

РОЛЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ТИОЛОВ В ПРОЦЕССАХ ФОРМИРОВАНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СИМБИОТИЧЕСКОГО КЛУБЕНЬКА ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)

К.А. Иванова, О.А. Кулаева, П.Г. Кусакин, А.В. Цыганова, В.Е. Цыганов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия, *kivanova@arriam.ru*

Аннотация. Глутатион и его гомолог гомоглутатион – тиоловые трипептиды, различающиеся одной аминокислотой и участвующие в процессах развития и адаптации бобовых растений к стрессам. С использованием серии растительных симбиотических мутантов, иммунолокализации, ПЦР в реальном времени и хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим анализом, были выявлены некоторые закономерности локализации, синтеза и соотношений между тиолами в тканях симбиотических клубеньков и корней гороха.

Ключевые слова: бобово-ризобийный симбиоз, тиолы, глутатион, гомоглутатион

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-362-365

Пластичность растений обеспечивается их способностью воспринимать сигналы окружающей среды и, передавая их по скоординированным путям трансдукции, запускать соответствующие ответные реакции. Одним из таких трансдукторов является тиоловый трипептид глутатион (GSH), присутствующий в клетке в двух состояниях – восстановленном и окисленном. Вероятно, локальные изменения количества фитогормонов, связанные с программами развития и (или) влиянием окружающей среды, могут регулировать синтез GSH. Взаимодействуя с активными формами кислорода, изменяя редокс-состояние клетки и ее компартментов или тиол-дисульфидный статус белков, напрямую или косвенно GSH участвует в большинстве физиологических процессов, связанных с развитием растений, формированием новых органов, взаимодействием с симбиотическими микроорганизмами, защитными реакциями при патогенной атаке, адаптацией к абиотическим стрессам [Noctor et al., 2012]. Такой синергизм фитогормонов и окислительного стресса позволяет избежать нежелательного расхода энергии, отделяя защитные механизмы от процессов деления и дифференцировки клеток [May et al., 1998].

Симбиотический недетерминированный клубенек Бобовых является уникальной моделью, где можно проследить ход и взаимодействие всех этих процессов: дедифференцировка клеток внутренней коры корня, их митотическая реактивация, пролиферация клеток меристемы клубенька, дифференцировка инфицированных клеток, ассоциированная с повторяющимися раундами эндоредупликации, развитие защитных реакций и их подавление при совместимых взаимодействиях, необратимая дифференцировка бактерий под действием растительных факторов в особую, специализированную для фиксации атмосферного азота форму, – бактериоиды [Tsyganova et al., 2018; Ivanova et al., 2015]. В регулирование всех этих процессов, вероятно, вовлечен GSH, а также его гомолог – уникальный для семейства Бобовые трипептид гомоглутатион (hGSH). Несмотря на отличие всего лишь в одну аминокислоту, экспрессия генов биосинтеза этих тиолов по-разному регулируется в ответ на сигнальные молекулы или стрессовые условия, что может указывать на наличие у них различающихся функций [Clemente et al., 2012].

В рамках настоящей работы были выявлены некоторые закономерности локализации, синтеза и соотношения между тиолами в тканях симбиотических клубеньков и корней гороха посевного. Были использованы растения дикого типа SGE

на сроке 3 недели после инокуляции и линии гороха, мутантные по генам:

– *sym40* (ортолог гена *Medicago truncatula EFD*, регулирующего работу негативного регулятора цитокининового ответа в клубеньках). Клубеньки характеризуются образованием гипертрофированных инфекционных капель, неполной дифференцировкой бактериоидов и преждевременной деградацией симбиотических структур [Tsyganov et al., 1998; Nemankin, 2011].

– *sym33* (ортолог генов *M. truncatula IPD3* и *Lotus japonicus CYCLOPS*, кодирующих ключевой транскрипционный фактор, активирующий процесс органогенеза клубенька). В клубеньках не наблюдается выход бактерий в цитоплазму растительных клеток из «запертых» суберенизированных инфекционных нитей [Tsyganov et al., 1998; Ovchinnikova et al., 2011; Ivanova et al., 2015].

