

Глутатион в антиоксидантной системе защиты в клубеньках бобовых растений

Цыганов В. Е.^{A*}, Иванова К. А.^A, Кусакин П. Г.^A, Цыганова А. В.^A

^A *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин 8, Россия. *E-mail: vetsyganov@arriam.ru*

Формирование азотфиксирующих клубеньков на корнях бобовых растений требует поддержание тонкого окислительно-восстановительного баланса клетки. Хотя у растений основным неферментативным антиоксидантом является аскорбиновая кислота, тиоловый трипептид глутатион также играет важную роль в формировании клубеньков. Глутатион синтезируется в две АТФ-зависимые стадии. На первой стадии, катализируемой γ -глутамилцистеинсинтетазой (кодируемой геном *GSH1*), из глутамата и цистеина синтезируется γ -Глу-Цис. На второй стадии к γ -Глу-Цис присоединяется глицин, она катализируется глутатионсинтетазой (кодируемой геном *GSHS*). У Бобовых наряду с глутатионом присутствует его гомолог – гомоглутатион, у которого глицин заменен на β -аланин. Синтез гомоглутатиона осуществляет гомоглутатионсинтетаза, кодируемая геном *hGSHS*. Значимая роль обоих тиолов в клубенькообразовании была показана для модельного бобового растения *Medicago truncatula* с использованием антисмысловых конструкций к *GSHS* и *hGSHS*, а также анализа транскрипционных профилей растений, обработанных специфическим ингибитором биосинтеза (гомо)глутатиона – L-бутионин-[S-R]-сульфоксимином (Иванова, Цыганов, 2017). Было выявлено, что на ранних стадиях формирования клубеньков необходимым условием становится наличие определенного пула обоих тиолов в растительных клетках для ингибирования защитных механизмов, индуцируемых салициловой кислотой, и колонизации ризобиями клеток макросимбионта. Снижение уровней глутатиона и гомоглутатиона снижало число клубеньков и уровни экспрессии маркерных генов ранних нодулинов *MtENOD12* и *MtENOD40*.

Была предположена роль глутатиона в стимуляции меристематической активности в клубеньках, поскольку максимальная концентрация глутатиона в клубеньке наблюдается в меристеме и зоне инфекции (Matamoros et al., 1999). Можно предположить, что флуктуации количества глутатиона в цитоплазме и ядре в клетках в зоне инфекции могут регулировать повторяющиеся раунды эндоредупликации инфицированных клеток. При исследовании роли (гомо)глутатиона в зрелых клубеньках *M. truncatula* было показано, что сверхэкспрессия гена *GSH1* в зоне азотфиксации приводила к увеличению содержания глутатиона, но не го-

моглутатиона, при этом наблюдалось повышение эффективности азотфиксации (El Msehli et al., 2011). Однако снижение уровня экспрессии *GSH1* привело к уменьшению эффективности азотфиксации и содержания обоих тиолов, а также размера клубеньков и экспрессии генов *TrxS1* (кодирует тиоредоксин) и *LEG* (кодирует леггемоглобин). Известно, что *TrxS1* влияет на дифференцировку бактериоидов через окислительно-восстановительное состояние цистеин-богатого пептида NCR335 (Ribeiro et al., 2017). Были выявлены различия в пространственной локализации экспрессии генов биосинтеза (гомо)глутатиона. Ген *GSH1* экспрессировался в меристеме, зоне инфекции и ранней зоне азотфиксации, *hGSHS* – в коре и проводящих пучках, *GSHS* – в коре и зоне азотфиксации (El Msehli et al., 2011). Анализ 73 видов Бобовых, представляющих 3 подсемейства, не выявил зависимость клубенькообразования от уровней накопления (гомо)глутатиона в тканях растений (Colville et al., 2015).

Таким образом, хотя на настоящий момент выявлена важная роль (гомо)глутатиона в развитии и функционировании симбиотических клубеньков, специфичность действия каждого из тиолов остается слабо изученной. Тем не менее, недетерминированные клубеньки (с меристемой, функционирующей продолжительное время) обычно содержат глутатион, в то время как в детерминированных клубеньках (с меристемой активной ограниченное время) преимущественно встречается гомоглутатион (Matamoros et al., 1999).

Недавно была изучена роль глутатиона (GSH), гомоглутатиона (hGSH) и их соотношения в развитии и функционировании симбиотических клубеньков, а также в защитных реакциях, сопровождающих неэффективное клубенькообразование у гороха (*Pisum sativum*) (Ivanova et al., 2022). Была использована панель симбиотических мутантов гороха, блокированных на различных стадиях развития симбиотических клубеньков: *sym33-3* (слабая аллель, «запертые» инфекционные нити, спорадический выход бактерий, проявление сильных защитных реакций) и *sym33-2* (сильная аллель, «запертые» инфекционные нити, проявление сильных защитных реакций), а также *sym40-1* (аномальные бактериоиды, окислительный стресс, раннее старение, активация защитных реакций). В результате проведенных исследований было выявлено, что соотношение глутатиона и гомоглутатиона в клубеньках выше, чем в неинокулированных корнях у всех анализируемых генотипов, причем наибольшее значение было обнаружено в клубеньках дикого типа. Более того, было показано, что переключение экспрессии генов в тканях клубеньков с *hGSHS* на *GSHS* происходит только после высвобождения бактерий из инфекционных нитей, приводя к увеличению соотношения глутатион : гомоглутатион. В неэффективных клубеньках мутантов соотношение глутатион : гомоглутатион

