

Санкт-Петербургский государственный университет

Киричек Евгений Андреевич

**Анализ фенотипических проявлений мутаций в симбиотическом гене гороха *Sym40*,
кодирующем ключевой регулятор развития азотфиксирующего клубенька**

Выпускная квалификационная работа
по направлению подготовки 060301
основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

Работа выполнена в лаборатории молекулярной и клеточной биологии
ФБГНУ ВНИИСХМ

Научные руководители:
профессор кафедры микробиологии СПбГУ
д. б. н. Пиневич Александр Васильевич

заведующий лабораторией
д. б. н. Цыганов Виктор Евгеньевич

Санкт-Петербург

2019

Оглавление

Список сокращений	4
Глава 1. Введение.....	5
Глава 2. Обзор литературы: Бобово-ризобиальный симбиоз как пример эффективных ассоциаций организмов в природе	7
2.1. Особенности ризобий в качестве объекта исследований	7
2.1.1. Общая характеристика представителей семейства <i>Rhizobiaceae</i>	7
2.1.2. Механизм работы нитрогеназы	8
2.2. Образование симбиотического клубенька	9
2.2.1. Влияние Nod-факторов на специфичность симбиоза	9
2.2.2. Ключевые этапы сигнального каскада инфекции	11
2.2.3. Инфекционный процесс и органогенез клубенька	12
2.2.4. Типы онтогенеза клубенька	15
2.2.5. Симбиотический процесс и мутации, приводящие к его нарушению	16
2.3. Роль фитогормонов в процессе образования клубенька	17
2.3.1. Цитокинины	18
2.3.2. Ауксин	18
2.3.3. Абсцизовая кислота	19
2.3.4. Другие фитогормоны.....	20
2.4. Процессы, протекающие в клубеньке	21
2.4.1. Ассимиляция аммония	21
2.4.2. Механизмы защиты нитрогеназы	21
2.5. Горох посевной как объект изучения бобово-ризобиального симбиоза	23
2.5.1. Общая характеристика	23
2.5.2. Ген <i>EFD</i> , кодирующий ключевой регулятор процесса клубенькообразования	23
2.5.3. Ген <i>Sym40</i> — ортолог гена <i>EFD</i> у <i>Pisum sativum</i>	24
Глава 3. Материалы и методы.....	26
3.1. Объекты исследования.....	26
3.2. Условия культивирования штаммов <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	27
3.3. Методика выделения бактерий из клубеньков	27
3.4. Состав питательного раствора без азота	27
3.5. Условия выращивания растений и инокуляция	28
3.6. Условия выращивания растений в сосудах с почвой	28

3.7. Условия выращивания растений в стерильных контейнерах	29
3.8. Условия выращивания растений при исследовании влияния температуры на клубенькообразование	30
3.9. Методика анализа гистологической структуры клубеньков с использованием тонких срезов	30
3.10. Методика анализа гистологической структуры клубеньков с использованием полутонких срезов	32
3.11. Методика выращивания и обработки растений синтетическим аналогом цитокининов	33
3.12. Методика иммулокализации абсцизовой кислоты	34
Глава 4. Результаты и обсуждение	35
4.1. Обоснование выбора модели для исследования	35
4.2. Анализ штаммов различного географического происхождения	35
4.3. Анализ клубенькообразования при выращивании опытных образцов в различных типах почв	38
4.4. Анализ эффективных изолятов ризобий	39
4.5. Анализ влияния температуры на клубенькообразование	42
4.6. Анализ влияния обработки синтетическим цитокинином на проявление мутантного фенотипа	44
4.7. Иммулокализация абсцизовой кислоты	45
Выводы	52
Список литературы	53

Список сокращений

АБК — абсцизовая кислота

БАП — 6-бензиламинопурин

ВКСМ — Ведомственная коллекция полезных микроорганизмов
сельскохозяйственного назначения

AcBSA — ацелированный бычий сывороточный альбумин

BSA — бычий сывороточный альбумин

Глава 1. Введение

На сегодняшний день одним из основных компонентов интенсивного земледелия является применение минеральных удобрений. Однако их широкое использование наносит серьезный урон окружающей среде (Mahanty *et al.*, 2016). Также производство минеральных удобрений является энергоемким, поэтому в последние десятилетия активно развивается «адаптивное», «устойчивое» (от англ. sustainable) сельское хозяйство, направленное на производство экологически чистой продукции (Lal, 2008; Conway, Barbier, 2013; Altieri, 2018). Большой интерес в развитии адаптивного сельского хозяйства может представлять широкое использование генетических ресурсов микроорганизмов (Tikhonovich, Provorov, 2011).

При развитии симбиотических отношений между растениями и микроорганизмами наблюдается интеграция геномов макро- и микросимбионтов, что значительно повышает адаптационный потенциал растений (Тихонович и др., 2015). Бобово-ризобияльный симбиоз является одной из наиболее перспективных растительно-микробных систем для использования в адаптивном сельском хозяйстве (Tikhonovich, Provorov, 2011; de Vries, Bardgett, 2012; Rubiales, Mikic, 2015; Stagnari *et al.*, 2017).

Наиболее распространенный тип бобово-ризобияльного симбиоза формируется в результате взаимодействия α -протеобактерий, принадлежащих к порядку *Rhizobiales* (Kuykendall, 2015a), с представителями семейства *Fabaceae* (Brewin, 1991). Эти взаимоотношения являются очень продуктивными для растений, которые получают большое количество фиксированного атмосферного азота. Некоторые зернобобовые культуры, например, люцерна посевная (*Medicago sativa* L.), потенциально способны получать за сезон до 550 кг азота (Provorov, Tikhonovich, 2003). Успешность азотфиксации обеспечивается в результате развития на корнях бобовых растений специализированного органа — симбиотического клубенька, в котором создаются оптимальные условия для функционирования основного фермента фиксации азота — нитрогеназы (Oldroyd, 2013).

Наряду с огромной значимостью для сельского хозяйства данный тип симбиотических взаимоотношений представляет собой очень ценную модель для изучения различных аспектов функционирования эукариотической клетки, поскольку симбиотический клубенек является факультативным органом для растения; соответственно, возможно получение и изучение проявлений различных мутаций, нарушающих его развитие.

В настоящее время выявлено большое количество генов, контролирующих развитие и функционирование симбиотического клубенька (Цыганов, 2018). Тем не менее, многие аспекты работы этих генов остаются недостаточно изученными.

Таким образом, целью данной работы являлось изучение фенотипических проявлений мутаций в симбиотическом гене гороха *Sym40*, играющем важную роль в процессах развития клубенька.

Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Провести поиски штаммов, супрессирующих фенотипические проявления мутаций по гену гороха *PsSym40*.

1.1. Проанализировать способность серии эффективных штаммов различного географического происхождения *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* из Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) формировать клубеньки на исходной линии SGE и мутантных линиях SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) и SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*) и провести анализ фенотипа формируемых клубеньков.

1.2. Проанализировать клубенькообразование у мутантных линий SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) и SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*), выращенных в почвах различного географического происхождения.

1.3. Проанализировать способность серии изолятов *R. leguminosarum*, супрессирующих симбиотические мутации гороха *Pssym26* и *Pssym27*, формировать клубеньки на мутантных линиях SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) и SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*).

2. Проанализировать температурозависимость проявления мутантных фенотипов у линий гороха SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) и SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*).

3. Проанализировать влияние синтетического аналога цитокинина (БАП) на проявление мутантного фенотипа у линии гороха SGEFix⁻¹ (*sym40-1*).

4. Провести иммунолокализацию стрессового гормона — абсцизовой кислоты в симбиотических клубеньках гороха линии дикого типа SGE и мутантной линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*).

Глава 2. Обзор литературы: Бобово-ризобиальный симбиоз как пример эффективных ассоциаций организмов в природе

2.1. Особенности ризобий в качестве объекта исследований

2.1.1. Общая характеристика представителей семейства *Rhizobiaceae*

Семейство *Rhizobiaceae* (Conn 1938; цит. по Kuykendall, 2015b) принадлежит к порядку *Rhizobiales* в классе *α-Proteobacteria*. В настоящее время, согласно Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, к данному семейству относят шесть родов: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer* и *Sinorhizobium* (Kuykendall, 2015b). Таксономия ризобий основана на анализе последовательности генов 16S рРНК, а также фенотипических признаков. Стоит отметить, что в настоящее время существуют разногласия в научном сообществе относительно количества родов в семействе и положения различных представителей в рамках этих родов (Alves *et al.*, 2013; Mousavi *et al.*, 2015; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2015).

Типовым родом семейства является *Rhizobium* (Frank 1889; цит. по Kuykendall *et al.*, 2015).

Бактерии семейства *Rhizobiaceae* являются фенотипически гетерогенными, преимущественно аэробными и грамотрицательными. Клеточная оболочка имеет характерную для грамотрицательных бактерий архитектуру, состоит из трех слоев: наружной мембраны, слоя пептидогликана и внутренней мембраны. Ризобии — гетеротрофы с окислительным типом метаболизма (Spaink *et al.*, 1998).

Представители семейства, как правило, имеют большие геномы (до 10,5 млн. п.о.), которые у растущих бактерий разделены на несколько репликонов. Например, *Sinorhizobium meliloti* — эндосимбионт *Medicago* spp., имеет хромосому размером 3,654 млн. п.о. и две мегаплазмиды: pSymA и pSymB (1,354 и 1,683 млн. п.о., соответственно), которые несут большинство генов, необходимых для установления симбиотических взаимоотношений с хозяином (MacLean *et al.*, 2007). Помимо этого, многие штаммы содержат вспомогательные плазмиды среднего размера; таким образом, геном *S. meliloti* может содержать до 9000 генов.

Эндосимбионт гороха посевного (*Pisum sativum* L.) — *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* — несет хромосому (5,057 млн. п.о.) и шесть плазмид: pRL12, pRL11, pRL10, pRL9, pRL7, pRL8 (870 тыс. п.о., 684 тыс. п.о., 488 тыс. п.о., 352 тыс. п.о., 151 тыс. п.о., 147 тыс. п.о., соответственно) (MacLean *et al.*, 2007).

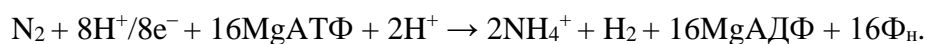
Многие представители семейства (например, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) несут комплекс генов *nifHDK*, кодирующий ключевой фермент биологического восстановления азота — нитрогеназу, а также ряд других *nif*-генов, определяющих образование кофакторов и регулирующих биосинтез фермента. Организация *nif*-генов сильно варьирует даже в пределах родов. Так, у одних представителей эти гены располагаются на плаزمидах, в то время как у других – в хромосомах. Большинство быстрорастущих ризобий не фиксируют азот в свободноживущем состоянии, и их *nif*-гены активируются лишь в симбиозе с растениями.

Как отмечалось ранее, специфичность различных штаммов ризобий и их растений-хозяев определяется генами, располагающимися на мегаплазмидах. Этот факт был подтвержден многочисленными опытами по перенесению плазмид из одних штаммов ризобий в другие (Тихонович, Проворов, 2009). Внехромосомное расположение симбиотических генов является общей тенденцией для многих мутуалистических микросимбиотнов, оно также характерно для генов вирулентности у патогенов (Adams *et al.*, 2014)).

2.1.2. Механизм работы нитрогеназы

Основным ферментом, обеспечивающим diazotрофию, является нитрогеназа. Субстратом для нитрогеназы служит молекулярный азот, который восстанавливается до двух молекул аммиака. Разрыв тройной связи N₂, одной из самых прочных в природе, требует сложного взаимодействия металлопротеиновых компонентов. Процесс diazотрофии является очень энергозатратным, за один цикл потребляется энергия, освобождающаяся при гидролизе 16 молекул АТФ. Также для реакции необходим сильный восстановитель; такими восстановителями обычно являются ферредоксин или флаводоксин.

Суммарное уравнение реакции:



Нитрогеназа представлена тремя формами: основной и альтернативными (Пиневич, 2007).

Молибденовая нитрогеназа является наиболее изученной, она кодируется генами *nif*. Восстановление субстрата Мо-нитрогеназой осуществляется при формировании комплекса,

состоящего из двух металлопротеинов. Редуктаза динитрогеназы NifH (также называемая Fe-белком), представляет собой гомодимер с массой приблизительно 60 кДа с сайтом для связывания MgATФ в каждой субъединице и одним [Fe₄S₄]-кластером. Она передает электроны, полученные от восстановителей, ко второму компоненту нитрогеназного комплекса – динитрогеназе NifDK (также называемой MoFe-белок). MoFe-белок представляет собой $\alpha_2\beta_2$ -тетрамер с массой около 250 кДа, содержащий два комплексных металлокофактора: [Fe₈S₇] (P-кластер) и [MoFe₇S₉] (M-кластер). P-кластер вовлечен в передачу электронов для M-кластера, в котором происходит фиксация азота.

При отсутствии в среде молибдена некоторые свободноживущие азотфиксаторы используют ванадий-содержащую нитрогеназу, содержащую кластер [VFe₇S₉]. При отсутствии в среде и молибдена, и ванадия — железо-содержащую нитрогеназу (Пиневич, 2007).

2.2. Образование симбиотического клубенька

2.2.1. Влияние Nod-факторов на специфичность симбиоза

Взаимодействие ризобий с *Fabaceae* ведет к формированию нового органа — симбиотического клубенька, являющегося уникальной экологической нишей для данных микроорганизмов. Залог формирования эффективного симбиоза – обмен молекулярными сигналами между партнерами (Oldroyd, 2013; Suzaki, Kawaguchi, 2014; Zipfel, Oldroyd, 2017).

Образование симбиотических клубеньков индуцируется специфическими липохитоолигосахаридами, называемыми Nod-факторами, которые продуцируются и секретируются ризобиями в ответ на флавоноиды представителей семейства *Fabaceae* (Fliegmann, Vono, 2015). Липохитоолигосахаридами обычно состоят из трех-пяти остатков N-ацетилглюкозамина с β 1-4 связями, несущих на нередуцирующем конце жирную кислоту и разнообразные радикалы в различных позициях углеводного скелета (Spaink *et al.*, 1991). Биосинтез подобных соединений – уникальное свойство, характерное только для ризобий (рис. 1). За образование таких сложных по структуре молекул отвечает целый ряд бактериальных генов: *nodA*, *nodB* и *nodC* обеспечивают синтез коровой части Nod-фактора; *nodE*, *nodF* и *nodG* отвечают за синтез жирнокислотного остатка, а большое число других генов (*nod*, *noe*, *nol* — «гены хозяйской специфичности») позволяют модифицировать хитоолигосахаридный остов различными способами.