В клубеньках и неинокулированных корнях исследуемых линий была исследована экспрессия генов, кодирующих ферменты синтеза GSH и hGSH: *GSH1* (γ -глутамилцистеин синтетаза), *GSHS* (глутатион синтетаза) и *hGSHS* (гомоглутатион синтетаза). В клубеньках гороха дикого типа ген *GSHS* экспрессировался на более высоком уровне, чем ген *hGSHS*. В то же время, как в неинокулированных корнях, так и в клубеньках мутантных линий с «запертыми» инфекционными нитями, уровень экспрессии гена *hGSHS* был выше по сравнению с диким типом и мутантом по гену *sym40*. При этом было показано, что наибольший уровень экспрессии гена *GSHS* среди всех исследуемых генотипов был характерен для мутанта по гену *sym40*.

Далее был проведен количественный анализ содержания тиолов (тотальный пул) в клубеньках и неинокулированных корнях исследуемых линий методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим анализом, с использованием дитиотрейтола в качестве восстанавливающего агента. В клубеньках дикого типа концентрация GSH и отношение [GSH:hGSH] было максимальным среди исследуемых генотипов. Противоположные результаты были получены для неинокулированных корней – самые низкие уровни GSH и [GSH:hGSH]. У мутанта по гену *sym33-2* рост инфекционных нитей блокирован уже в коре клубенька, при этом уровень GSH был выше, чем в неинокулированных корнях, однако, его содержание и значение [GSH:hGSH] было самым низким среди клубеньков других генотипов. В то же время, уровень hGSH был сходным с уровнем этого тиола в клубеньках дикого типа. Другой аллельный мутант *sym33-3* проявляет нечетко выраженный (leaky) фенотип и выход бактерий в цитоплазму можно обнаружить в некоторых клетках [Voroshilova et al., 2001], однако, бактериоиды все равно остаются не дифференцированными. В клубеньках этого мутанта уровень GSH был довольно высоким, сопоставимым с таковым у дикого типа, но количество hGSH также увеличивалось, что приводило к уменьшению значения [GSH:hGSH]. У мутанта по гену *sym40* содержание GSH было ниже, чем у дикого типа и мутанта *sym33-3*, но при этом разница в количестве обоих тиолов была меньше, чем у дикого типа, но больше, чем у мутантов по гену *sym33*. Таким образом, каждый из исследуемых генотипов, проявляющий уникальный фенотип, демонстрировал свою композицию тиолов в клубеньках. Основным тиолом в клубеньках гороха дикого типа является GSH. Для формирования эффективного азотфиксирующего клубенька с растительными клетками, содержащими полностью дифференцированные бактериоиды, необходимо увеличение тотального пула как GSH, так и hGSH, однако, разница в содержании этих тиолов должна быть минимум 4-х кратной. Изменение значения [GSH:hGSH] по сравнению с неинокулированными корнями, вероятно, необходимо для дедифференцировки клеток внутренней коры корня, а увеличение количества GSH – для формирования апикальной меристемы клубенька и ее пролиферации, а также для дифференцировки инфицированных растительных клеток, ассоциированной с

повторяющимися раундами эндоредупликации, так как известно, что GSH напрямую вовлечен в регуляцию клеточного цикла [Vernoux et al., 2000; Pasternak et al., 2014]. Кроме того, высокий уровень тиолов в эффективных клубеньках может быть связан непосредственно с их антиоксидантными свойствами и процессом фиксации азота. Снижение количества обоих тиолов, как у мутанта по гену *sym40*, ассоциировано с быстрой инактивацией меристемы и отсутствием полностью дифференцированных растительных клеток, содержащих зрелые бактериоиды, с развитием окислительного стресса в клубеньках и преждевременной деградацией симбиотических структур. В клубеньках мутантов, заблокированных на более ранних стадиях, наблюдалось накопление hGSH и снижение значения [GSH:hGSH], что коррелировало с блоком нормального роста инфекционных нитей и подавлением инфекционного процесса. Таким образом, hGSH может быть вовлечен в регуляцию защитных реакций, проявляющихся при нарушении в программе развития симбиоза на стадии инфицирования клубенькового примордия и до начала работы продукта гена *Sym40*.

