

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 (H_2O_2) 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 ($O_2^{\bullet-}$), пероксид водорода (H_2O_2) 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, Vescana, 2020). Многочисленные данные показали, что H_2O_2 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 H_2O_2 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 H_2O_2 может привести к окислительному стрессу растения, который вызывает клеточную гибель. Рост и развитие растений во многом зависит от развития эффективного механизма, удаляющего H_2O_2 . 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 H_2O_2 . Поддержание концентрации H_2O_2 на соответствующем уровне может содействовать развитию растения и усиливать устойчивость к стрессам окружающей среды. Многочисленные исследования показали, что H_2O_2 не только сам является ключевой сигнальной молекулой в серии ответов, но и активирует множество других важных сигнальных молекул у растений (Ca^{2+} , 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.

АФК, в том числе и пероксид водорода, продуцируются во время ризобияльной инфекции (Pauly *et al.*, 2006; Puppo *et al.*, 2013). Гены НАДФН-оксидазы, также называемые гомологами оксидазы респираторного взрыва (Rboh), были недавно идентифицированы и охарактеризованы в геномах различных Бобовых. Было показано, что RbohA и RbohB могут играть ключевую роль в успешной колонизации ризобий и правильном росте и форме инфекционных нитей, так как стимулируют необходимую продукцию АФК. В качестве потенциальных источников ферментативных АФК также рассматриваются пероксидазы III класса (Prx-III), их еще называют пероксидазами, индуцированными ризобиями (Rip1-10).

Nod-факторы, запускающие процесс клубенькообразования, могут активировать первую волну продукции АФК, участвующую в развитии клубеньков, и ингибировать вторую волну, участвующую в защитных реакциях (Cárdenas, Quinto, 2008). Первая волна модулирует экспрессию генов растений и/или окислительно-восстановительный статус белков, участвующих в деформации корневых волосков, росте инфекционной нити и формировании клубеньков (Cárdenas, Quinto, 2008; Puppo *et al.*, 2013).

Пероксид водорода непосредственно вовлечен в регуляцию роста за счет различных эффектов на эластичность клеточной стенки (Bell *et al.*, 2009). Корневые волоски и пыльцевые трубки растут за счет полярного типа роста клеток. Известно, что корневые волоски и пыльцевые трубки производят в растущем кончике АФК, необходимые для роста, так как перекисное сшивание белков клеточных стенок обеспечивают способность противостоять тургорному давлению. Кроме того, накопление АФК в корневых волосках колеблется во время роста и это сопровождается колебаниями pH, Ca^{2+} и скорости роста (Bell *et al.*, 2009).

Как и в случае других форм полярного роста клеток, рост инфекционной нити происходит в результате направленного отложения материала клеточной стенки и клеточной мембраны на кончике. При этом полярный рост инфекционной нити требует высокой степени координации между многими клеточными и внеклеточными процессами, включая динамику кальция, действие апопластных АФК, цитоскелета и везикулярного транспорта.

Prx-III, а также ризобияльные каталазы (Jamet *et al.*, 2007) способствуют упрочнению стенки и матрикса инфекционной нити (Wisniewski *et al.*, 2000). В процессе инфицирования продукция супероксид-аниона и H_2O_2 наблюдалась в инфекционных нитях и инфицированных клетках (Santos *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004; Цыганова и др., 2009). Была продемонстрирована динамика накопления пероксида водорода во время роста

инфекционной нити с отвердеванием клеточной стенки, а затем и ее матрикса (рис. 1) (Цыганова и др., 2009), что, возможно, способствует его затвердеванию в результате сшивания остатков тирозина в молекулах арабиногалактанпротеин-экстенсинов (рис. 1Г) (Brewin, 2004). Таким образом, во время роста инфекционной нити H_2O_2 способствует повышению жесткости инфекционной нити (Rathbun *et al.*, 2002; Purro *et al.*, 2013), а также выполняет сигнальную функцию (Pauly *et al.*, 2006; Purro *et al.*, 2013).