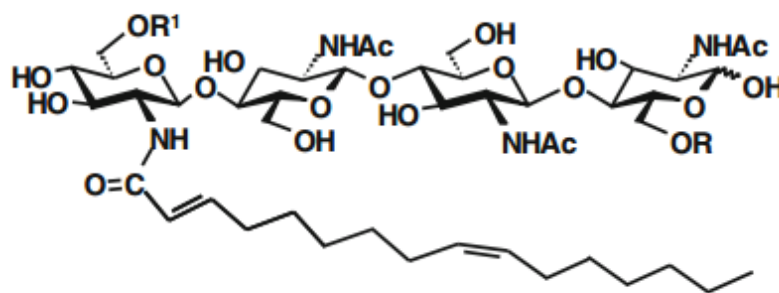


Рис. 1. Химическая структура основного Nod-фактора NodSm-IV, продуцируемого *Sinorhizobium meliloti*:

R — SO_3^- , R₁ — ацетил; жирнокислотный радикал — C16:2Δ2E,9Z (Fliegmann, Bono, 2015)

Активаторами транскрипции *nod*-генов являются белки NodD, которые воспринимают растительные сигналы. NodD выполняют двойную функцию, являясь одновременно сенсором сигналов и активатором транскрипции генов, содержащих *nod*-box (Schlaman *et al.*, 1992). Такая двойственность функций определяется тесной связью между сенсорным доменом С-конца и ДНК-связывающим доменом на N-конце молекулы.

Различные виды *Fabaceae* выделяют характерный спектр флавоноидных соединений, а белки NodD из разных видов ризобий преимущественно распознают определенные флавоноиды. Продукты разных *nodD*-генов по-разному отвечают на флавоноиды, и даже у одного штамма могут иметь различную способность к взаимодействию с ними. Таким образом определяется специфичность симбиоза (Brewin, 1991; Ермилова, 2012).

Поскольку многие почвенные штаммы ризобий обладают невысокой эффективностью, взаимодействующее с ними растение не может полностью реализовать свой потенциал продуктивности (Spaink *et al.*, 1998). Такой эффект был показан в работах по изучению накопления биомассы растением и эффективности фиксации азота в клубеньках (Yang *et al.*, 2017).

В дополнение к избирательности заражения на уровне вида растения обладают способностью ограничивать образование клубеньков на уровне штамма ризобий. Одним из первых выявленных случаев ограниченного клубенькообразования было взаимодействие европейских штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* с некоторыми генотипами гороха из Афганистана (Lie, 1976). Большинство европейских штаммов не вступает с ними в симбиоз, тогда как штамм из Ближнего Востока — ТОМ, штамм из Ленинградской области — А1, а

также ряд штаммов из Дании образуют эффективный симбиоз (Lie, 1976; Четкова, Тихонович, 1986; Nash *et al.*, 1988).

Встречаются и противоположные ситуации: существуют штаммы с широкой хозяйской специфичностью, например, NRG234. Данный штамм способен формировать клубеньки на растениях 112 родов семейства *Fabaceae* и на не бобовом растении *Parasponia andersonii* Planch. (Evans *et al.*, 1993).

Наряду с уже упомянутыми генами клубенькообразования ризобий для успешного формирования симбиоза необходимы гены, вовлеченные в формирование бактериальной клеточной поверхности, такие как гены, определяющие биосинтез экзополисахаридов (*exo* гены), липополисахаридов (*lps* гены), капсульных полисахаридов, или К-антигенов, и β -1,2(1,3)-глюканов (*ndv* гены). Продукты экспрессии этих генов помогают бактериям адаптироваться к симбиотическому существованию и не вызывают защитных реакций со стороны растения. Неудивительно, что соответствующие мутации в различной степени нарушают инфекционный процесс (Цыганова, Цыганов, 2012).

Важную роль играют и бактериальные системы секреции. Показано, что T3SS (Секнезависимая система секреции III типа) формирует белковый комплекс, который пронизывает внешнюю и внутреннюю мембраны бактерии и мембрану клетки-хозяина, позволяя секретировать ризобияльные белки непосредственно в цитоплазму растения (Цыганова, Цыганов, 2012).

2.2.2. Ключевые этапы сигнального каскада инфекции

Важно отметить, что древнейший симбиоз наземных растений с арбускулярно-микоризными грибами также индуцируется липохитоолигосахаридными сигнальными молекулами.

Nod-факторы связываются рецептор-подобными киназами с LysM доменами, формирующими между собой гетеромерные комплексы. Так, у лядвенца японского (*Lotus japonicus* L.) рецепторный комплекс состоит из NFR1 и NFR5, а у *M. truncatula* — LYK3 и NFP (Oldroyd, 2013). У другого модельного объекта, *P. sativum*, за распознавание редуцирующего конца молекулы Nod-фактора отвечает пара SYM10/SYM2, а за распознавание нередуцирующего — SYM10/SYM37 (Zhukov *et al.*, 2008). Существуют доказательства того, что один из рецепторных белков, участвующих в инициации симбиоза, SYM10, имеет неактивный киназный домен. Высказано предположение, что в клетках

присутствует неизвестный пока компонент рецепторного комплекса, обеспечивающий проведение сигнала. Возможно, этим компонентом является киназа K1 (Kirienko *et al.*, 2018). Другим рецептором, участвующим в восприятии Nod-факторов, является SYMRK у *L. japonicus*, содержащим лейцин-богатые повторы (DMI2 у *Medicago*) (Pan *et al.*, 2018).

С помощью еще не до конца выявленных компонентов сигнального пути, активируемого Nod-факторами, сигнал передается от рецепторов в плазматической мембране к ядру. В восприятии сигнала в ядре участвуют нуклеопорины, катионные калиевые каналы DMI1 у *M. truncatula* или CASTOR и POLLUX *L. japonicus*, расположенные в ядерной оболочке, а также кальциевые каналы CNGC15 и кальциевая АТФаза MCA8 (рис. 2). В результате происходит активация осцилляций ионов кальция. Изменения концентрации Ca^{2+} в ядре активируют кальций-кальмодулинзависимую протеинкиназу CCaMK, которая, являясь распределителем сигналов, запускает транскрипцию генов, участвующих в формировании и развитии клубенька (Oldroyd *et al.*, 2011; Zipfel, Oldroyd, 2017).

ССаМК может связывать кальций непосредственно через домен спираль–петля–спираль или косвенно через домен, связывающий кальмодулин. В отсутствие кальция ССаМК остается автоингибированной. Связывание кальция ведет к автофосфорилированию ССаМК (Miller *et al.*, 2013).

Основными субстратами для ССАМК являются транскрипционные факторы CYCLOPS у *L. japonicus* или IPD3 у *Medicago* (Messinese *et al.*, 2007). Фосфорилирование этих факторов достаточно для образования клубенька (Singh *et al.*, 2014), однако известно, что CYCLOPS является компонентом гораздо более обширной регуляторной системы и связан с белками DELLA. Белки DELLA играют огромную роль в развитии растений, а их участие в симбиозе обеспечивает контроль этого процесса растительным гормоном гибберелином (Jin *et al.*, 2016).

Помимо этого, CYCLOPS может входить в состав комплекса с содержащими GRAS-домен факторами транскрипции NSP1, NSP2, необходимыми для экспрессии генов симбиоза.

2.2.3. Инфекционный процесс и органогенез клубенька

Бобово-ризобиальный симбиоз имеет длительную эволюционную историю. Предполагается, что менее специфический симбиоз, когда ризобии проникали в корни через разрывы эпидермы при формировании боковых корней (в настоящее время наблюдается у ряда представителей семейства *Fabaceae*, например арахиса *Arachis hypogaea* L. и водного

бобового *Neptunia*) развился до более специфического взаимодействия с регулируемой колонизацией ризобиями корней растения через инфекционные нити и образованием клубенька независимого от боковых корней (Oldroyd, 2013).

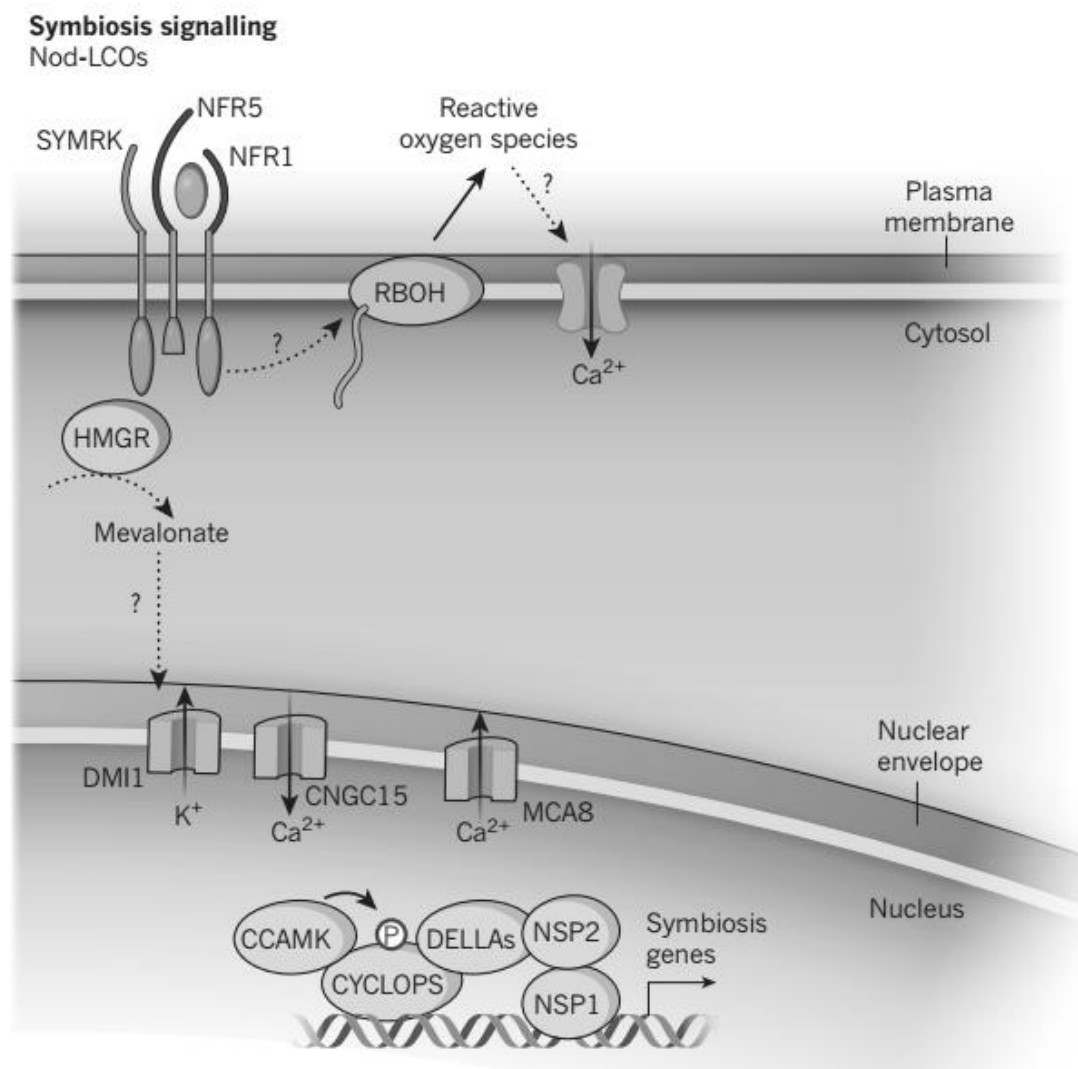


Рис. 2. Сигнальный путь индукции развития симбиотического клубенька
(по Zipfel, Oldroyd, 2017, с изменениями)

Процесс бактериальной инфекции начинается с прикрепления ризобий к поверхности корневого волоска. Поначалу прикрепление является слабым, обратимым и неспецифичным. В этом процессе участвуют растительные лектины, бактериальный белок рикадгезин и полисахариды бактериальной поверхности. На следующем этапе связывание становится тесным и необратимым, происходит это за счет образования бактериальных целлюлозных фибрилл (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

Действие Nod-факторов приводят к реорганизации элементов цитоскелета, сопровождаемой деформацией корневых волосков, переориентацией их роста, и в дальнейшем к характерному скручиванию волоска в форме «ручки зонтика». Внутри скручивания формируется инфекционный карман (камера). Вероятно, захват ризобий в закрытый карман необходим для локальной деградациии клеточной стенки, не вызывающей разрушения клетки хозяина (Ridge, Rolfe, 1985). Бактерии, захваченные корневыми волосками, продолжают делиться и формируют микроколонию. Из кармана ризобии перемещаются внутрь корневых волосков с помощью специальной трубчатой структуры растительного происхождения, называемой инфекционной нитью (Brewin, 1991). Инфекционная нить окружена клеточной стенкой и заполнена матриксом, состоящим из растительных арабиногалактанпротеинов-экстензинов, целлюлаз, различных пектинов и пролинбогатых белков, а также компонентов бактериального происхождения (Brewin, 2004; Цыганова, Цыганов, 2012).

Наряду с инфекцией корневого волоска сигнальный путь, активируемый Nod-факторами, приводит к реактивации делений клеток в перицикле и внутренней коре корня. В результате делений формируется примордий клубенька.

Когда инфекционная нить достигает примордия клубенька, бактерии высвобождаются в местах истончения клеточной стенки, называемых инфекционными каплями, но остаются окруженными плазматической мембраной растительной клетки. Эта мембрана приобретает специальные функции, регулирующие обмен метаболитов между бактериальными клетками и цитоплазмой хозяина. В процессе перехода в клетки хозяина ризобии теряют капсулу из поверхностных полисахаридов (Spaink *et al.*, 1998). Высвобожденные бактерии дифференцируются в специфические формы, называемые бактериоидами, увеличиваясь в размерах и изменяя форму из палочковидной в плейоморфную (Brewin, 1991; Maróti, Kondorosi, 2014). Бактероид, окруженный мембраной растительного происхождения — симбиосомной мембраной, называется симбиосомой. Симбиосомная мембрана не ассоциирована с клеточной стенкой хозяина, зато тесно контактирует с поверхностью клеток ризобий.

