

УДК 576.8.094.7+581.138.1

ГИПОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС И ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕРИБАКТЕРОИДНОЙ МЕМБРАНЫ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВ

© 2011 г. В. В. Крылова, С. Ф. Измайлов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276

e-mail: nitrogenexchange@mail.ru

Поступила в редакцию 03.08.2009 г.

При действии гипоксического стресса на корневую систему бобов (*Vicia faba* L.) происходило снижение функционирования на перибактероидной мембране клубеньков H^+ -АТФазы и опосредованного через нее транспорта дикарбоксилатов (малат и сукцинат) — основных углеродсодержащих метаболитов, участвующих в энергообеспечении бактериоидов, что приводило к смене типов взаимоотношений партнеров симбиоза от мутуализма к комменсализму и за счет этого возрастающей доминанте эукариот над прокариотами.

Азотфиксирующие корневые клубеньки бобовых приспособлены к недостатку кислорода в окружающей среде, и необходимые микроаэрофильные условия для работы нитрогеназы создаются за счет поддержания парциального давления кислорода в бактериоидсодержащей ткани на наномолярном уровне, что обеспечивается барьерными функциями коры и наличием леггемоглобина в цитозоле клеток [1–3]. Кислород, связываясь с леггемоглобином, передается симбиосомам (бактероидам), где и используется для их энергетических нужд, в том числе и для самого процесса фиксации азота [4]. Однако длительное действие гипоксии вызывает ингибирование азотфиксирующей активности бактериоидов [5, 6] вследствие того, что продукт нитратного дыхания — NO блокирует кислородтранспортную функцию леггемоглобина и активность нитрогеназы [7, 8]. Параллельно при остром дефиците кислорода в среде происходит значительное закисление цитоплазмы эукариота вследствие увеличения концентрации протонов [9], развивается энергетический голод бактериоидов из-за ослабленного импорта восстановленных углеродсодержащих метаболитов и уменьшается синтез АТФ в дыхательной цепи бактериоидов, что предполагает нарушение бобово-ризобияльных взаимоотношений на уровне функционирования транспортных систем перибактероидной мембраны (ПБМ). Среди них важную роль играет идентифицированная и функционально охарактеризованная на ПБМ H^+ -АТФаза Р-типа, участвующая в энергизации мембраны, регулировании рН перибактероидного пространства (ПБП), а также в обмене метаболитами и ионами между партнерами симбиоза [10–12]. В связи с этим вопрос о том, насколько стабильным и взаимосвязанным в условиях действия гипоксии остается функционирование транспортных систем ПБМ представляется актуальным не толь-

ко с точки зрения понимания особенностей взаимоотношения про- и эукариот, но и устойчивости всей азотфиксирующей системы.

Цель работы — изучение транспорта малата, сукцината и глутамата через ПБМ, а также функционирования H^+ -АТФазы ПБМ симбиосом клубеньков при затоплении корневой системы бобов.

МЕТОДИКА

Использовали бобы *Vicia faba* L., сорт Русские черные, инокулированные эффективным штаммом *Rhizobium leguminosarum* 501, любезно предоставленным доктором А. Классен (Латвийский сельскохозяйственный университет). Растения выращивали, как описано ранее [13]. Гипоксию создавали, затопляя растения в сосудах на 3–5 см водой над поверхностью песка, в котором они выращивались. Время экспозиции составляло 12, 21, 48, 72 и 120 ч.

Фракцию симбиосом с интактной ПБМ выделяли из клубеньков бобов по разработанному в лаборатории методу путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности перкола [14].

Активность H^+ -АТФазы ПБМ определяли спектрофотометрически (Specol М-40, Германия) по регистрации АТФ-зависимой генерации градиента рН (ΔpH) и мембранного потенциала ($\Delta \psi$) на ПБМ, используя проникающий ΔpH -индикатор акридиновый оранжевый (АО) и чувствительный к изменению потенциала $\Delta \psi$ -зонд оксонол VI, при 492 или 590 нм соответственно [15, 16].