было различным и коррелировало со стадией развития клубенька. Изменение уровня обоих тиолов приводило к активации защитных реакций в клубеньках. Применение ингибитора биосинтеза глутатиона и гомоглутатиона

L-бутионин-[S-R]-сульфоксимины приводило к морфологическим нарушениям в зоне азотфиксации в клубеньках дикого типа, влияло на формирование симбиосом в клубеньках мутанта *sum40-1*, а также на функционирование меристемы и рост инфекционной нити в клубеньках мутанта *sum33-3*. Повышение уровня обоих тиолов после обработки глутатионом способствовало развитию инфекции и усилению защитных реакций в клубеньках мутанта *sum33-3*, тогда как аналогичное повышение в клубеньках мутанта *sum40-1* приводило к образованию инфицированных клеток, напоминающих азотфиксирующие клетки дикого типа, и исчезновению зоны раннего старения в основании клубенька. Между тем, повышение уровня гомоглутатина в клубеньках мутанта *sum40-1* в результате обработки глутатионом проявилось в виде ограничения инфекции, аналогичного тому, что наблюдалось в необработанных клубеньках мутанта *sum33-3*. Эти данные свидетельствуют о том, что для правильной симбиотической фиксации азота необходим определенный уровень тиолов и что изменения в содержании тиолов или соотношении глутатиона и гомоглутатиона связаны с различными нарушениями развития клубенька и активацией защитных реакций.

Работа поддержана Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2022-320 от «20» апреля 2022 г. грант НЦМУ «Агротехнологии будущего»).

Библиографические ссылки

1. Иванова К.А., Цыганов В.Е. Антиоксидантная система защиты в симбиотических клубеньках бобовых растений (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. 52(5): 878–894.
2. Colville L., Sáez C.M.B., Lewis G.P., Kranmer I. The distribution of glutathione and homogluthathione in leaf, root and seed tissue of 73 species across the three sub-families of the *Leguminosae*. *Phytochemistry*, 2015, 115: 175-183.
3. El Msehli S., Lambert A., Baldacci-Cresp F., Hopkins J., Boncompagni E., Smiti S.A., Hérouart D., Frendo P. Crucial role of (homo)glutathione in nitrogen fixation in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.*, 2011, 192(2): 496-506.
4. Ivanova K.A., Chernova E.N., Kulaeva O.A., Tsyganova A.V., Kusakin P.G., Russkikh I.V., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. The regulation of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodule infection and defense responses by glutathione, homogluthathione, and their ratio // *Front. Plant Sci.* 2022, 13: 843565.
5. Matamoros M.A., Moran J.F., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M.C., Becana M. Glutathione and homogluthathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.*, 1999, 121: 879-888.

6. Ribeiro C.W., Baldacci-Cresp F., Pierre O., Larousse M., Benyamina S., Lambert A., Hopkins J., Castella C., Cazareth J., Alloing G., Boncompagni E. Regulation of differentiation of nitrogen-fixing bacteria by microsymbiont targeting of plant thioredoxin s1. *Curr. Biol.*, 2017, 27(2): 250-256.

Роль пероксида водорода (H₂O₂) в симбиотических клубеньках Бобовых

Цыганова А. В.^{A*}, Горшков А. П.^A, Цыганов В. Е.^A

^A *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия. *E-mail: avtsyganova@arriam.ru*

Активные формы кислорода (АФК) и азота, такие как супероксид-анион (O₂•⁻), пероксид водорода (H₂O₂) или оксид азота (NO), являются окислительно-восстановительными сигнальными молекулами, которые вырабатываются растениями в ответ на воздействия окружающей среды.

Одной из наиболее изученных АФК является пероксид водорода (Matamoros, Vecana, 2020). Многочисленные данные показали, что H₂O₂ играет важную роль у растений при абиотических и биотических стрессах. Он участвует во многих механизмах устойчивости, таких как укрепление клеточной стенки растений и продукция фитоалексинов. Также было показано, что H₂O₂ действует как сигнальная молекула, участвуя в регуляции широкого спектра процессов жизнедеятельности растений, таких как старение (Purro *et al.*, 2005; Matamoros *et al.*, 2013), фотодыхание и фотосинтез, движение устьиц, клеточный цикл, а также рост и развитие. Излишнее накопление H₂O₂ может привести к окислительному стрессу растения, который вызывает клеточную гибель. Рост и развитие растений во многом зависит от развития эффективного механизма, удаляющего H₂O₂. Ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза, аскорбат пероксидаза и глутатион редуктаза, а также неферментные антиоксиданты — токоферолы, аскорбиновая кислота и глутатион совместно участвуют в детоксикации H₂O₂. Поддержание концентрации H₂O₂ на соответствующем уровне может содействовать развитию растения и усиливать устойчивость к стрессам окружающей среды. Многочисленные исследования показали, что H₂O₂ не только сам является ключевой сигнальной молекулой в серии ответов, но и активирует множество других важных сигнальных молекул у растений (Ca²⁺, салициловую кислоту, абсцизовую кислоту, жасмоновую кислоту, этилен, NO) (Desikan *et al.*, 2004; Purro *et al.*, 2005). Эти сигнальные молекулы функционируют совместно и играют комплексную роль при передаче сигнала во время роста, развития и устойчивости растений.