Цитоплазма фиксирующей азот клетки растения содержит около 50000 бактериоидов, при этом ее объем может превышать таковой у диплоидной меристематической клетки в 80 раз (Maróti, Kondorosi, 2014). Значительное увеличение объема инфицированной клетки сопровождается повторными раундами эндоредупликации.

Предполагается, что развитие азотофиксирующих симбиосом после выхода бактерий в клетки клубенька представляет собой процесс, включающий несколько стадий, каждая из которых контролируется различными генами растений (Vasse *et al.*, 1990; Tsyganov *et al.*, 2003). Для ряда представителей семейства *Fabaceae* было показано присутствие цистеинбогатых пептидов (NCR пептидов), сходных с дефензинами. NCR пептиды приводят необратимой дифференцировке бактериоидов (Van de Velde *et al.*, 2010).

Дифференцировка бактерий напоминает регулируемый процесс адаптации к симбиосомной среде, который, как считается, носит стрессовый характер (Spaink *et al.*, 1998). Постепенно в результате такого адаптационного процесса формируется зрелый, активно азотфиксирующий бактериоид, полностью перешедший в органеллоподобное состояние и утративший способность к возобновлению свободноживущего роста (Tsyganov *et al.*, 2003).

2.2.4. Типы онтогенеза клубенька

В процессе развития симбиоза число зараженных клеток хозяина постоянно увеличивается. Это происходит двумя путями, вследствие чего клубеньки делят на детерминированные и недетерминированные.

В недетерминированных клубеньках меристема функционирует на протяжении длительного времени, и бактерии в результате продолжающегося роста инфекционных нитей колонизируют новые клетки хозяина. В результате недетерминированные клубеньки приобретают характерную вытянутую форму. Бактериоиды в этих клубеньках окружены симбиосомной мембраной индивидуально и, в отличие от детерминированных, никогда не собраны в группы. Недетерминированные клубеньки можно встретить у гороха, клевера, люцерны.

Деления клеток недетерминированного клубенька ведут к образованию нескольких гистологических зон (рис. 3). Меристема (зона I) функционирует в клубеньках длительное время. За ней следует зона инфекции (зона II), в которой клетки дифференцируются и увеличиваются в размерах. В этой зоне происходит контакт с инфекционными нитями, образуются инфекционные капли, бактерии высвобождаются и начинают колонизировать клетки хозяина, при этом инициируется их дифференцировка в бактериоиды. Переходная, или интерзона (зона II–III), представлена одним-тремя слоями клеток, заполненных амилопластами, в клетках начинается активный синтез леггемоглобина. Зона азотфиксации (зона III) является самой обширной, она заполнена крупными дифференцированными

клетками, содержащими большое количество симбиосом. Бактероиды этой зоны значительно отличаются по размерам от бактерий, цитоплазма в них просветлена, и они часто имеют плейоморфную форму. По мере функционирования клубенька в базальной области формируется зона старения (зона IV). В этой зоне происходит деградация симбиотических структур, бактериоиды теряют свою гетерогенность цитоплазмы и постепенно лизируются (Vasse *et al.*, 1990).

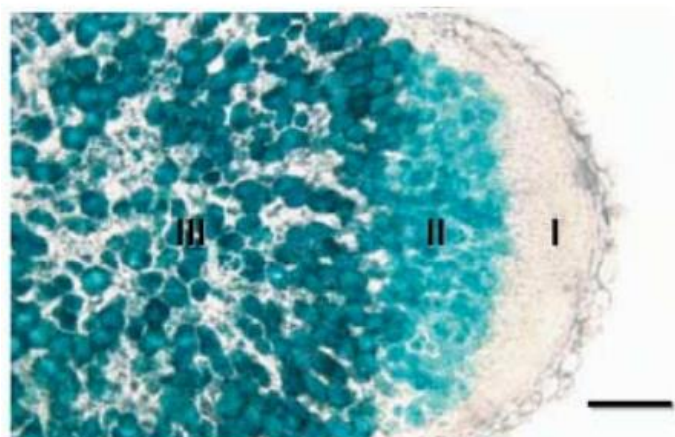


Рис. 3. Гистологические зоны клубенька линии SGE:
I — зона меристемы, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации.
Масштабная линейка 0,4 мм (по Tsyganov *et al.*, 2003, с изменениями)

В детерминированных клубеньках меристематическая активность временна и индуцируется только в наружной коре, а бактерии распространяются путем деления уже инфицированных клеток. Клубенек имеет правильную шарообразную форму (Brewin, 1991; Ferguson *et al.*, 2010). Они характерны для сои, вигны и лядвенца.

2.2.5. Симбиотический процесс и мутации, приводящие к его нарушению

Симбиотические взаимодействия между партнерами на ранних стадиях развития клубеньков имеют много общего с патогенезом (Vasse *et al.*, 1993). Однако в норме защитные реакции растения выражены не так ярко, как при патогенном заражении, уровень синтеза защитных компонентов ниже, что приводит не к инактивации микроорганизмов, а к ограничению инфекции и локализации симбионтов в конкретных компартментах клеток хозяина (Тихонович, Проворов, 2009). Слишком сильные защитные реакции хозяина приводят к несовместимости симбиотических партнеров. Арест инфекции на разных этапах

формирования симбиотического клубенька был описан для многочисленных растительных и бактериальных мутантов (Szczyglowski *et al.*, 1998; Tsyganov *et al.*, 2002; Vedam *et al.*, 2004; Ivanova *et al.*, 2015).

Растительные мутанты, неспособные формировать клубеньки (фенотип Nod^- — характеризуется рецессивным проявлением, за редким исключением) или неспособные к симбиотической фиксации азота (фенотип Fix^- — характеризуется как доминантным, так и рецессивным проявлением), отбирают по угнетенному росту на безазотной среде (Тиханович, Проворов, 2009).

Анализ таких мутантов позволил установить очередность расположения генов, контролирующих различные этапы клубенькообразования, а также последовательность стадий подпрограмм развития клубенька. Известно, что в процессе образования симбиоза параллельно реализуются две подпрограммы: определяется судьба бактерий и происходит гистогенез клубенька. В реализации указанных подпрограмм могут принимать участие одни и те же гены, но на разных этапах их роль неодинакова (Tsyganov *et al.*, 2002).

2.3. Роль фитогормонов в процессе образования клубенька

Формирование инфекционной нити и органогенез клубеньков в значительной степени контролируются макросимбионтом, но зависит от условий окружающей среды и физиологического состояния растений-хозяев. Важную роль во взаимодействии растений с окружающей средой играют фитогормоны, поэтому неудивительно, что в бобово-ризобийном симбиозе сигнальные пути с участием фитогормонов активно вовлечены в регуляцию клубенькообразования.

Эксперименты с обработками корней различными экзогенными фитогормонами (аналогами ауксина) указывают на то, что клетки-основательницы боковых корней характеризуются пластичностью процессов развития и способны дифференцироваться в зависимости от градиента этих гормонов. Программы развития клубеньков и боковых корней у бобовых сходны на начальных этапах, оба органа возникают в результате реактивации дифференцировки клеток и их последующих делений. Такое сходство может быть обосновано эволюционным родством двух процессов.

Различные физиологические и генетические данные говорят о том, что изменения в балансе фитогормонов под действием *Nod*-факторов представляют необходимое условие для нормального развития симбиоза (Ferguson, Mathesius, 2014). Ризобии способны

синтезировать различные гормоны, которые влияют на эффективность симбиоза, однако не имеют прямого действия на сам процесс образования клубеньков (Kisiala *et al.*, 2013).

2.3.1. Цитокинины

Исследования по установлению роли цитокининов в процессе образования клубеньков начались в 70-е годы прошлого века. Было показано, что синтетический аналог цитокининов — 6-бенззиламинопурин (БАП) — стимулирует образование клубенькоподобных структур на корнях бобовых растений (Libbenga, Harkes, 1973).

Как уже было указано ранее, к синтезу цитокининов способны как растения, так и бактерии. У ризобий выявлены гены биосинтеза этого гормона, гомологичные растительным (Costacurta, Vanderleyden, 1995). Однако никакой корреляции между эффективностью заражения растения-хозяина различными штаммами ризобий, способными продуцировать цитокинины, выявить не удалось (Kisiala *et al.*, 2013).

Мутанты по генам рецептора к цитокининам MtCRE1 у *M. truncatula* и LjLHK1 у *L. japonicus* были неспособны формировать клубеньки, в них также наблюдался блок развития инфекционных нитей (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). Поэтому в настоящее время считается, что синтез и активация цитокининов происходят в корнях растений в ответ на инокуляцию ризобиями, цитокинины позитивно регулируют органогенез клубенька и негативно — инфекцию.

Предполагается, что влияние цитокининов на процесс клубенькообразования связан с регуляцией ауксинов через белки семейства PIN (транспортеры ауксина) (Plet *et al.*, 2011). Это приводит к накоплению ауксина в клетках коры корня на начальных стадиях формирования клубенька.

2.3.2. Ауксин

В меристеме корня ауксины необходимы для поддержания меристематической активности клеток (Медведев, 2012).

Ауксин накапливается в местах закладки клубеньковых примордиев, что свидетельствует о непосредственном влиянии гормона на этот процесс. Экзогенная обработка корней ауксином ингибирует образование клубеньков, как и обработка корней ингибитором действия ауксина (van Noorden *et al.*, 2006). В то же время в других

экспериментах были получены противоположные данные, обработка ингибитором полярного транспорта ауксина, наоборот, приводила к формированию клубенькоподобных структур (Rightmyer, Long, 2011). Скорее всего, потребность в ауксине лежит в пределах определенного концентрационного окна, а также зависит от стадии развития клубенька, от наличия и восприятия других растительных гормонов, с которыми взаимодействует ауксин.

Появление клубеньков невозможно без создания максимумов концентрации ауксина в клетках, формирующих примордии. Создание таких максимумов зависит от Nod-факторов и активации цитокининового ответа в растениях, но по-разному контролируется у различных представителей *Fabaceae*, формирующих клубеньки детерминированного (регуляция биосинтеза ауксинов) и недетерминированного (контроль транспорта ауксинов с участием флавоноидов) типа.

У растений с недетерминированным типом клубеньков, таких как горох или клевер, сигнальный путь под влиянием Nod-факторов стимулирует рецептор к цитокининам MtCRE1/LjLHK1, что влияет на образование флавоноидов (экспрессируются гены, контролирующие биосинтез этих соединений). В свою очередь, флавоноиды оказывают влияние на белки-переносчики PIN, что приводит к ингибированию транспорта ауксинов. В результате локального накопления ауксинов в местах закладки клубеньков стимулируется пролиферация клеток перицикла, эндодермы и коры, дающих начало клубеньку (Долгих и др., 2016).

2.3.3. Абсцизовая кислота

Основными процессами в растениях, регулируемые абсцизовой кислотой (АБК), являются поддержание состояния покоя и активация ранних этапов прорастания семян, закрытие устьиц, а также ответные реакции на такие стрессы, как холод, засоление и засуха (Медведев, 2012).

Экзогенная обработка АБК различных видов бобовых растений показала, что этот фитогормон блокирует скручивание корневых волосков и рост инфекционных нитей, а также подавляет формирование клубеньков, ингибирует деления клеток коры корня (Suzuki *et al.*, 2004).

АБК влияет на осцилляции ионов кальция: высокие концентрации блокируют осцилляции, в то время как более низкие концентрации влияют на период между пиками (рис 4). Увеличение концентрации Nod факторов подавляет ингибирование и

восстанавливает кальциевые осцилляции. Это позволяет предположить, что запуск клубенькообразования контролируется соотношением концентраций АБК и Nod-факторов (Ding *et al.*, 2008).

2.3.4. Другие фитогормоны

Помимо описанных выше в процесс формирования клубеньков вовлечены и другие гормоны. Так, стриголактоны и брассиностероиды действуют как позитивные регуляторы клубенькообразования, важную роль также играют различные пептидные гормоны, в то время как АБК, жасмоновая кислота, салициловая кислота и этилен оказывают негативное влияние на процесс развития клубеньков (Lorteau *et al.*, 2001; Цыганова, Цыганов, 2018).

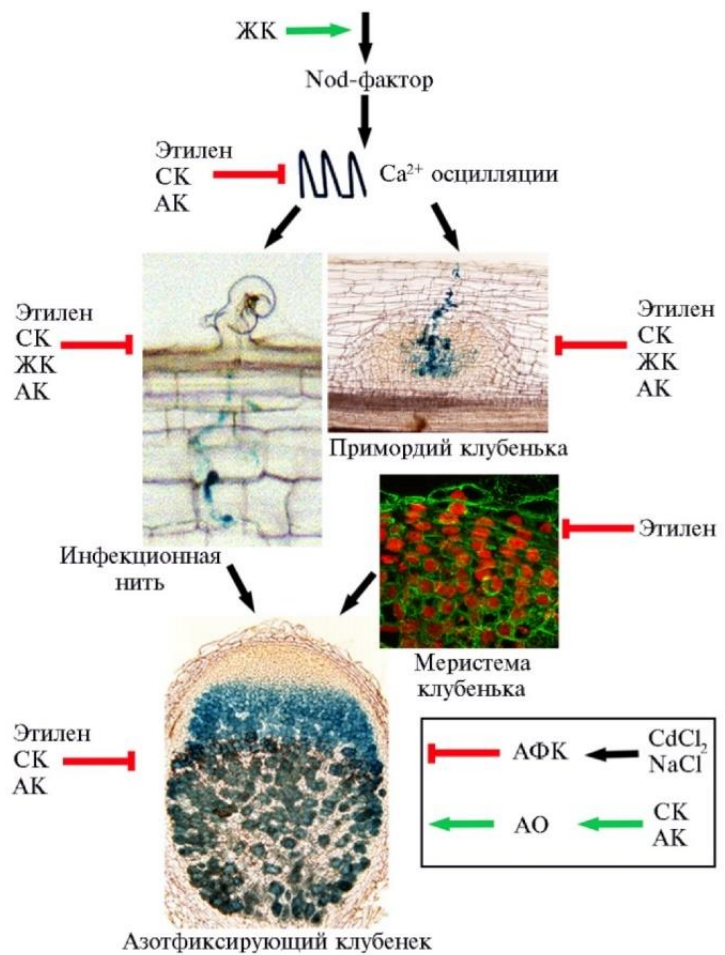


Рис. 4. Схема влияния этилена, салициловой (СК), жасмоновой (ЖК) и абсцизовой (АК) кислот на развитие и функционирование клубенька:

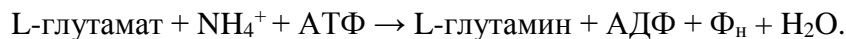
Черные стрелки — последовательность стадий развития клубенька, зеленые стрелки — позитивная регуляция, красные стрелки — негативная регуляция (Цыганова, Цыганов, 2018).