Критерием транспорта метаболитов через ПБМ служило их действие на АТФ-зависимое закисление ПБП, а также на закисление в бескальевой среде инкубации, регистрируемое спектрофотометрически с применением АО. Величину этого изменения оценивали по начальной скорости закисления ПБП

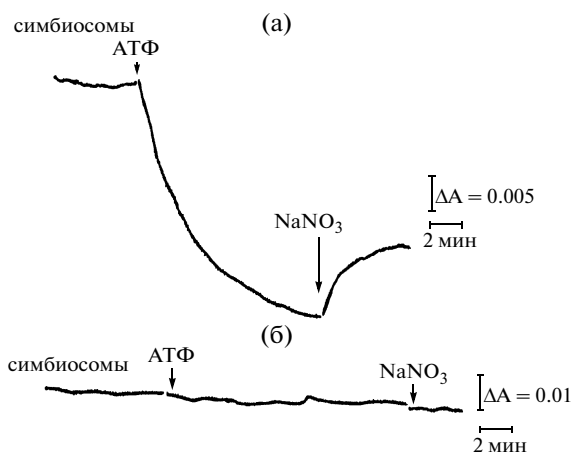


Рис. 1. Кинетика спектральных изменений оксонола VI, вызванных АТФ-зависимой энергизацией ПБМ симбиосом зрелых клубеньков контрольных растений (а) и подвергнутых действию гипоксии 72 ч (б). Симбиосомы суспендировали в основной среде инкубации, рН 6.5, содержащей оксонол VI и 2 мМ MgSO₄. Стрелками указано добавление 2 мМ АТФ и 20 мМ NaNO₃.

и выражали в оптических единицах на мг белка симбиосом в минуту (ОЕ/мг белка мин).

С целью большей достоверности получаемых результатов при изучении транспорта метаболитов через ПБМ использовали другой методический подход — измерение интенсивности светорассеяния суспензии симбиосом в результате их осмотического набухания или сжатия при внесении исследуемых метаболитов в среду инкубации. Регистрацию также осуществляли спектрофотометрически при 550 нм в двухлучевом режиме [17].

Белок определяли по методу Бредфорд. При регистрации изменения интенсивности светорассеяния симбиосом его концентрация в пробах составляла 100–150 мкг, а в остальных случаях — 50–70 мкг.

Основная среда инкубации содержала 0.4 М сорбит, 20 мМ Нерес-бис-трис-пропан (БТП) (рН 6.5 или 7.0) и 16 мкМ АО или 4 мкМ оксонол VI. Концентрации остальных компонентов, вносимых в инкубационную смесь, указаны в подписях к рисункам. Использовали: сорбит — “Calbiochem” (США); БТП, Нерес, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (СССР), валиномицин — “Sigma” (США); ЭГТА, MES, АТФ, АО, малат, сукцинат, глутамат — “Serva” (Германия), оксонол VI — “Molecular Probes” (США); катион тетрафенилфосфония (ТФФ) — “Fluka” (Швейцария). Остальные реактивы отечественного производства квалификации х.ч..

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных рис. 1а, у растений, не подвергнутых действию стресса, за счет функциониро-

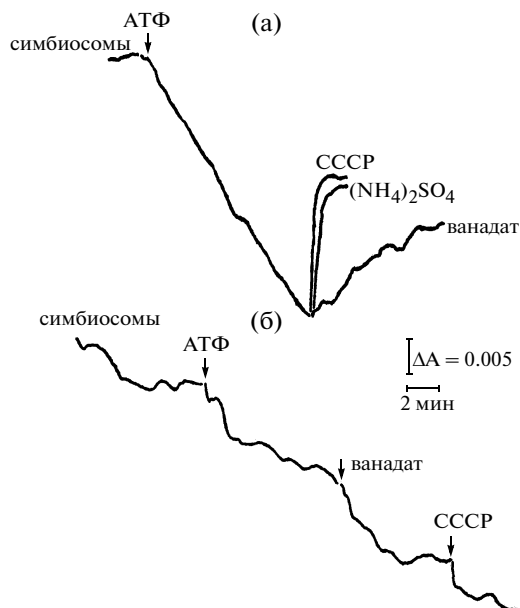


Рис. 2. Кинетика АТФ-зависимого закисления ПБМ симбиосом контрольных растений (а) и подвергнутых действию гипоксии 120 ч (б). Симбиосомы суспендировали в основной среде инкубации, рН 6.5, содержащей АО, 2 мМ MgSO₄, 30 мМ КСl. Стрелками указано добавление 2 мМ АТФ, 2 мкМ СССР, 80 мкМ ванадата и 10 мМ (NH₄)₂SO₄.