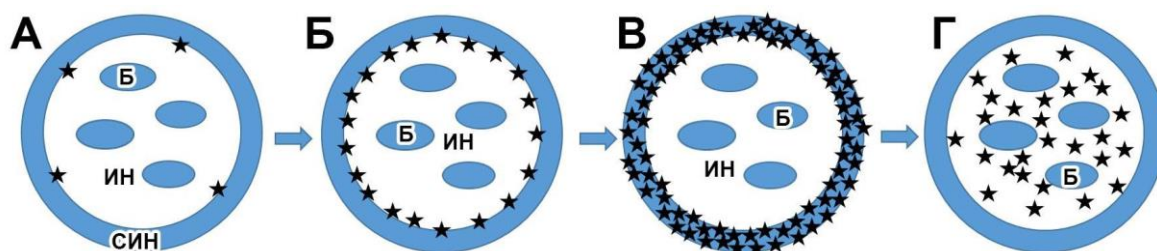


Рис. 1. Локализация H_2O_2 в инфекционных нитях в клубеньках гороха (*Pisum sativum* L.) дикого типа. (А) Начальные отложения H_2O_2 на внутренней поверхности стенки инфекционной нити. (Б) Сплошные отложения H_2O_2 на внутренней поверхности стенки инфекционной нити. (В) Полное пропитывание H_2O_2 стенки инфекционной нити. (Г) Появление H_2O_2 в матриксе инфекционных нитей и капель.

ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, черная звездочка — пероксид водорода.

При исследовании клубеньков *Pisum sativum* дикого типа была прослежена динамика накопления H_2O_2 и определены паттерны его распределения в различных зонах клубенька (рис. 2). Было продемонстрировано, что в меристеме и зоне инфекции накопление пероксида водорода происходит отдельными, немногочисленными каплями пергидроксида церия, располагающимися между плазматической мембраной и клеточной стенкой или стенкой инфекционной нити. В ранней зоне азотфиксации капли становились многочисленнее и мельче. С продвижением инфицированных клеток в зону азотфиксации клеточные стенки пропитываются мелкими кристаллами пергидроксида церия, которые становятся более многочисленными в зоне старения.

В клубеньках гороха дикого типа H_2O_2 был ассоциирован прежде всего со стенками инфекционных нитей и клеточными стенками, матриксом инфекционных нитей и капель, в то же время пероксид водорода не определялся в симбиосомах. Только в отдельных стареющих клетках наблюдалось накопление H_2O_2 вокруг деградирующих бактериоидов (рис. 2Г). Аналогичное распределение пероксида водорода в стареющих инфицированных клетках наблюдалось ранее в клубеньках люцерны, гороха,

сои, что подтверждает вовлечение H_2O_2 в процесс старения (Santos *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004).

Важную роль играет пероксид водорода в становлении и развитии защитных реакций растительных клеток при инфицировании ризобиями. Особенно яркое проявление защитных реакций с участием H_2O_2 было продемонстрировано для симбиотически неэффективных мутантов гороха (Цыганова и др., 2009).

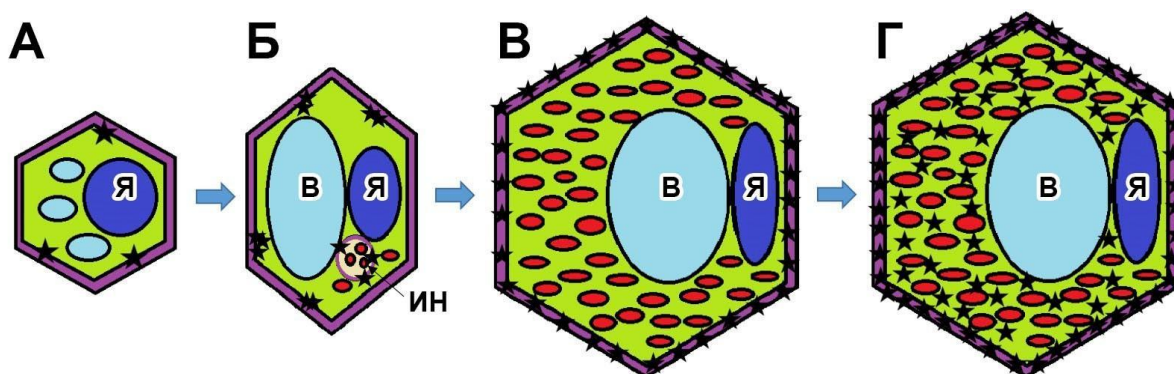


Рис. 2. Локализация H_2O_2 в клетках клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) дикого типа. (А) Появление H_2O_2 на внутренней поверхности клеточной стенки меристематических клеток. (Б) Отложения H_2O_2 в виде крупных капель на внутренней поверхности клеточной стенки и появление отложений пероксида водорода в стенке инфекционной нити в колонизированных клетках в зоне инфекции. (В) Появление мелких отложений H_2O_2 в толще клеточной стенки инфицированных клеток в зоне азотфиксации. (Г) Появление H_2O_2 в цитоплазме и вокруг дегенерирующих бактериоидов в стареющих инфицированных клетках в зоне старения. Я — ядро, В — вакуоль, ИН — инфекционная нить, черная звездочка — пероксид водорода