2.4. Процессы, протекающие в клубеньке

2.4.1. Ассимиляция аммония

В клубеньке бактериоиды поставляют в растение фиксированный атмосферный азот в форме NH_4^+ в недетерминированных клубеньках и уреидов в детерминированных клубеньках, а растение, в свою очередь, обеспечивает бактериоиды углеродом и источниками энергии (Vance, 2008). Очень низкий уровень CO_2 в среде, ограничивающий фотосинтез, может ограничивать и симбиотическую фиксацию азота (Jochum *et al.*, 2016). Продукты фотосинтеза, поставляемые в инфицированные клубеньковые клетки, ферментируются необычным способом, не до пирувата, а до малата, который может быть использован непосредственно в цикле трикарбоновых кислот в бактериальных клетках и не требует дополнительных биохимических преобразований. Экспортируемые бактериоидами ионы аммония переводятся в органическую форму ферментами растений: глутаминсинтетазой, глутаматсинтазой и аспаратаминотрансферазой (Vance, Gantt, 1992).

Глутаминсинтетаза переносит катион NH_4^+ на глутамат с образованием глутамина. У прокариот этот фермент тоже имеется, его молекулярная масса составляет порядка 600 кДа и он состоит из двенадцати идентичных субъединиц, образующих шесть активных центров. Каждый из центров лигандируется двумя катионами Mn^{2+} (Пиневиц, 2007).



Глутамин-2-оксоглутаратаминотрансфераза (глутаматсинтаза; GOGAT) переносит аминогруппу от глутамина на α -кетоглутарат. У прокариот этот фермент обычно представлен мономером 150-250 кДа (Пиневиц, 2007).



2.4.2. Механизмы защиты нитрогеназы

Процесс азотфиксации происходит в микроаэрофильном, богатом азотом окружении. Этот факт объясняет особенности регуляции *nif*-генов, основным регулятором экспрессии которых в данных условиях является не азот, а кислород. Ключевую роль в этом процессе играет ген *nifA*, кодирующий транскрипционный активатор *nif*-оперона (Sullivan *et al.*, 2013).

Ген *nifA* находится под контролем двухкомпонентной регуляторной системы FixL/J совместно с регулятором FixK и редокс-чувствительной системой RegS/R, представленными только у симбиотических diaзотрофов, и активирующими транскрипцию только при понижении концентрации кислорода (Ермилова, 2012). Стоит отметить, что концентрацию кислорода в клубеньках контролирует растение-хозяин, также оно обеспечивает отток ассимилированного азота из клубенька. По этой причине у ризобий нет гена *nifL*, отвечающего за репрессию нитрогеназы в аэробных условиях конечными продуктами реакции — связанными формами азота.

Нитрогеназа, нуждается в микроаэробных (<50 нМ O₂) условиях для работы, потому что она необратимо разрушается за счет индуцированного протеолиза апопротеинов, а также из-за окисления железо-серных кластеров при повышенном парциальном давлении кислорода (так как образуются активные формы кислорода: синглетный кислород, супероксидный анион-радикал, пероксид водорода). С другой стороны, ризобии требуют значительного количества кислорода для дыхания и выработки АТФ, необходимого при энергоемком процессе превращения атмосферного молекулярного азота в аммиак. Такие, казалось бы, противоречивые условия достигаются как структурными, так и биохимическими механизмами в клубеньке (Minchin *et al.*, 2008).

Существует два основных биохимических механизма, которые, действуя совместно, устанавливают микроаэробные условия вокруг азотфиксирующих бактерий и обеспечивают их нормальное функционирование. Это, во-первых, высокая скорость потребления кислорода бактероидами, содержащими особую форму терминальной оксидазы *scb₃*, обладающую высокой степенью сродства к кислороду, и митохондриями растений. И, во-вторых, наличие особого белка растений — леггемоглобина, связывающего кислород с высокой аффинностью и быстро доставляющего его в митохондрии и бактериоиды инфицированных клеток, уменьшая таким образом парциальное давление этого газа в цитоплазме клеток зоны азотфиксации (Ермилова, 2012).

В то же время структура самого симбиотического клубенька вносит свой вклад в защиту нитрогеназы. Так, существует барьер для диффузии газов из наружных слоев клеток клубенька ко внутренним, что ограничивает скорость притока кислорода к инфицированным клеткам (Brewin, 1991).

2.5. Горох посевной как объект изучения бобово-ризобиального симбиоза

2.5.1. Общая характеристика

Горох посевной (*P. sativum*) является типовым видом рода *Pisum* семейства *Fabaceae*. Вьющееся однолетнее травянистое растение с восходящим полым стеблем длиной до 2 м. Листья чередуются, перистые, заканчиваются усиками. У цветков есть пять зеленых чашелистиков и пять от белых до красновато-фиолетовых лепестков разного размера. Плод — боб, длиной 2,5–10 см, который часто имеет грубую внутреннюю мембрану. Бобы различаются по форме, размеру и окраске, что определяется генотипом. В каждом бобе содержится от 4 до 10 расположенных в ряд семян. Форма и цвет семян разнообразны, поверхность их гладкая или морщинистая. (Rungruangmaitree, Jiraungkoorskul, 2017).

Горох — один из модельных объектов исследования клубеньков недетерминированного типа (Voroshilova *et al.*, 2009). В этом растении бактериоды остаются небольшими и часто имеют Y-образную или удлинненную форму, распределяются они случайным образом. Каждая симбиосома в норме содержит один бактериод (Vedam *et al.*, 2004).

В данной работе использовалась лабораторная линия SGE. Линия SGE была получена О.Э. Костериным и С.М. Розовым при скрещивании линий VIR6135 (из Греции), VIR320 (из Палестины) и оригинальной сверхскороспелой линии Sprint-1 (Kosterin, Rozov, 1993). Эта линия характеризуется средним сроком созревания семян, крупными розовыми клубеньками, эффективно фиксирующими азот, и высокой репродуктивной способностью. На основе этой линии с использованием ЭМС-мутагенеза (этилметансульфонат мутагенеза) был получен ряд мутантов, характеризующийся фенотипом Fix⁻ (Tsyganov *et al.*, 1998; Цыганов и др., 2012). Одними из таких мутантов являются растения с нарушениями работы симбиотического гена *Sym40* (*PsEFD*).

2.5.2. Ген *EFD*, кодирующий ключевой регулятор процесса клубенькообразования

Ген *MtEFD* кодирует транскрипционный фактор EFD, относящийся к факторам ответа на этилен (ERF) группы V, которая включает ERN1, ERN2, и ERN3 — три ERF вовлеченных в процесс опосредованной Nod-факторами передачи сигнала (Andrianakaja *et al.*, 2007).

Семейство ERF факторов реакции на этилен — одно из самых больших семейств транскрипционных факторов у растений. Многие ERF связаны с реакциями растений на

биотические и абиотические стрессы, но, по крайней мере, пять ERF участвуют в контроле развития органов растений, делении и дифференцировки клеток (Marsch-Martinez *et al.*, 2006).

Мутант *M. truncatula efd-1* характеризуется многочисленными разветвленными инфекционными нитями, уменьшенной эффективностью заражения клеток хозяина, присутствием в зараженных клетках большого числа бактериоидов на первых стадиях дифференцировки и немногочисленными бактериоидами на более поздних стадиях, содержанием в инфицированных клетках дегенерирующих бактериоидов, свидетельствующих о раннем старении клубенька. Все данные говорят о том, что бактериоиды способны выживать в клубеньках мутанта по гену *Efd-1*, но не могут активировать свою генетическую программу, ответственную за фиксацию азота (Vernie *et al.*, 2008).

Исследования показали, что EFD — отрицательный регулятор развития корневого клубенька и процессов инфекции. Высказано предположение, что индукция EFD активирует MtRR4, запускающий регулятор ответа RRA-типа, приводящий к ингибированию цитокининового сигнального каскада по механизму обратной связи. Вследствие этого наблюдается подавление закладки новых клубеньков. EFD приписывается статус ключевого регулятора, связывающего раннюю и позднюю стадии формирования клубенька и предполагается, что регуляция цитокининового пути сигнальной трансдукции важна как для инициации, так и для развития симбиотического клубенька (Vernie *et al.*, 2008).

2.5.3. Ген *Sym40* — ортолог гена *EFD* у *Pisum sativum*

Ген *Sym40* гороха является ортологом гена *MtEFD*, кодирующего негативный регулятор цитокининового сигнального каскада (Неманкин, 2011). Мутации в данном гене вызывают восприятие полезного штамма ризобий в качестве патогена и запускают защитные реакции хозяина. В результате клубенек становится топологически изолированным от основной части растения. У мутантов наблюдается повышенный уровень экспрессии генов пероксидазы, маркера реакции гиперчувствительности и белка PR10 (Ivanova *et al.*, 2015).

Нарушение работы гена *Sym40* приводит к аномалиям в развитии клубенька, остановке развития меристемы, массовому выходу бактерий в цитоплазму клетки-хозяина (Tsyganov *et al.*, 1998). Мутантные линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) образуют многочисленные белые и иногда розовые клубеньки, а линии SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*) — мелкие и крупные белые.

Обе мутации являются моногенными и рецессивными (Tsyganov *et al.*, 1998; Цыганов и др., 2012).

Белые клубеньки мутантной линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) характеризуются аномальной гистологической организацией, гипертрофированными инфекционными нитями и инфекционными каплями, аномальной морфологической дифференцировкой бактериоидов, преждевременной деградацией симбиотических структур. Структура розовых клубеньков не отличается от структуры родительской линии SGE (Tsyganov *et al.*, 1998).

Было выдвинуто несколько гипотез, способных объяснить феномен образования двух типов клубеньков у описанных мутантных линий. Предполагается, что развитие двух типов клубеньков, определяемых мутациями в гене *Sym40*, связано с тем, что фенотипическое проявление этих мутаций зависит от изменчивости факторов, отражающих либо внутренние условия корня и/или клубенька, либо воздействия, оказываемые окружающей средой. К таким воздействиям могут относиться температура, освещенность или пищевой статус (Tsyganov *et al.*, 1998).

Основным условием эффективного взаимодействия *Fabaceae* и их симбионтов является строгий контроль за бактериальной активностью в клубеньках (Тихонович, Проворов, 2008). Симбиосома находится в состоянии динамического равновесия, и, если процесс фиксации азота не происходит из-за бактериальных или растительных мутаций или неблагоприятных физиологических условий, бактериоиды быстро стареют, после чего клетка-хозяин умирает (Borisov *et al.*, 1997; Morzhina *et al.*, 2000).

Исследования неэффективного симбиоза представляют большой интерес, поскольку они помогают выявить барьеры, выдвигаемые растением, которые бактерии должны преодолеть в процессе инфекции. Эти исследования дают важные ключи к разгадке регуляторных механизмов симбиотической фиксации азота. К сожалению, мы далеки от ясного понимания всех деталей описанного процесса.

Этот факт стал причиной возникновения нашей работы, ставящей целью изучение одного из симбиотических генов, мутации в котором нарушают ход нормального процесса образования клубеньков. Полученные данные помогут пролить свет на пока не до конца изученные причины установления неэффективных ассоциаций между растениями и их микросимбионтами в природе.

Глава 3. Материалы и методы

3.1. Объекты исследования

В работе использовали 19 штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, которые были предоставлены Ведомственной коллекцией полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ) (табл. 1). Штаммы были отобраны по свойству стимуляции роста и высокой эффективности.

Таблица 1. Штаммы из Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ), использованные в работе

Штамм ВКСМ	Регион происхождения / хозяин	Свойства
1021	Ленинградская обл. / <i>Pisum sativum</i>	Ростстимулирующие
1022	Московская обл. / <i>Pisum sativum</i>	Высокая эффективность; ростстимулирующие
1023	Литва / <i>Pisum sativum</i>	Ростстимулирующие
1025	Кустанайская обл. / <i>Pisum sativum</i>	—”—
1029	Армения / <i>Pisum sativum</i>	—”—
1030	Украина / <i>Pisum sativum</i>	—”—
1039	Орловская обл. / <i>Pisum sativum</i>	—”—
1042	Белоруссия / <i>Pisum sativum</i>	—”—
1045	Удмуртия / <i>Pisum sativum</i>	—”—
1052	Армения / <i>Pisum sativum</i>	Высокая конкурентоспособность; высокая эффективность; ростстимулирующие
1057	Латвия / <i>Pisum sativum</i>	Ростстимулирующие
1060	Чехословакия / <i>Pisum sativum</i>	—”—
1062	Голландия / <i>Pisum sativum</i>	—”—
1066	Черниговская обл. / <i>Pisum sativum</i>	Ростстимулирующие; присутствие гена <i>nodX</i>
1068	Венгрия / <i>Pisum sativum</i>	Ростстимулирующие
1076	Орловская обл. / <i>Pisum sativum</i>	Высокая конкурентоспособность; высокая эффективность; ростстимулирующие
1077	Винницкая обл. / <i>Pisum sativum</i>	Высокая эффективность; рост стимулирующие
1078	Крым / <i>Pisum sativum</i>	Ростстимулирующие
1080	Херсонская обл. / <i>Pisum sativum</i>	—”—

Помимо этого, в работе использовали лабораторные штаммы *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* – ВКСМ 3841, ВКСМ 1026, ВКСМ ТОМ (образуют эффективный симбиоз с некоторыми генотипами гороха из Афганистана) и изоляты 36b352 и 1Пс341 (супрессируют фенотипические проявления мутации гороха в генах *Pssym26* и *Pssym27*). Также были использованы серии изолятов, полученные в ходе исследования путем выделения бактерий из розовых клубеньков.

В работе использовали растения гороха посевного (*P. sativum*) линии SGE и мутанты SGEFix⁻1 (*sym40-1*) и SGEFix⁻6 (*sym40-2*), полученные на этой линии.