вания H⁺-АТФазы на ПБМ создавался мембранный потенциал (Δψ). О его создании на ПБМ свидетельствовало регистрируемое изменение оптического поглощения Δψ-индикатора оксонола VI и сброс Δψ проникающим анионом NO₃⁻. При действии на растения гипоксии в течение 48 ч генерация H⁺-АТФазой Δψ на ПБМ резко падала, а через 72 ч уже отсутствовала (рис. 1б).

Изменение абсорбции проникающего индикатора АО при добавлении Mg²⁺-АТФ в инкубационную среду, содержащую симбиосомы из зрелых, активно фиксирующих азот клубеньков, вызывало закисление ПБП вследствие создания локализованной на ПБМ H⁺-АТФазой градиента рН (рис. 2а). Градиент рН быстро диссипировался при добавлении в среду инкубации (NH₄)₂SO₄, протонофора СССР, а также ванадата — ингибитора АТФаз Р-типа. Абсорбция АО оставалась практически неизменной на протяжении всего времени регистрации, когда в среду инкубации симбиосом не вводили какие-либо компоненты. Это свидетельствовало об отсутствии текучести ПБМ для протонов. В случае действия гипоксии спектральный сдвиг абсорбции АО к 120 ч не был связан с активностью H⁺-АТФазы, о чем говорит отсутствие сброса градиента рН при добавлении (NH₄)₂SO₄ и СССР, а также ингибирования помпы ванадатом (рис. 2б).