Методом иммунолокализации с использованием антител против восстановленной формы GSH в клубеньках дикого типа было показано присутствие метки в клетках меристемы, зоны инфекции и зоны азотфиксации, а также в клетках, содержащих гранулы крахмала. При этом во всех изученных вариантах наиболее интенсивный сигнал наблюдался вокруг ювенильных бактериоидов, что свидетельствует о важной роли GSH на стадии выхода бактерий из инфекционных капель в растительную клетку и в процессе их дальнейшей дифференцировки.

Таким образом, с использованием исходной линии SGE и полученных на ее основе мутантов, заблокированных на последовательных стадиях развития симбиотического клубенька, было продемонстрировано участие низкомолекулярных тиолов в процессах формирования и дифференцировки клубенька гороха.

Работа поддержана Российским научным фондом (17-76-30016) и Российским фондом фундаментальных исследований (16-34-60132_мол_а_дк).

Литература

Clemente M. R., Bustos-Sanmamed P., Loscos J., James E.K., Pérez-Rontomé C., Navascués J., Gay M., Becana M. Thiol synthetases of legumes: immunogold localization and differential gene regulation by phytohormones // *Journal of Experimental Botany*. – 2012. – V. 63, No. 10. – P. 3923–3934.

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, No. 6. – P. 1505–1517.

May M.J., Vernoux T., Leaver C., Montagu M. V., Inze D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development // *Journal of Experimental Botany*. – 1998. – V. 49, No. 321. – P. 649–667.

Nemankin N.F. Analysis of pea (*Pisum sativum* L.) genetic system, controlling development of arbuscular mycorrhiza and nitrogen-fixing symbiosis. – Dissertation Saint-Petersburg State University (in Russian), 2011.

Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y.I., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H. Glutathione in plants: an integrated overview // *Plant, Cell and Environment*. – 2012. – V. 35, No. 2. – P. 454–484.

Ovchinnikova E., Journet E.P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., et al. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* Spp // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2011. – V. 24, No. 11. – P. 1333–1344.

Pasternak T., Asard H., Potters G., Jansen M.A. The thiol compounds glutathione and homoglutathione differentially affect cell development in alfalfa (*Medicago sativa* L.) // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2014. – V. 74. – P. 16–23.

Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Molecular and General Genetics*. – 1998. – V. 259, No. 5. – P. 491–503.

Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Tsyganov V.E. Cell differentiation in nitrogen-fixing nodules hosting symbiosomes // *Functional Plant Biology*. – 2018. – V. 45, No. 2. – P. 47–57.

Vernoux T., Wilson R.C., Seeley K.A., Reichheld J.P., Muroy S., Brown S. et al. The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development // *The Plant Cell*. – 2000. – V. 12, No. 1. – P. 97–109.

Voroshilova V.A., Boesten B., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Prierer U.B. 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* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2001. – V. 14, No. 4. – P. 471–476.

THE ROLE OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT THIOLS IN SYMBIOTIC PEA NODULE DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION

K.A. Ivanova, O.A. Kulaeva, P.G. Kusakin, A.V. Tsyganova, V.E. Tsyganov

Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia, kivanova@arriam.ru

Abstract. Glutathione and its homologue homoglutathione are thiol tripeptides, which differ only in one amino acid and are involved in the development processes and adaptation to stress in Legumes. Using a series of plant symbiotic mutants, immunolocalization, real-time PCR and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, some patterns of localization, synthesis, and ratio of thiols in the tissues of symbiotic pea root nodules were revealed.

Keywords: *Rhizobium-legume symbiosis, thiols, glutathione, homoglutathione*