3.2. Условия культивирования штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

Для культивирования использовали среду ТУ (Beringer, 1974) (CaCl₂ – 0,5 г/л; дрожжевой экстракт — 3 г/л; триптон (Helicon, Россия) — 5 г/л; агар (HiMedia, Индия) — 15 г/л). Штаммы, несущие плазмиду с геном устойчивости к стрептомицину, выращивали на среде с добавлением этого антибиотика (концентрация — 600 мкг/мл). Культивирование проводили в инкубаторе Lab-line Incubator 305-1 (Thermo Scientific, США) при 28 °С. После трех суток культивирования штаммы помещали в холодильник для хранения при 4 °С.

3.3. Методика выделения бактерий из клубеньков

Отобранный клубенек отделяли от корня, и его поверхность стерилизовали 96%-ным этанолом 1 мин. После этого клубенек промывали стерильной дистиллированной водой десять раз по 1 мин. Подготовленный клубенек помещали в пробирку с жидкой средой ТУ. В пробирке клубенек растирали стерильной стеклянной палочкой. Небольшое количество полученной суспензии отбирали бактериологической петлей и переносили на чашку Петри со средой ТУ, после чего чашку помещали в инкубатор при 28 °С. Через 2 дня выросшие колонии переносили на чашку со свежей питательной средой.

3.4. Состав питательного раствора без азота

В работе для выращивания растений гороха использовали питательный раствор без азота FP (Fåhraeus, 1957) состава:

макроэлементы ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 4,8 г/л; KH_2PO_4 — 1,6 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,4 г/л) — 50 мл/л;

микроэлементы (H_3BO_3 — 0,692 г/л; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,04 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,188 г/л; $\text{Mg}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,048 г/л) — 5 мл/л;

NaFeEDTA (3,67 г/л) — 5 мл/л;

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (19,992 г/л) — 5 мл/л.

3.5. Условия выращивания растений и инокуляция

Растения гороха выращивали в климатических камерах MLR-352H (Sanyo Electric Co, Япония), настроенных на следующие условия: продолжительность суток (день/ночь) — 16/8 ч, температура — 21 °С, относительная влажность воздуха 75%, плотность потока фотосинтетических фотонов — 280 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-2}$ (Kitaeva et al., 2016).

Перед посадкой семена стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 15 мин при комнатной температуре и промывали стерильной дистиллированной водой в течение 1 ч.

Семена предварительно проращивали в стерильных чашках Петри на смоченной стерильной дистиллированной водой фильтровальной бумаге в течение 3 дней в инкубаторе при 28 °С.

В момент посадки семена инокулировали исследуемым штаммом ризобий (1 мл водной суспензии бактерий, содержащей 10^8 – 10^9 клеток на семя). В качестве субстрата для выращивания использовали стерильный вермикулит, увлажненный питательным раствором FR.

Клубеньки собирали на 21-й день после инокуляции. Визуализацию корней и клубеньков проводили с помощью стереомикроскопа SteREO Lumar V12 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

3.6. Условия выращивания растений в сосудах с почвой

При работе с образцами почвы различного географического происхождения растения выращивали в горшках объемом 10 л в тепличных условиях. Средняя температура по

г. Пушкин в 2018 г. (день/ночь): июнь — 19/11 °С, июль — 23/16 °С, август — 22/15 °С (информация получена из архива www.World-Weather.ru).

Семена линии SGE перед посадкой не стерилизовали и предварительно не проращивали. Семена мутантных линий стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 15 мин при комнатной температуре и промывали стерильной дистиллированной водой в течение 1 часа. Семена проращивали в стерильных чашках Петри на смоченной стерильной дистиллированной водой фильтровальной бумаге в течение 3 дней в инкубаторе при 28 °С.

Семена перед посадкой не инокулировали. В качестве субстрата для выращивания использовали почву различного географического происхождения: чернозем средней полосы России на границе с Украиной, старопашотную дерново-глубокоподзолистую почву Тверской области (любезно предоставлены Е.Е. Андроновым, ФГБНУ ВНИИСХМ), освоенную смытую дерново-подзолистую почву Пушкинского района г. Санкт-Петербурга и почву с опытного поля ФГБНУ ВНИИСХМ.

Клубеньки собирали на 28-й день после инокуляции. Визуализацию корней и клубеньков проводили с помощью стереомикроскопа SteREO Lumar V12 с камерой AxioCam MRc5.

3.7. Условия выращивания растений в стерильных контейнерах

Чтобы предотвратить контаминацию образцов и случайную перекрестную инокуляцию в ходе параллельного исследования ризобияльных изолятов, супрессирующих фенотипические проявления мутаций в генах *Pssym26* и *Pssym27*, растения выращивали в стерильных контейнерах TP5000 с фильтрами (SacO₂, Бельгия) в специальном помещении лаборатории с регулируемыми параметрами освещения и температуры: продолжительность суток (день/ночь) — 16/8 ч, температура — 21±2 °С, плотность потока фотосинтетических фотонов — 280 мкмоль фотонов м⁻²с⁻².

Условия стерилизации и проращивания семян аналогичны описанным в пункте 3.5.

В момент посадки семена инокулировали исследуемыми изолятами ризобий (1 мл водной суспензии бактерий, содержащей 10⁸–10⁹ клеток на семя). В качестве субстрата для выращивания использовали стерильный кварцевый песок, увлажненный питательным раствором FP.

Клубеньки собирали на 21-й день после инокуляции. Визуализацию корней и клубеньков проводилась с помощью стереомикроскопа SteREO Lumar V12 с камерой AxioCam MRc5.

3.8. Условия выращивания растений при исследовании влияния температуры на клубенькообразование

Растения выращивали в климатических камерах MLR-352H. В первом эксперименте: продолжительность суток (день/ночь) — 16/8 ч, температура — 21/10 °С, относительная влажность воздуха 75%, плотность потока фотосинтетических фотонов — 280 мкмоль фотонов м⁻²с⁻².

Во втором эксперименте: продолжительность суток (день/ночь) — 16/8 ч, температура — 21/5 °С, относительная влажность воздуха 75%, плотность потока фотосинтетических фотонов — 280 мкмоль фотонов м⁻²с⁻².

Условия стерилизации и проращивания семян аналогичны описанным в пункте 3.5.

В момент посадки семена инокулировали либо штаммом 3841, либо — 1026 (1 мл водной суспензии бактерий, содержащей 10⁸–10⁹ клеток на семя). В качестве субстрата для выращивания использовали стерильный вермикулит, увлажненный питательным раствором FR.

Растений анализировали на 28-й день, а сбор клубеньков в данном исследовании не проводили. Корни и клубеньки визуализировали с помощью стереомикроскопа SteREO Lumar V12 с камерой AxioCam MRc5.

3.9. Методика анализа гистологической структуры клубеньков с использованием тонких срезов

Подготовка проб и приготовление срезов производили по разработанной в лаборатории методике (Китаева и др., 2018).

Для анализа гистологической структуры собранные клубеньки фиксировали в свежеприготовленном фиксаторе (параформальдегид — 3%; глутаровый альдегид — 0,25%) в буфере TBS (TrisHCl — 50 ммоль; NaCl — 150 ммоль; pH 7,5) с добавлением Triton X-100 — 0,1% и Tween-20 — 0,1%. Для наилучшего проникновения фиксатора воздух из тканей

откачивали в течение 10 мин при $-0,9$ бар с использованием вакуумной помпы VacuuBrand ME 1C (Vaccuubrand, Германия). Процедуру повторяли три раза. После этого клубеньки помещали в холодильник при 4°C на ночь.

Клубеньки промывали TBS три раза и дегидратировали в серии спиртов увеличивающийся концентрации по следующей схеме: этанол 10%-ный — 10 мин, этанол 20%-ный — 20 мин, этанол 30%-ный — 30 мин, этанол 40%-ный — 40 мин, этанол 50%-ный — 50 мин, этанол 60%-ный — 60 мин, этанол 70%-ный — 60 мин, этанол 80%-ный — 60 мин, этанол 90%-ный — 60 мин.

Клубеньки окрашивали толуидиновым синим (Merck KGaA, Германия) — 0,5% в этаноле 96%-ном и оставляли на ночь при 4°C . Клубеньки промывали в этаноле 96%-ном два раза по 30 мин. Затем заключались в воск Сидмана (Vitha *et al.*, 1997) после проводки через серию смесей: 10%-ный воск Сидмана в этаноле — 2 ч, 20%-ный воск Сидмана в этаноле — 2 ч, 35%-ный воск Сидмана в этаноле — 2 ч, 50%-ный воск Сидмана в этаноле — 2 ч, 65%-ный воск Сидмана в этаноле — 2 ч, 80%-ный воск Сидмана в этаноле — 2 ч, 100%-ный воск Сидмана — на ночь при 60°C .

100%-ный воск Сидмана сменялся два раза, клубеньки выдерживались в нем по 2 ч.

Клубеньки заливали в блоки 100%-ного воска Сидмана. Готовые блоки выдерживали при комнатной температуре до приобретения молочно-белого цвета, затем хранили в холодильнике при 4°C . Продольные срезы толщиной 10 мкм приготавливали с использованием автоматического прецизионного микротомы HM-360 (Microm International GmbH, Германия). Готовые срезы монтировали на предметные стекла с адгезионным покрытием силан (JLS Chemical, Россия) с помощью куриного белка и помещали в термостат при 28°C на ночь.

Стекла со срезами регидратировали в спиртах: этанол 96%-ный — ночь, этанол 96%-ный — 30 мин, этанол 70%-ный — 20 мин, этанол 40%-ный — 20 мин.

Срезы отмывали в TBS в два этапа: 20 мин и 40 мин, затем их окрашивали толуидиновым синим — 0,05% в TBS. После окрашивания срезы промывали TBS два раза по 15 мин. Между предметным и покровным стеклом наносили раствор TBS и глицерина в соотношении 1:1, стекла запечатывали лаком для ногтей.

Микроскопический анализ проводили с использованием инвертированного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam ICc1 (Carl Zeiss, Германия).

3.10. Методика анализа гистологической структуры клубеньков с использованием полутонких срезов

За основу методики визуализации гистологической структуры клубеньков была взята методика, использованная для исследования организации тубулиновых микротрубочек в клубеньках *P. sativum* (Китаева и др., 2018).

Для анализа структуры клубеньков их фиксировали в свежеприготовленном фиксаторе (параформальдегид — 3%; глутаровый альдегид — 0,25%) в буфере TBS с добавлением Triton X-100 — 0,1% и Tween-20 — 0,1%. Для наилучшего проникновения фиксатора воздух из тканей откачивали в течение 10 мин при –0,9 бар с использованием вакуумной помпы VacuuBrand ME 1C. Процедуру повторяли три раза. После этого клубеньки помещали в холодильник при 4 °С на ночь. При необходимости длительного хранения клубеньки дегидратировали в серии спиртов до концентрации этанола 70%, как описано выше в пункте 4.9.

Клубеньки, хранящиеся в TBS, заключали в блоки 3%-ной агарозы в TBS и оставляли при комнатной температуре до застывания. Продольные срезы толщиной 50 мкм получали с помощью автоматического прецизионного микротомы с вибрирующим лезвием HM-650V (Microm International GmbH, Германия)

Срезы высвобождали от агарозы и окрашивали йодистым пропидием (Thermo Scientific, США) 1:1000 (концентрация — 0,5 мкг/мл) в течение 7 мин в темноте. Окрашенные срезы промывали три раза TBS по 10 мин. Готовые срезы монтировали на стекла, для защиты красителя от выгорания на свету между предметным и покровным стеклом наносили заливочную среду ProLong Gold antifade reagent (Life Technologies, США) — 50 мкл.

Микроскопический анализ проводили на конфокальном микроскопе LSM 510 META NLO (Carl Zeiss, Германия). Получение z-серий оптических срезов с последующей реконструкцией трехмерных изображений проводили с использованием программного обеспечения ZEN2009 (Carl Zeiss, Германия).

3.11. Методика выращивания и обработки растений синтетическим аналогом цитокининов

В ходе работы проверяли влияние синтетического аналога цитокининов — 6-бензиламинопурина (БАП) на процесс формирования симбиотических клубеньков. За основу была взята методика, описанная при изучении влияния цитокининов на продукцию этилена и образование клубеньков у *P. sativum* (Lorteau *et al.*, 2001).

Растения гороха выращивали в климатических камерах MLR-352H, настроенных на условия, аналогичные описанным в пункте 3.5. Условия стерилизации и проращивания семян также аналогичны описанным в пункте 3.5.

В момент посадки семена инокулировали штаммом 3841 (1 мл водной суспензии бактерий, содержащей 10^8 – 10^9 клеток на семя). В качестве субстрата для выращивания использовали стерильный вермикулит, увлажненный питательным раствором FP.

После инокуляции горшки с семенами взвешивали и доводили фильтрованной деминерализованной водой до одинакового веса. В каждый горшок доливали по 10 мл раствора БАП (Sigma-Aldrich, США) в 1 М NaOH различных концентраций (табл. 2).

Таблица 2. Схема обработки растений раствором БАП

Образец	Концентрация БАП	Образец	Концентрация БАП
1.1 — SGE + 3841	100 мкМ	2.1 — SGEFix ⁻¹ + 3841	100 мкМ
1.2 — SGE + 3841	100 мкМ	2.2 — SGEFix ⁻¹ + 3841	100 мкМ
1.3 — SGE + 3841	10 мкМ	2.3 — SGEFix ⁻¹ + 3841	10 мкМ
1.4 — SGE + 3841	10 мкМ	2.4 — SGEFix ⁻¹ + 3841	10 мкМ
1.5 — SGE + 3841	1000 мкМ	2.5 — SGEFix ⁻¹ + 3841	1000 мкМ
1.6 — SGE + 3841	1000 мкМ	2.6 — SGEFix ⁻¹ + 3841	1000 мкМ
1.7 — SGE + 3841	Контроль	2.7 — SGEFix ⁻¹ + 3841	Контроль
1.8 — SGE + 3841	Контроль	2.8 — SGEFix ⁻¹ + 3841	Контроль

Каждый горшок снова взвешивали, полученное значение использовали в качестве исходного нулевого уровня.

В дальнейшем на 3-й, 6-й, 9-й, 12-й, 15-й, 18-й и 21-й дни после инокуляции проводили взвешивания горшков и полив растений раствором соответствующей концентрации БАП по весу до исходного нулевого уровня. Полив производился пипеткой под корень, чтобы избежать попадания раствора на надземные части растений.