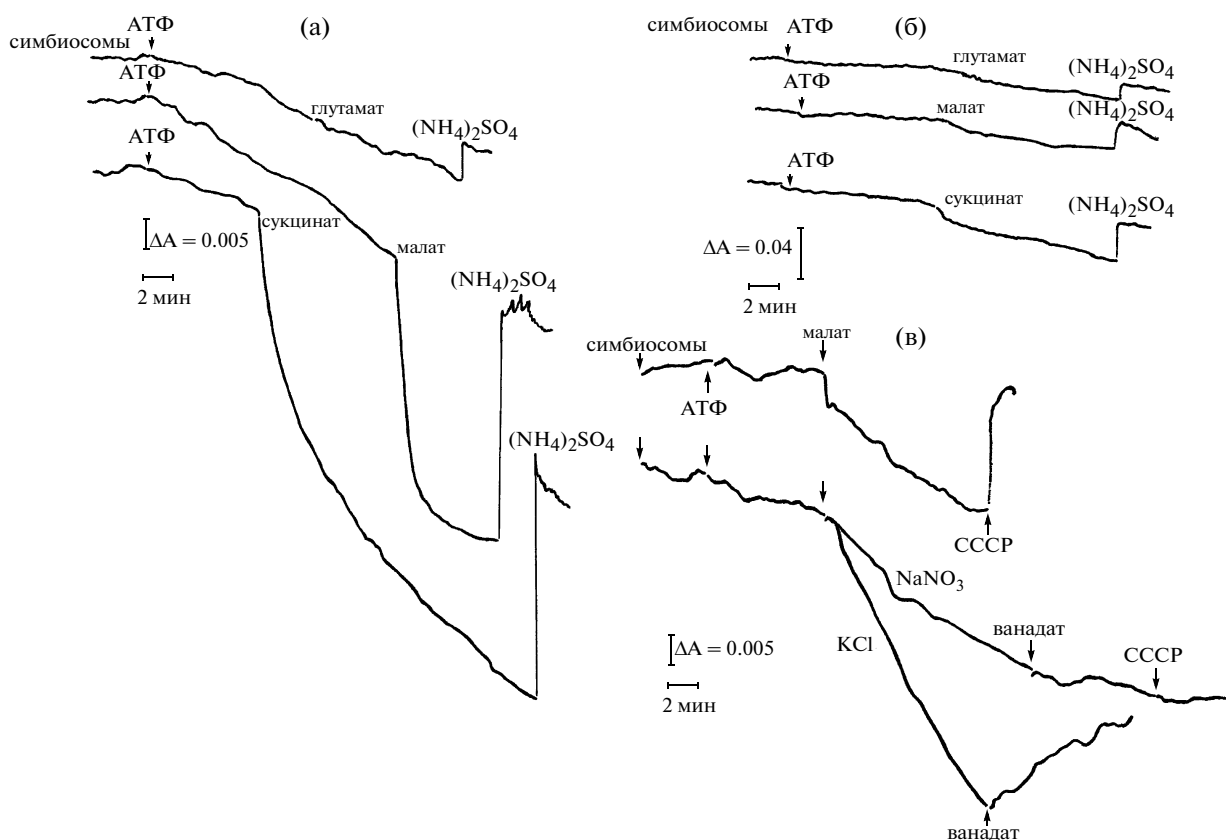


Рис. 3. Действие малата, сукцината, глутамата и анионов Cl^- и NO_3^- на величину АТФ-зависимого закисления ПБП симбиосом клубеньков контрольных растений (а, в) и подвергнутых действию гипоксии 72 ч (б). Симбиосомы суспендировали в среде инкубации, рН 7.0, содержащей АО, 2 мМ MgSO_4 , 30 мМ KCl (а, б), и в бескальциевой среде (в). Стрелками указано добавление 2 мМ АТФ, 10 мМ малата, сукцината, глутамата, 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 мМ NaNO_3 , 2 мкМ CCCP , 100 мкМ ванадата, 30 мМ KCl .

Изучение транспорта метаболитов через ПБМ симбиосом контрольных растений по регистрации их действия на АТФ-зависимое закисление ПБП показало, что малат и сукцинат резко стимулировали генерацию ΔpH на ПБМ симбиосом (рис. 3а). Генерация градиента рН при добавлении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ не наблюдалась. Глутамат не изменял АТФ-зависимое закисление ПБП. В условиях действия на растения гипоксии регистрировали некоторое увеличение АТФ-зависимого закисления ПБП при добавлении в среду инкубации как малата, сукцината, так и глутамата, однако скорость транспорта дикарбоксилатов по сравнению с контрольными растениями снижалась (рис. 3б).

Ускорение дикарбоксилатами АТФ-зависимой генерации градиента рН у контрольных бобов имело кинетику аналогичную действию противоионов Cl^- , NO_3^- , увеличивающих АТФ-зависимое закисление ПБП (рис. 3в). Как известно, транспорт дикарбоксилатов в симбиосомы является потенциалзависимым и связан с генерацией положительного потенциала

на внутренней стороне ПБМ [11, 12]. Закисление ПБП наблюдалось как при переносе дикарбоксилата, так и за счет конверсии $\Delta\psi$ электрохимического градиента протонов, генерируемого H^+ -АТФазой в ΔpH , что и наблюдали в случае добавки анионов Cl^- или NO_3^- .

Изучение динамики описанных выше процессов (рис. 4) в течение 120 ч действия гипоксии показало, что в течение 12 ч скорость АТФ-зависимой генерации градиента рН на ПБМ по сравнению с таковой для растений, не подвергнутых стрессу (0.17 ОЕ/мг белка мин) снижалась в 2 раза и сохранялась на этом уровне до 21 ч. Затем происходило менее резкое падение скорости переноса протонов через ПБМ: через 48 ч — до 30%, а через 72 ч — до 10% от начальной скорости.