При изучении локализации и распределения пероксида водорода в клубеньках мутантов гороха по гену *Sym33*, характеризующихся утолщенными суберинизированными клеточными стенками и стенками инфекционных нитей (Ivanova *et al.*, 2015), а также наличием суберинизированного материала клеточной стенки в вакуоли, было продемонстрировано чрезмерное накопление пероксида водорода. Суберинизация является конечным процессом в детерминированных и высокодифференцированных растительных клетках. Макромолекулярная сборка полифенольных доменов при суберинизации происходит посредством H_2O_2 -зависимого процесса свободнорадикального связывания, опосредованного пероксидазой. H_2O_2 в клубеньках мутантов локализовался в виде мелких кристаллов пергидроксида церия в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей, а также в матриксе инфекционных нитей и инфекционных капель. Кроме того, были обнаружены везикулы, несущие материал клеточной стенки к плазматической мембране с кристаллами пергидроксида церия. Все это

может дополнительно свидетельствовать о развитых защитных реакциях у этих мутантов.

Для мутанта SGEFix⁻-1 (*sym40-1*) было характерно обильное накопление H₂O₂ в стенках инфекционных нитей, в матриксе гипертрофированных инфекционных капель, вокруг ювенильных бактериоидов и бактериоидов в мультибактероидных симбиосомах с формированием в дальнейшем аномальных бактериоидов (Цыганова и др., 2009). У мутанта Sprint-2Fix⁻ (*sym31*), характеризующегося недифференцированными бактериоидами, наблюдалось аномальное накопление мелких кристаллов пергидроксида церия в гетерохроматине ядра, чрезмерное накопление H₂O₂ в матриксе инфекционных нитей, а также вокруг деградирующих бактериоидов. Для мутанта RisFixV (*sym42*) было показано, что пероксид водорода накапливается вокруг преждевременно стареющих бактериоидов и в толще отложений каллозы в стенках инфекционных нитей и клеточных стенок. Такое аномальное распределение пероксида, вероятно, связано с активацией в этих мутантах сильных защитных реакций (Ivanova *et al.*, 2015). Отложение пероксида водорода вокруг бактериоидов наблюдалось и при обработке клубеньков различными тяжелыми металлами (Stambulska *et al.*, 2018).

Ранее было показано, что одним из возможных источников образования пероксида водорода в симбиотических клубеньках являются полиамины (путресцин, спермидин и спермин), которые служат субстратом для диаминооксидазы (ДАО) (Cona *et al.*, 2006). H₂O₂, генерируемый благодаря активности ДАО, может способствовать перекрестному связыванию гликопротеинов растительного матрикса инфекционных нитей, контролируя инфекцию ризобий (Wisniewski *et al.*, 2000).

Анализ локализации и распределения пероксида водорода в симбиотических клубеньках гороха, сформированных дефектными по биосинтезу полиаминов штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, показал, что, вероятно, некоторая часть H₂O₂ в клубеньках имеет бактериальное происхождение. Так в клубеньках, сформированных дефицитным по аргинину штаммом B918a-3841ArgC, количество преципитатов пергидроксида церия снижено как у линии дикого типа SGE, так и у мутанта SGEFix⁻-2 (*sym33-3*). Известно, что в растениях и бактериях существует путь образования путресцина из аргинина в реакции, катализируемой аргининдекарбоксилазой. Однако у ризобий основной путь синтеза путресцина происходит из орнитина с помощью орнитиндекарбоксилазы. Так у *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 в присутствии ингибитора орнитиндекарбоксилазы дифлуорметилорнитина уменьшался уровень путресцина и гомоспермидина на 95% и значительно снижался рост ризобий (Shaw *et al.*, 2010). В клубеньках *P. sativum*, инокулированных другим штаммом, дефи-

цитным по синтезу гомоспермидина B917-3841SpсВ, количество и распределение преципитатов пергидроксида церия не отличалось от такового при использовании эффективного штамма *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841.

