level under the influence of both naringenin concentrations increased to varying degrees both in planktonic and biofilms in both cultures. Naringenin completely suppressed pectinase activity in *P. syringae* biofilms, but stimulated it in *R. leguminosarum*. Thus, naringenin can be considered as an exogenous promising regulator for practical application in the fight against *Pseudomonas syringae* pv. *lisi*.

**Keywords:** *Pseudomonas syringae* pv. *lisi*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, biofilms, naringenin, cAMP, pectinase