Действие малата и сукцината на генерацию АТФ-зависимого градиента рН ПБМ у контрольных растений выявило достаточно высокую скорость их транспорта через мембрану — до 1.0 ОЕ/мг белка мин (рис. 4). В условиях действия гипоксии

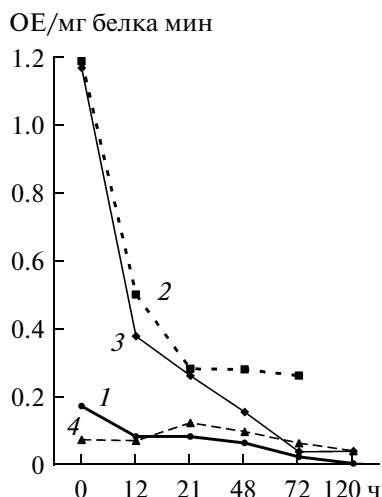


Рис. 4. Скорость АТФ-зависимого переноса протонов и метаболитов через ПБМ корневых клубеньков бобов при действии гипоксии 12–120 ч. 1 – H^+ -АТФаза, 2 – сукцинат, 3 – малат, 4 – глутамат. Представлены среднearифметические значения измерений, выполненных на различных препаратах симбиосом из одной партии растений и повторенных 3–6 раз.

скорость транспорта малата падала до 0.3 ОЕ/мг белка мин, о чем можно судить по изменению скорости АТФ-зависимого закисления ПБП за период действия 12 ч гипоксии (рис. 4). Затем до 21 ч перенос малата снижался еще в 2 раза и далее резко падал. После 72 ч транспорт малата практически уже отсутствовал. Скорость транспорта сукцината также стремительно уменьшалась до 21 ч, оставаясь практически постоянной с 21 до 72 ч действия стресса. Это может быть связано с тем, что в сукцинате бактериоды испытывают большую потребность, чем в малате как основном дыхательном суб-

страте для *Rhizobium leguminosarum* [18]. При наличии в среде инкубации симбиосом глутамата на протяжении всего периода действия гипоксии на растения наблюдалось снижение рН в ПБП. Можно отметить в данном случае лишь некоторое увеличение закисления ПБП после 21 ч действия гипоксии. Однако скорость поступления глутамата в симбиосомы до 21 ч была гораздо ниже, чем для малата и сукцината. После 48 ч скорость транспорта глутамата была уже сопоставима с таковой для малата (рис. 4). Это свидетельствует о возможном его поступлении в симбиосомы на уровне пассивного транспорта по градиенту концентрации.

Транспорт метаболитов изучался также с использованием другого методического подхода – по их действию на пассивное закисление ПБП. Как видно на рис. 5а, добавление малата и сукцината в бескальциевую среду инкубации симбиосом, полученных из контрольных растений, стимулировало процесс пассивного закисления ПБП. Наблюдаемая кинетика изменения абсорбции АО объяснялась тем, что первоначальное закисление ПБП происходило благодаря формированию на ПБМ отрицательного диффузионного потенциала, связанного с выходом из симбиосом ионов K^+ , что, в свою очередь, вызывало импорт в ПБП протонов. По достижении стационарного уровня отрицательный потенциал вновь генерировался на ПБМ за счет входа анионов дикарбоксилатов. Это вызывало новую волну поступления H^+ и дальнейшее закисление ПБП. Генерация градиента рН при добавлении $(NH_4)_2SO_4$ отсутствовала. Кинетика изменения абсорбции АО, наблюдаемая при добавлении глутамата, который при данном значении рН среды также находится в виде аниона, имела иной характер. Глутамат не вызывал закисления ПБП.