Растений анализировали на 24-й день. Корни и клубеньки визуализировали с помощью стереомикроскопа SteREO Lumar V12 с камерой AxioCam MRc5.

3.12. Методика иммулокализации абсцисовой кислоты

В работе изучали локализацию АБК в клубеньках линии SGE и мутанте SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) инокулированных штаммом 3841, а также выделенным в ходе работы изолятом. За основу методики визуализации была взята методика фиксации при исследовании локализации фитогормонов в *Pinus radiata* D.Don (Escandón *et al.*, 2016), а также метод использованный для исследования организации тубулиновых микротрубочек в клубеньках *P. sativum* (Китаева и др., 2018).

Клубеньки фиксировали в свежеприготовленном фиксаторе (параформальдегид — 3%; 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDAC) — 4%; глутаровый альдегид — 0,25%) в буфере TBS с добавлением Triton X-100 — 0,1% и Tween-20 — 0,1%. Для наилучшего проникновения фиксатора воздух из тканей откачивали в течение 10 мин при – 0,9 бар с использованием вакуумной помпы VacuuBrand ME 1С. Процедуру повторяли три раза. После этого клубеньки помещали в холодильник при 4 °С на ночь.

Клубеньки промывали в TBS и заключали в блоки 3%-ной агарозы в TBS. Срезы приготавливали согласно методике, описанной в пункте 3.10.

Для иммуногистохимического выявления АБК образцы последовательно инкубировали в блокирующем растворе (бычий сывороточный альбумин (BSA) — 5%; козья сыворотка — 5 мкл) в течение 30 мин при 28 °С, затем 30 мин при 28 °С в растворе ацетилированного бычьего сывороточного альбумина (AcBSA) в TBS.

Затем срезы инкубировали в растворе, содержащем TBS – 100 мкл, BSA — 1,5 мкл, AcBSA — 2,5 мкл и первичные поликлональные кроличьи антитела к АБК (Agrisera, Швеция) в разведении 1:100 в течение ночи при 4 °С.

После инкубации с первичными антителами срезы промывали шесть раз в TBS и инкубировали в 5%-ном BSA в TBS 25 мин при 28 °С. Затем срезы инкубировали в TBS с вторичными козьими антителами к кроличьему иммуноглобулину, конъюгированными с флуорохромом AlexaFluor 488 (Life Technologies, США) в разведении 1:750 при 28 °С в течение 1 ч 20 мин. Затем срезы промывали три раза в TBS по 10 мин и окрашивали йодистым пропидием 1:1000 (концентрация — 0,5 мкг/мл) 7 мин для визуализации бактерий и ядер, после чего снова промывали два раза TBS по 10 мин.

Готовые срезы монтировались на стекла Superfrost (Thermo Scientific, США), для защиты антител и красителя от выгорания на свету между предметным и покровным стеклом наносили заливочную среду ProLong Gold antifade reagent — 65 мкл.

Микроскопический анализ проводили как описано в пункте 3.10.

Глава 4. Результаты и обсуждение

4.1. Обоснование выбора модели для исследования

В предыдущих работах лаборатории, посвященных изучению бобово-ризобиального симбиоза и мутаций, нарушающих различные стадии процесса инфекции, использовали серии мутантов гороха с фенотипом Fix^- , полученных из линии дикого типа SGE (Tsyganov *et al.*, 1998; Voroshilova *et al.*, 2001; Tsyganov *et al.*, 2003; Цыганов и др., 2012). В настоящей работе было решено также использовать данную модель, в частности мутанты SGEFix^-1 (*sym40-1*) и SGEFix^-6 (*sym40-2*), несущие мутации в исследуемом гене *Sym40* (рис. 5).

4.2. Анализ штаммов различного географического происхождения

Ранее было установлено, что некоторые штаммы *S. meliloti* и *S. medicae* способны супрессировать проявление мутации в гене *Efd-1* у *M. truncatula*, в результате чего образуются нормальные эффективно фиксирующие азот клубеньки (Jardinaud *et al.*, 2017). Было высказано предположение, что существуют штаммы, способные супрессировать мутации в ортологичном гене гороха. Для выявления таких штаммов было решено использовать потенциал ВКСМ. В ходе работы была исследована способность 20 (включая штамм ТОМ) эффективных штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* различного географического происхождения формировать клубеньки на исходной линии SGE и мутантных линиях SGEFix^-1 (*sym40-1*) и SGEFix^-6 (*sym40-2*).

Растения исходной линии гороха и исследуемых мутантных линий, инокулированные штаммами 1021, 1023, 1042, 1068, 1076, 1077 (рис. 6 Г, Д и Е), 1078 и 1080, не формировали симбиотических клубеньков. Растения, инокулированные штаммами ТОМ, 1022, 1025, 1029, 1030, 1039, 1057, 1062 (рис. 6 А, Б и В) и 1066, формировали клубеньки, сходные с клубеньками, формируемыми стандартными лабораторными штаммами 1026 и 3841: растения линии SGE формировали крупные розовые клубеньки, а мутантные линии — мелкие белые. При инокуляции семян штаммом 1045 клубеньки не формировались у линии SGE, а при инокуляции штаммом 1052 — у мутанта SGEFix^-1 (*sym40-1*), при инокуляции штаммом 1060 фенотип формируемых клубеньков у линии SGE отличался от фенотипа дикого типа — часть клубеньков были белыми (табл. 3). Таким образом, было установлено,

что ни один из использованных штаммов не способен супрессировать фенотипические проявления мутаций в гене *Sym40*.

Таблица 3. Результаты проверки эффективности различных штаммов ризобий из ВКСМ супрессировать фенотипические проявления мутаций в гене *Sym40*

Штамм	SGE	SGEFix ⁻ -1 (<i>sym40-1</i>)	SGEFix ⁻ -6 (<i>sym40-2</i>)
1021	нет	нет	нет
1022	розовые	белые	белые
1023	нет	нет	нет
1025	розовые	белые	– *
1029	розовые	белые	белые
1030	розовые	белые	–
1039	розовые	белые	белые
1042	нет	нет	нет
1045	нет	белые	–
1052	розовые	нет	белые
1057	розовые	белые	–
1060	розовые/белые	белые	белые
1062	розовые	белые	белые
1066	розовые	белые	–
1068	нет	нет	–
1076	нет	нет	–
1077	нет	нет	нет
1078	нет	нет	нет
1080	нет	нет	нет
ТОМ	розовые	белые	–

* в данном случае инокуляцию не проводили

В целом, полученные результаты могут указывать на то, что исследуемые мутации приводят к более серьезным нарушениям в функционировании транскрипционного фактора PsEFD у гороха, чем мутация в ортологичном гене у люцерны и, предположительно, не могут быть супрессированы штаммами *R. leguminosarum* различного географического происхождения.

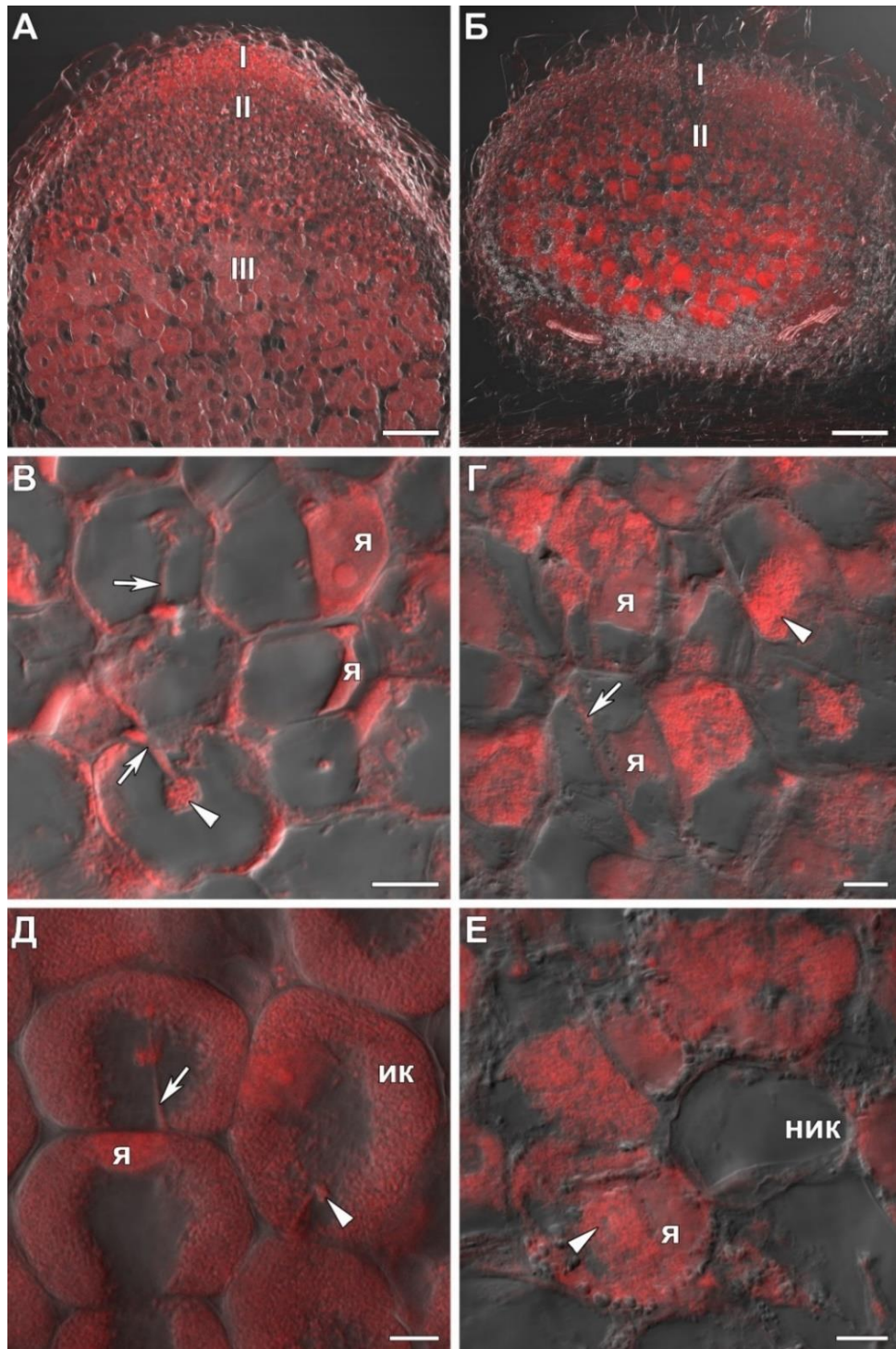


Рис. 5. Гистологическая организация клубеньков гороха; инокуляция штаммом 1026:

А, В, Д — линия дикого типа SGE; Б, Г, Е — мутант SGEFix⁻¹ (*sym40-1*). А–Б — общий вид клубенька; В–Г — зона инфекции; Д — зона азотфиксации; Е — зона, соответствующая зоне азотфиксации у дикого типа.

Наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала.

Красный канал — ДНК (ядра и бактерий). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации; я — ядро, ик — инфицированная клетка, ник — неинфицированная клетка; стрелки — инфекционные нити; наконечники стрелок — инфекционные капли.

Масштабная линейка А, Б 100 мкм; В–Е 10 мкм

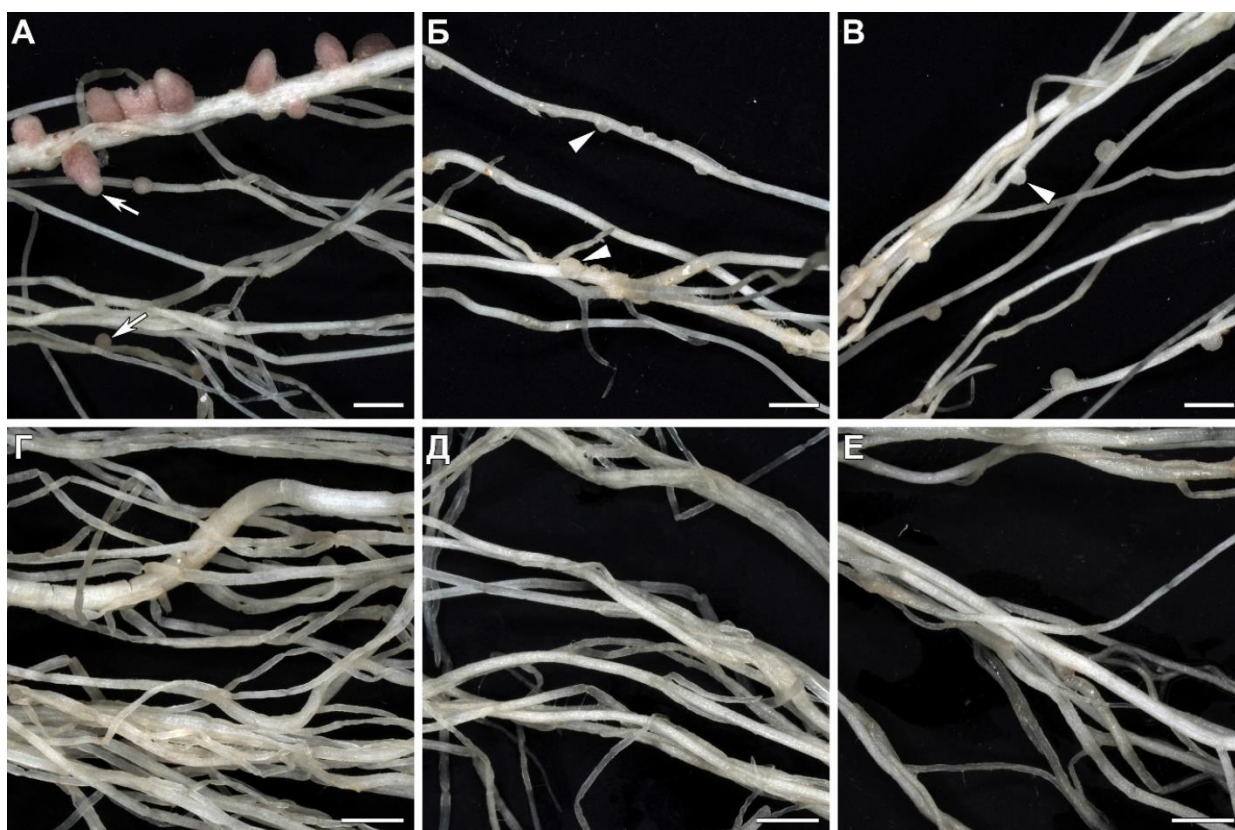


Рис. 6. Общий вид корней гороха; инокуляция штаммами из ВКСМ:

А, Г — линия дикого типа SGE; Б, Д — мутант SGEFix⁻¹ (*sym40-1*); В, Е — мутант SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*). А–В — инокуляция штаммом 1062; Г–Е — инокуляция штаммом 1077.