Таким образом, выявлена динамика накопления пероксида водорода и определены закономерности ее локализации в различных зонах клубенька, на основании чего раскрыта роль пероксида водорода в росте инфекционной нити, связанном с увеличением жесткости стенки инфекционной нити, и в созревании клеточной стенки инфицированных клеток в процессе их дифференциации. Исследования, проведенные с использованием штаммов ризобий, дефицитных по синтезу полиамина (гомоспермидина) или его предшественника (аргинина), показали, что пероксид водорода, важный для формирования и функционирования симбиотических клубеньков, также может быть бактериального происхождения, а множественность путей синтеза полиамина предполагает взаимозаменяемость субстратов для образования пероксида водорода.

Работа финансово поддержана грантом РНФ 23-16-00090.

Библиографические ссылки

1. Bell E., Takeda S., Dolan L. Reactive oxygen species in growth and development // *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling* / Rio L. A., Puppo A. — Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. — P. 43-53.
2. Brewin N.J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis // *Critical Reviews in Plant Sciences*. — 2004. — V. 23, № 4. — P. 293-316.
3. Cárdenas L., Quinto C. Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors // *Plant Signaling & Behavior*. — 2008. — V. 3, № 12. — P. 1101-1102.
4. Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. Functions of amine oxidases in plant development and defence // *Trends in Plant Science*. — 2006. — V. 11, № 2. — P. 80-88.
5. Desikan R., Hancock J.T., Neill S.J. Oxidative stress signalling // *Plant Responses to Abiotic Stress* / Hirt H., Shinozaki K. — Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. — P. 121-149.
6. Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. 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. — V. 252, № 6. — P. 1505-1517.
7. Jamet A., Mandon K., Puppo A., Hérouart D. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis // *Journal of Bacteriology*. — 2007. — V. 189, № 23. — P. 8741-8745.
8. Matamoros M.A., Becana M. Redox control of the legume-Rhizobium symbiosis // *Advances in Botanical Research* / Frendo P. et al. Academic Press, 2020. — P. 67-96.
9. Matamoros M.A., Fernández-García N., Wienkoop S., Loscos J., Saiz A., Becana M. Mitochondria are an early target of oxidative modifications in senescing legume nodules // *New Phytologist*. — 2013. — V. 197, № 3. — P. 873-885.

10. Pauly N., Pucciariello C., Mandon K., Innocenti G., Jamet A., Baudouin E., Hérouart D., Frendo P., Puppo A. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume–*Rhizobium* symbiosis // *Journal of Experimental Botany*. — 2006. — V. 57, № 8. — P. 1769-1776.
11. Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M.M., De Felipe M.R., Harrison J., Vanacker H., Foyer C.H. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process // *New Phytologist*. — 2005. — V. 165, № 3. — P. 683-701.
12. Puppo A., Pauly N., Boscari A., Mandon K., Brouquisse R. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume–*Rhizobium* and mycorrhizal symbioses // *Antioxidants and Redox Signaling*. — 2013. — V. 18, № 16. — P. 2202-2219.
13. Rathbun E.A., Naldrett M.J., Brewin N.J. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2002. — V. 15, № 4. — P. 350-359.
14. Rubio M.C., James E.K., Clemente M.R., Bucciarelli B., Fedorova M., Vance C.P., Becana M. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2004. — V. 17, № 12. — P. 1294-1305.
15. Santos R., Hérouart D., Sigaud S., Touati D., Puppo A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 1. — P. 86-89.
16. Shaw F.L., Elliott K.A., Kinch L.N., Fuell C., Phillips M.A., Michael A.J. Evolution and multifarious horizontal transfer of an alternative biosynthetic pathway for the alternative polyamine *sym*-Homospermidine // *Journal of Biological Chemistry*. — 2010. — V. 285, № 19. — P. 14711-14723.
17. Stambulska U.Y., Bayliak M.M., Lushchak V.I. Chromium (VI) toxicity in legume plants: modulation effects of rhizobial symbiosis // *BioMed Research International*. — 2018. — V. 2018. — P. 8031213.
18. 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* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2000. — V. 13, № 4. — P. 413-420.
19. Цыганова А.В., Цыганов В.Е., Борисов А.Ю., Тихонович И.А., Бревин Н.Д. 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.