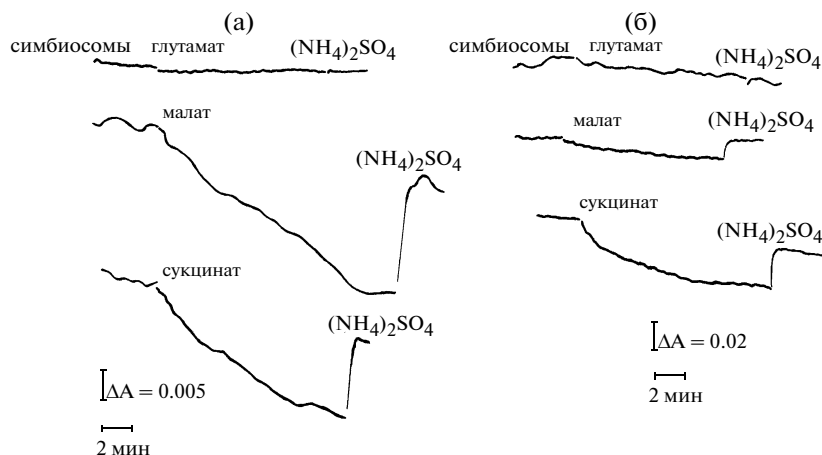


Рис. 5. Кинетика пассивного закисления ПБП симбиосом контрольных растений (а) и подвергнутых действию гипоксии 72 ч (б). Симбиосомы суспендировали в бескальциевой среде инкубации рН 6.5, содержащей АО. Стрелками указано добавление 10 мМ малата, сукцината, глутамата и 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$.

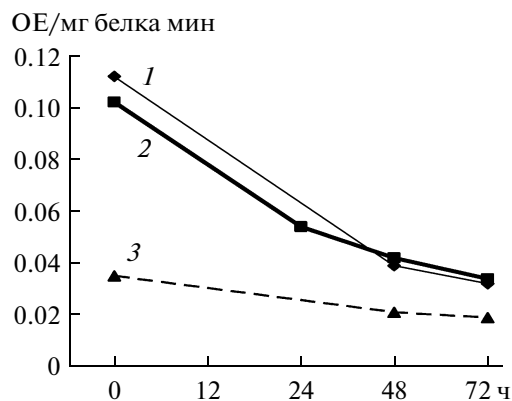


Рис. 6. Скорость изменения интенсивности светорассеяния суспензии симбиосом контрольных растений и подвергнутых действию гипоксии 12–72 ч, вызванного добавлением 10 мМ малата (1), сукцината (2) и глутамата (3). Представлены среднеарифметические значения измерений, выполненных на различных препаратах симбиосом из одной партии растений и повторенных 3–5 раз.

В условиях гипоксии действие дикарбоксилатов на пассивное закисление ПБП симбиосом в бескальевой среде становилось менее интенсивным, о чем свидетельствовали более пологие кинетические кривые по сравнению с таковыми, полученными на симбиосомах из клубеньков контрольного варианта. Действие глутамата было аналогично малату и сукцинату (рис. 5б).

Расчеты начальной скорости транспорта метаболитов показали, что она была на порядок ниже (0.1 OE/мг белка мин), чем скорость их транспорта на фоне генерации мембранного потенциала H^+ -АТФазой ПБМ у растений, не подвергнутых стрессу. Она оставалась на этом уровне в течение 72 ч действия гипоксии, а затем снижалась еще в 2 раза, что говорит о частичном сохранении проницаемости ПБМ в отношении ионов K^+ и H^+ . Как видим, использование данного подхода позволило выявить вторую составляющую общего транспорта метаболитов через ПБМ, связанную с K^+ -диффузионным потенциалом, но она оказалась менее значимой, чем зависящая от мембранного потенциала.

Об этом же говорят и данные, полученные при изучении пассивного транспорта метаболитов с использованием третьего методического подхода — спектрофотометрической регистрации изменения интенсивности светорассеяния суспензии симбиосом в результате их сжатия или набухания под действием метаболитов и K^+ [17]. В подвергнутых стрессу растениях скорость проникновения малата и сукцината ПБМ через 72 ч действия гипоксии уменьшалась в 3 раза (с 0.11 до 0.03 OE/мг белка мин),