Стрелки — розовые клубеньки; наконечники стрелок — белые клубеньки.

Масштабная линейка 2 мм

4.3. Анализ клубенькообразования при выращивании опытных образцов в различных типах почв

Почвы различного географического происхождения характеризуются не только различным физико-химическим составом (рН, влажность, содержание органического углерода и минеральных компонентов), но и большим микробным разнообразием (Pershina *et al.*, 2018). Вполне ожидаемо, что среди такого значительного биоразнообразия удастся выявить симбионта, способного образовывать эффективные ассоциации с исследуемыми мутантными линиями и, в итоге, супрессировать проявления мутаций в гене *Sym40*.

Опыт был поставлен таким образом, чтобы имитировать события и процессы, протекающие в естественных условиях. Опытные образцы выращивали в теплицах на

территории ФБГНУ ВНИИСХМ. Растения не были предварительно инокулированы штаммами ризобий, что позволяло обнаружить присутствие естественных симбионтов, способных образовать эффективные ассоциации с растениями.

В результате было установлено, что у мутантных растений, выращенных на всех типах почв кроме чернозема, наблюдалось образование мелких белых клубеньков. Такой результат свидетельствует о присутствии в почвах потенциальных партнеров-симбионтов, но также говорит о неспособности растений-мутантов запустить в клубеньках нормальные процессы фиксации азота (рис. 7 Б, В и Г). Полученные данные согласуются с высказанным выше предположением о том, что мутации в транскрипционном факторе PsEFD не могут быть супрессированы ризобиями.

У мутантных растений, выращенных на черноземе, клубеньки не формировались (рис. 7 А). Можно предположить, что потенциальные симбионты в данной почве имеются, однако поскольку черноземы богаты минеральными компонентами и связанными формами азота, растениям нет необходимости устанавливать симбиотические взаимоотношения и тратить на это лишние жизненные ресурсы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что изученные почвы не содержат организмов-симбионтов, способных супрессировать фенотипические проявления изучаемых мутаций. Как уже говорилось ранее, скорее всего это связано с тем, что мутации в гене *Sym40* приводят к серьезным нарушениям транскрипционного фактора PsEFD, которые не могут быть супрессированы штаммами *R. leguminosarum*.

4.4. Анализ эффективных изолятов ризобий

Ранее сообщалось о способности серии изолятов ризобий супрессировать проявление мутации в генах гороха *Pssym26* и *Pssym27* (неопубликованные данные В.А. Жукова). Мутанты SGEFix⁻³ (*Pssym26*) и SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*) формируют розово-зеленые клубеньки, в которых наблюдается преждевременная деградация симбиотических структур, что указывает на фенотип раннего старения (Serova *et al.*, 2018). Описанные изоляты были проверены на мутантной линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*), несущей мутацию в исследуемом гене *Sym40*, приводящей к формированию белых неэффективных клубеньков с признаками раннего старения, но заблокированных на более ранней стадии, чем у мутантов по генам *Pssym26* и *Pssym27*.

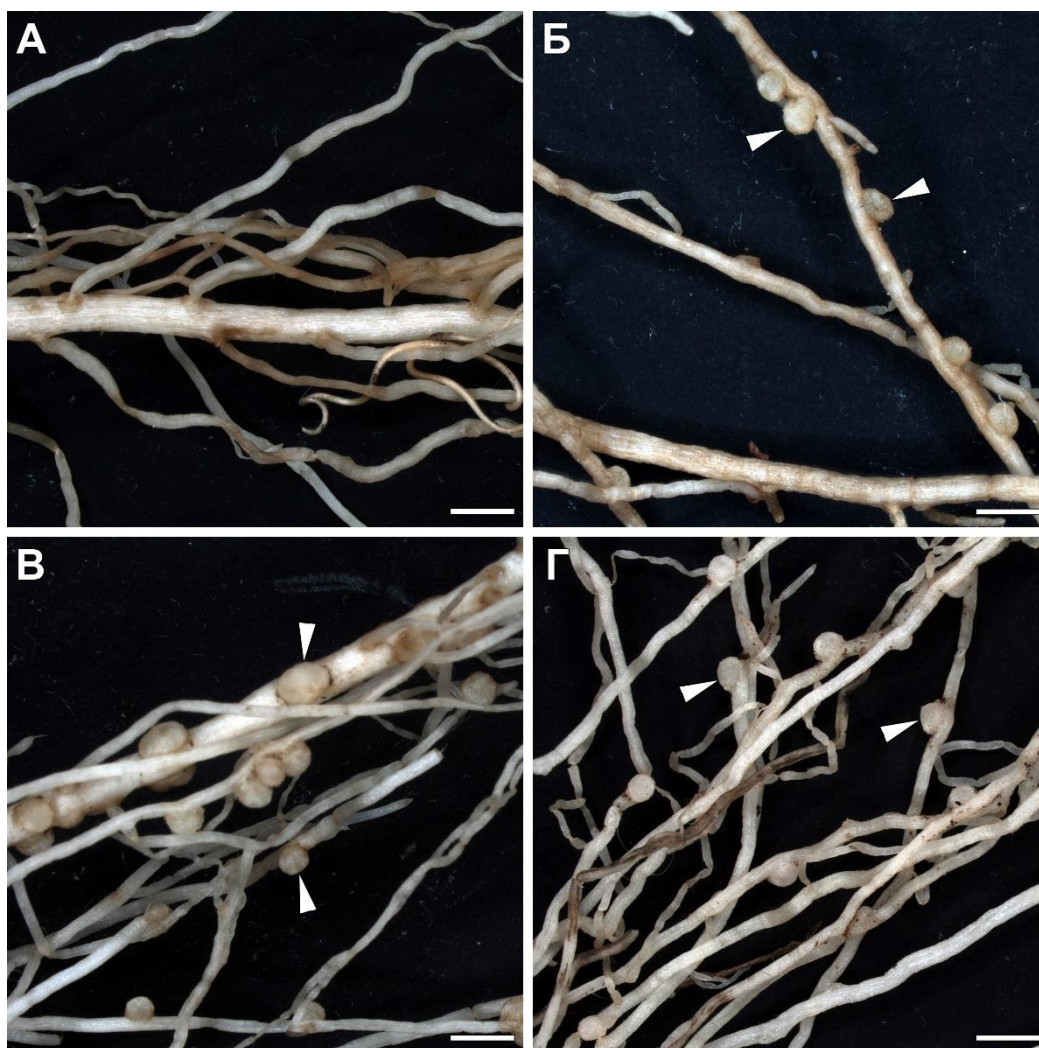


Рис. 7. Растения гороха линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*), выращенные на почвах различного географического происхождения:

А — чернозем; Б — дерново-глубокоподзолистая почва; В — почва с опытного поля ВНИИСХМ; Г — освоенная смытая дерново-подзолистая почва.

Наконечники стрелок — белые клубеньки.

Масштабная линейка 2 мм

Изолят 1Пс341 сформировал крупные розовые клубеньки на линии дикого типа SGE и мелкие белые клубеньки на мутантной линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*). Таким образом, изолят не смог супрессировать мутантный фенотип и в дальнейшей работе не использовался.

Изолят 36b352 сформировал розовые клубеньки на линии SGE, а также удлиненные белые клубеньки на линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*). Необычная форма белых клубеньков вызвала интерес, поэтому был проведен их гистологический анализ (рис. 8), который показал типичный для мутантной линии фенотип.

Полученные нами данные говорят о том, что мутации в исследуемом гене *Sym40* не могут быть супрессированы эффективными изолятами 1Пс341 и 36b352.

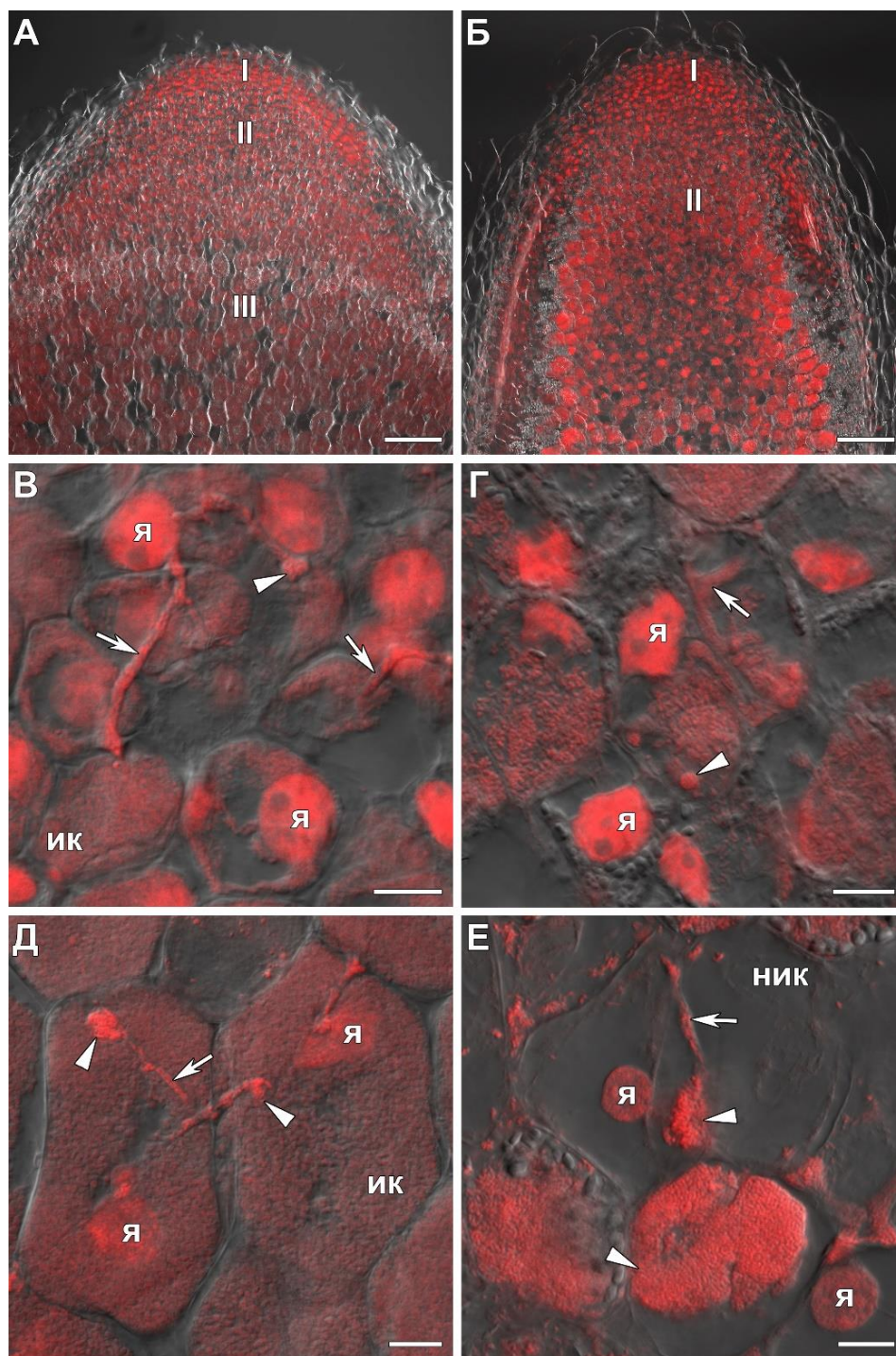


Рис. 8. Гистологическая организация клубеньков гороха; инокуляция изолятом 36b352:

А, В, Д — линия дикого типа SGE; Б, Г, Е — мутант SGEFix⁻¹ (*sym40-1*); А–Б — общий вид клубенька; В–Г — зона инфекции; Д — зона азотфиксации; Е — зона, соответствующая зоне азотфиксации у дикого типа.

Наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала. Красный канал — ДНК (ядра и бактерии). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации; я — ядро, ик — инфицированная клетка, ник — неинфицированная клетка; стрелки — инфекционные нити; наконечники стрелок — инфекционные капли.

Масштабная линейка А, Б 100 мкм; В–Е 10 мкм

4.5. Анализ влияния температуры на клубенькообразование

Ранее уже упоминалось, что развитие двух типов клубеньков, определяемых мутациями в гене *Sym40*, может быть связано с тем, что фенотипическое проявление этих мутаций зависит от изменчивости факторов окружающей среды: температуры и освещенности (Tsyganov *et al.*, 1998). В нашем исследовании была проверена гипотеза о влиянии температуры на способность мутантов образовывать эффективные клубеньки. Растения гороха выращивали при двух типах температурного режима. В ходе первого эксперимента в ночное время (с 23:00 до 7:00) в климатической камере с растениями исходной линии SGE и линиями мутантов SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) и SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*), инокулированными штаммом 3841 или 1026, поддерживалась температура 10 °С.

В первом опыте никакого влияния пониженной температуры установлено не было: не выявлены признаки стресса под действием пониженной температуры и не выявлены признаки замедления роста; клубеньки у исследуемых образцов не отличались от клубеньков, образованных на растениях, выращенных в стандартных условиях. Второй опыт проводился при более низких ночных температурах. В ходе него в ночное время (с 23:00 до 7:00) в климатической камере с растениями исходной линии и линиями мутантов, инокулированными штаммом 3841 или штаммом 1026, поддерживалась температура 5 °С.

К концу второго опыта визуально наблюдались признаки замедления роста: побеги растений исходной линии были значительно ниже, чем выросшие в стандартных условиях, и ветвились у основания. Растения мутантных линий характеризовались низкорослостью, они так же кустились, формируя до 5 мелких побегов. Клубеньки на горохе линии SGE были крупные, розовые; у мутантов обнаружены немногочисленные мелкие белые клубеньки (рис. 9). Подобный эффект наблюдался при инокуляции обоими штаммами.

В результате опыта не были обнаружены розовые клубеньки у мутантов SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) и SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*). Таким образом, полученные данные не подтверждают гипотезу о возможности супрессировать мутации в гене *Sym40* действием пониженных температур.