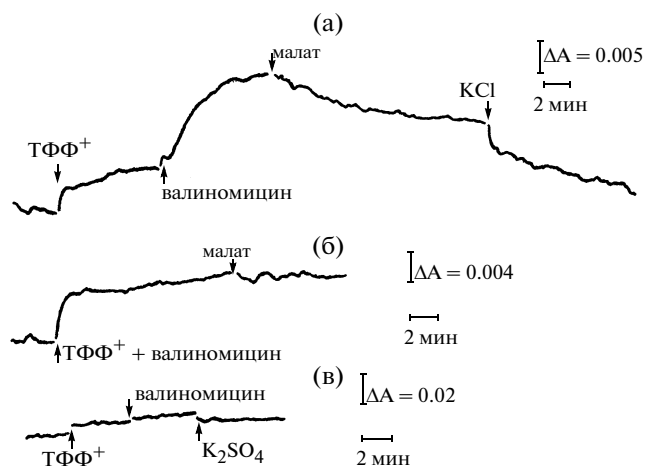


Рис. 7. Кинетика изменения интенсивности светорассеяния суспензии симбиосом контрольных растений (а) и подвергнутых действию 48 ч гипоксии (б, в) в бескальевой среде инкубации, обусловленного действием на них мембраноактивных соединений. Стрелками указано добавление 10 мМ малата, 30 мМ КСl или K_2SO_4 , 1 мМ ТФФ⁺, 2 мкМ валиномицина.

а глутамата — постепенно при несколько более низком уровне процесса (рис. 6).

Интенсивность светорассеяния суспензии симбиосом регистрировали и по выходу K^+ в бескальевую среду инкубации вследствие деполаризации ПБМ после внесения липофильного катиона — ТФФ. С помощью этого мембраноактивного соединения моделировали осмотическое сжатие симбиосом, вызывая увеличение интенсивности светорассеяния симбиосом. Существенное увеличение процесса происходило при последующем добавлении K^+ -ионофора валиномицина, повышающего проницаемость ПБМ для K^+ . Оказалось, что у растений контрольного варианта внесение в среду ТФФ и валиномицина заметно увеличивало интенсивность светорассеяния. Последующее добавление малата, а также сукцината приводило к ее заметному снижению, т.е. осмотическому набуханию (рис. 7а). В присутствии глутамата интенсивность светорассеяния симбиосом оставалась практически неизменной. В препаратах симбиосом растений, подвергнутых действию гипоксии, интенсивность светорассеяния изменялась слабо на добавление мембрано-активных соединений, метаболитов (рис. 7б) и K_2SO_4 (рис. 7в).

Таким образом, использование трех различных методических подходов позволило заключить, что при действии на растения гипоксии происходило снижение активности H^+ -АТФазы ПБМ, падение как опосредованной через нее, так и зависимой от K^+ -диффузионного потенциала, транслокации дикарбоксилатов к бактериоидам. Это, в конечном счете, приводило к нарушению рН- и осмотического баланса симбиосом.

В связи с приведенными результатами исследований заслуживают упоминания данные литературы об общих изменениях метаболизма растений, подвергнутых действию гипоксии. Речь идет об ослаблении активного фотосинтеза и, прежде всего, задержке накопления дикарбоксилатов, снижении их транспорта в корневую систему и интенсификации гликолитических процессов при одновременной редукции цикла трикарбоновых кислот [19, 20]. Совокупность указанных процессов следует рассматривать, как первую фазу в изменении метаболизма, дистанционно влияющую на функционирование азотфиксирующих бактерий в клубеньках. Вторая, по существу ключевая фаза, связанная с доступностью субстратов, необходимых для азотфиксации в бактероидах, всецело зависит от особенностей функционирования ПБМ и ее транспортных систем. Протонная помпа ПБМ координирует и облегчает обмен малата и NH_4^+ между растением и бактериоидом, что помогает поддерживать рН-баланс в ПБП [12]. Последнее важно для стабильности симбиоза, т.к. чрезмерное закисление ПБП может ингибировать азотфиксацию, что приводит к раннему старению инфицированных клеток [21].

Полученные в работе результаты по уменьшению скорости генерации на ПБМ градиента рН и мембранного потенциала у растений под действием гипоксии указывают на снижение активности электрогенного протонного насоса, что приводит к закислению ПБП. На этом фоне падение динамики транспорта дикарбоксилатов к бактериоидам приводит к уменьшению интенсивности азотфиксации и образованию NH_4^+ в ПБП. Изменение рН-статуса ПБП и цитозоля инфицированной клетки, в свою очередь, может активировать локализованные в этом компартменте литические ферменты – протеазы, липазы, кислые фосфатазы, α , β -глюкозидазы, которые при длительном действии стрессора вызывают сначала структурные изменения в организации симбиотической системы, а далее – лизис бактериоидов. Симбиосома в результате всего наделяется функцией вторичной лизосомы [22]. Такого рода, неспецифические реакции, происходящие на уровне взаимодействия симбионтов через ПБМ и ПБП при действии гипоксии, как и при старении клубеньков [23], способствуют возрастающей доминанте растения-хозяина над микросимбионтом и качественной перестройке отношений от состояния мутуализма к комменсализму.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-01118).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Igamberdiev A.U., Hill R.D.* // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. № 408. P. 2473–2482.
2. *Downie J.A.* // Current Biology. 2005. V. 15. № 6. P. 196–198.
3. *White J., Prell E., Poole P.* // Plant Physiol. 2007. V. 144. № 2. P. 604–614.
4. *Топунов А.Ф., Розов Ф.Н., Петрова Н.Э.* // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 6. С. 935–941.
5. *Андреева И.Н., Сварадж К., Козлова Г.И., Райхман Л.А.* // Физиология растений. 1987. Т. 34. № 3. С. 528–536.
6. *Trinchant J.C., Rigaud J.* Nitrogen Fixation: Hundred Years After / Ed. B. Bruijn. Stuttgart–New York: Gustav Fischer, 1988. 565 p.
7. *Dordas C., Rivoal J., Hill R.D.* // Ann. Botany. 2003. V. 91. № 2. P. 173–178.
8. *Meakin G.E., Bueno E., Jepson B., Bedmar E.J., Richardson D.J., Delopdo M.J.* // Microbiology. 2007. V. 153. № 2. P. 411–419.
9. *Cardenas L., Holdaway-Clarce T.L., Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G., Hepler P.K.* // Plant Physiol. 2000. V. 123. № 2. P. 443–451.
10. *Дуброво П.Н., Крылова В.В., Ливанова Г.И., Жизневская Г.Я., Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 1992. Т. 39. № 3. С. 503–513.
11. *Andreev I., Dubrovo P., Krylova V., Andreeva I., Koren'kov V., Sorokin E., Izmailov S.* // J. Plant Physiol. 1997. V. 151. № 5. P. 563–569.
12. *Udvardi M.K., Day D.A.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V. 48. P. 493–523.
13. *Крылова В.В., Дуброво П.Н., Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 2. С. 209–216.
14. *Измайлов С.Ф., Радюкина Р.Л., Агибетов К.А., Кадьров Р.М., Андреева И.Н., Федорова Е.Э., Жизневская Г.Я.* // Физиология растений. 1989. Т. 36. № 2. С. 309–317.
15. *Palmgren M.G.* // Anal. Biochem. 1991. V. 192. № 2. P. 316–321.
16. *Appel H.-J., Bersh B.* // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 903. № 3. P. 480–494.
17. *Андреев И.М., Крылова В.В., Дуброво П.Н., Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 1. С. 80–85.
18. *Glenn A.R., Poole P.S., Hudman J.F.* // J. Gen. Microbiol. 1980. V. 119. № 1. P. 267–271.
19. *Ricard B., Couee I., Raymond P., Saglio P.H., Saint-Ges V., Pradet A.* // Plant Physiol. Biochem. 1994. V. 32. № 1. P. 1–10.
20. *Ладыгин В.Г.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 2. С. 246–258.
21. *Brewin N.J.* // Ann. Rev. Cell Biol. 1991. V. 7. P. 191–226.
22. *Андреева И.Н., Кожаринова Г.М., Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 1. С. 117–130.
23. *Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 1996. Т. 43. № 5. С. 773–791.

Hypoxic Stress and the Transport Systems of the Peribacteroid Membrane of Bean Root Nodules

V. V. Krylova and S. F. Izmailov

Timiryazev Research Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

e-mail: nitrogenexchange@mail.ru

Received August 3, 2009

Abstract—When the roots of *Vicia faba* L. beans were subjected to hypoxic stress, the activity of H⁺-ATPase on the peribacteroid membrane, as well as the transport of dicarboxylates (malate and succinate) mediated by this enzyme, decreased. Since malate and succinate are the main carbon-containing metabolites involved in the energy supply to bacteroids, this caused a change of the relation type from mutualism to commensalism, and the domination of the eukaryote over the prokaryote consequently increased.