Рис. 9. Растения гороха, выращенные при ночной температуре 5 °С; инокуляция штаммом 1026:

А–В — общий вид растений; Г–Е — общий вид корней и клубеньков. А, Г — линия дикого типа SGE; Б, Д — мутант SGEFix⁻¹ (*sym40-1*); В, Е — мутант SGEFix⁻⁶ (*sym40-2*). Стрелки — розовые клубеньки; наконечники стрелок — белые клубеньки. Масштабная линейка А–В 2 см; Г–Е 2 мм

4.6. Анализ влияния обработки синтетическим цитокинином на проявление мутантного фенотипа

У растений линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*), образующих гипертрофированные инфекционные капли, в инфекционных структурах не выявляется транспортная форма цитокининов — транс-зеатин (неопубликованные данные П.Г. Кусакина). Для клубенька мутанта в целом характерен аномальный паттерн распределения транс-зеатина.

Для оценки влияния цитокининов на развитие клубеньков растения-мутанты обрабатывали синтетическим аналогом цитокининов — БАП. Предполагалось, что обработка БАП приведет к ограничению роста инфекционных структур. Поскольку растворителем для БАП служит 1 М NaOH, для контроля было решено обрабатывать растения 0,01 М NaOH (соответствует наибольшей концентрации NaOH в растворе для полива опытных образцов), чтобы исключить влияние растворителя на результаты.

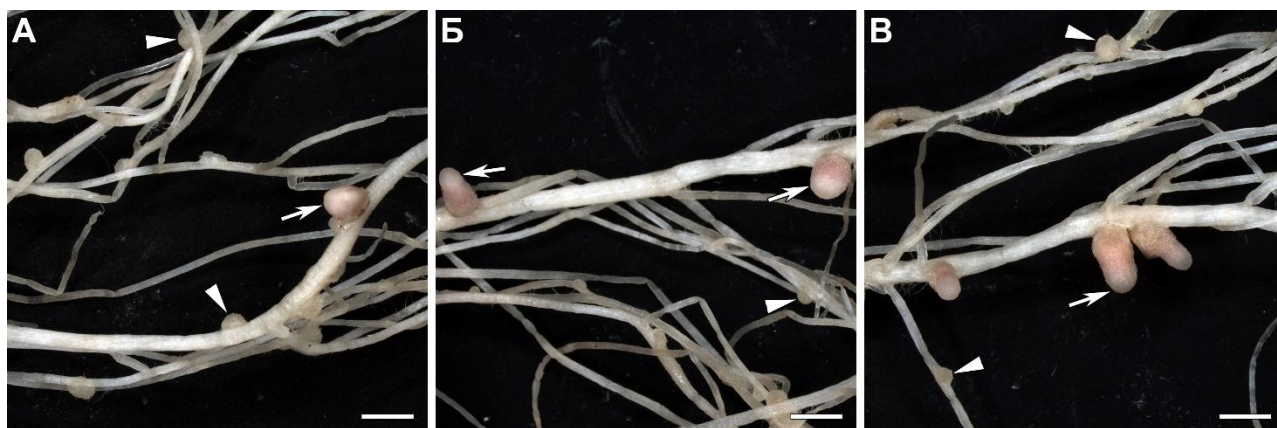


Рис. 10. Общий вид корней гороха линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) с розовыми клубеньками:

А — инокуляция штаммом 3841 и обработка 0,01 М NaOH; Б — инокуляция выделенным изолятом; В — повторная инокуляция изолятом NaPi1.

Стрелки — розовые клубеньки; наконечники стрелок — белые клубеньки.

Масштабная линейка 2 мм

В опытном варианте наше предположение не подтвердилось; влияния обработки БАП выявлено не было (данные не представлены). Однако в контроле было обнаружено растение, сформировавшее наряду с мелкими белыми клубеньками и крупный розовый (рис. 10 А). Из розового клубенька был выделен изолят, при повторной инокуляции которым у растений линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) на корнях формировались отдельные розовые клубеньки (рис. 10 Б, В). Количество образовавшихся розовых клубеньков уступало количеству мелких белых, однако их соотношение все же свидетельствует о неслучайном характере изменения

фенотипа (табл. 4). Более того, измененный фенотип наблюдался и в последующих опытах, проведенных с использованием этого изолята (рис. 10 В), получившего обозначение NaPi1.

Таблица 4. Соотношение розовых и белых клубеньков у растений линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*), инокулированных изолятом бактерий NaPi1.

Образец	Число белых клубеньков	Число розовых клубеньков
1	87	1
2	62	3
3	98	0
4	83	1
5	44	3
6	62	2
7	70	8

Феномен образования розовых клубеньков на корнях мутантных растений был описан ранее при использовании эффективного штамма 1026, они характеризовались гистологической организацией, сходной с таковой у дикого типа (Tsyganov *et al.*, 1998).

В нашей работе был проведен гистологический анализ организации розовых и белых клубеньков, полученных при инокуляции изолятом NaPi1.

Анализ розовых клубеньков выявил схожесть их гистологической организации с клубеньками дикого типа (рис. 5 А и рис. 11 А, В), а анализ белых клубеньков — с клубеньками мутантной линии (рис. 5 Б и рис. 11 Б, Г).

Таким образом, в ходе опыта был получен изолят NaPi1, способный не полностью супрессировать мутантный фенотип. При инокуляции этим изолятом на мутанте SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) формируется два типа клубеньков — крупные розовые и мелкие белые.

4.7. Иммунолокализация абсцизовой кислоты

Как уже отмечалось выше, фитогормоны играют важную роль в формировании и нормальном функционировании клубеньков. Стрессовые гормоны являются негативными регуляторами клубенькообразования (Цыганова, Цыганов, 2018).

В работе была проанализирована локализация АБК в клубеньках линии дикого типа SGE и мутантной линии SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) при инокуляции штаммом 3841, а также изолятом бактерий NaPi1, описанном в пункте 4.6.

В 4-недельных клубеньках дикого типа SGE, образованных штаммом 3841 максимум

сигнала АБК наблюдался в клетках меристемы и зоны инфекции, в то время как в зоне азотфиксации уровень сигнала значительно снижался (рис. 12 А–В и рис. 13 А–Е). В клубеньках, сформированных штаммом 3841 на растениях мутантной линии *SGEFix⁻¹* (*sym40-1*), уровень сигнала был значительно ниже, чем в клубеньках дикого типа, и в основном наблюдался по периферии клубенька (рис. 12 Г–Е). В розовых клубеньках, образованных изолятом NaPi1 на растениях мутантной линии *SGEFix⁻¹* (*sym40-1*), характер распределения АБК был сходен с таковым в клубеньках дикого типа (рис. 12 Ж–И). В белых клубеньках, образованных изолятом NaPi1 на растениях мутантной линии *SGEFix⁻¹* (*sym40-1*), сигнал АБК наблюдался в клетках меристемы, зоны инфекции и клубеньковой паренхимы (рис. 12 К–М).

В клубеньках дикого типа линии SGE, образованных штаммом 3841, АБК локализовалась в цитоплазме и отсутствовала в ядрах инфицированных клеток в зоне инфекции (рис. 13 А–В) и зоне азотфиксации, хотя в последней уровень сигнала был значительно ниже (рис. 13 Г–Е). В розовых клубеньках, сформированных изолятом NaPi1 на растениях *SGEFix⁻¹* (*sym40-1*) были обнаружены клетки, содержащие крупные инфекционные капли с интенсивной меткой АБК (рис. 13 Ж–И). В более проксимальной области наряду с клетками, содержащими разветвленные инфекционные нити и гипертрофированные инфекционные капли, присутствовали инфицированные клетки, в которых уровень сигнала АБК был значительно снижен (рис. 13 К–М), в отличие от инфицированных клеток из зоны инфекции линии SGE (рис. 13 А–В).

В белых клубеньках мутанта *SGEFix⁻¹* (*sym40-1*), образованных изолятом бактерий NaPi1, максимум сигнала АБК был ассоциирован с инфекционными каплями (рис. 14 Г–Е), в то время как в клубеньках, образованных штаммом 3841, сигнал в инфекционных структурах практически отсутствовал (рис. 14 А–В).

Уровень АБК в клетках способен быстро изменяться под воздействием различных стрессовых факторов, что может приводить к включению механизмов адаптации в ответ на неблагоприятные воздействия среды или проникновение патогенных микроорганизмов (Шакирова, 2001). Таким образом, вероятно, наблюдаемое нами накопление абсцизовой кислоты связано с выходом ризобий из инфекционных капель в цитоплазму растительных клеток. Известно, что процесс развития симбиотической инфекции сопровождается индукцией защитных реакций, хотя их проявление выражено слабее, по сравнению с патогенезом. Причем защитные реакции могут индуцироваться не только на ранних, но и на поздних стадиях развития клубеньков (Berrabah *et al.*, 2015; Ivanova *et al.*, 2015). Очевидно,

выход бактерий индуцирует накопление в инфицированных клетках абсцизовой кислоты, что может рассматриваться как еще одно проявление защитных реакций при развитии симбиотического клубенька на поздних стадиях.

Ранее было показано, что в клубеньках гороха и сои уровень АБК превышает таковой в корнях, что указывает на позитивную роль АБК в развитии клубенька, однако точная функция АБК не выявлена (Ferguson, Mathesius, 2003). Таким образом, АБК проявляет на клубенькообразование как негативный (Цыганова, Цыганов, 2018), так и позитивный эффект (Ferguson, Mathesius, 2003).

Присутствие в розовых клубеньках мутанта *SGEFix⁻¹ (sym40-1)* двух типов клеток — инфицированных и неинфицированных, содержащих множественные инфекционные нити и гипертрофированные инфекционные капли, говорит о неполной супрессии мутантного фенотипа. На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что фенотипические проявления мутации в транскрипционном факторе PsEFD у гороха могут быть супрессирована ризобиями лишь частично.

В дальнейшем представляется необходимым провести очистку полученного в ходе работы изолята и секвенирование его генома. Полученные данные помогут лучше понять причины, приводящие к неполной супрессии мутантного фенотипа.

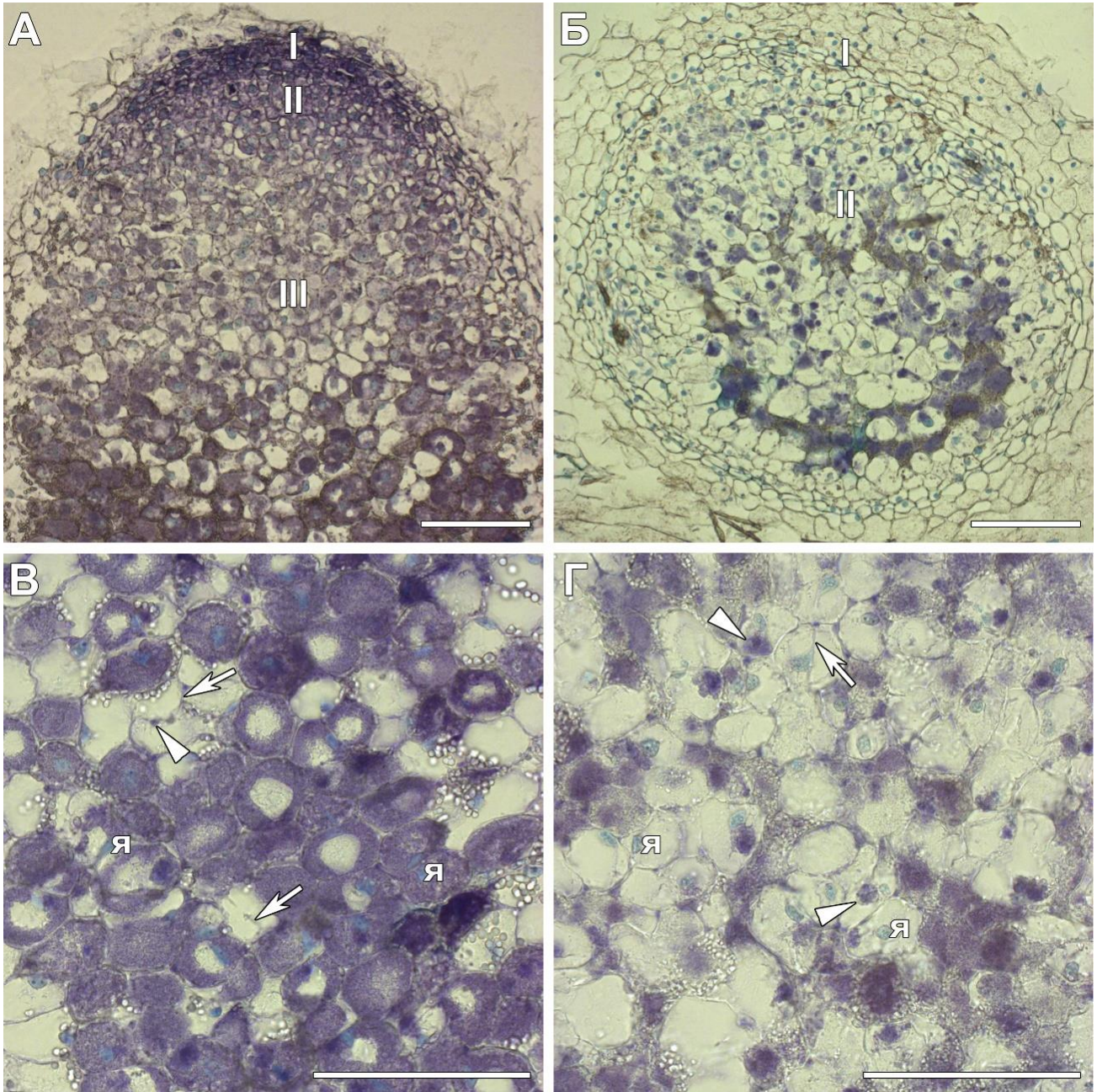


Рис. 11. Гистологическая структура клубеньков мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40-1*); инокуляция изолятом бактерий NaP1:

А, В — розовый клубенек; Б, Г — белый клубенек. А, Б — общий вид клубенька; В — зона, соответствующая зоне азотфиксации у дикого типа; Г — зона инфекции.

І — меристема, ІІ — зона инфекции, ІІІ — зона азотфиксации; я — ядро; стрелки — инфекционные нити; наконечники стрелок — инфекционные капли.

Масштабная линейка 150 мкм

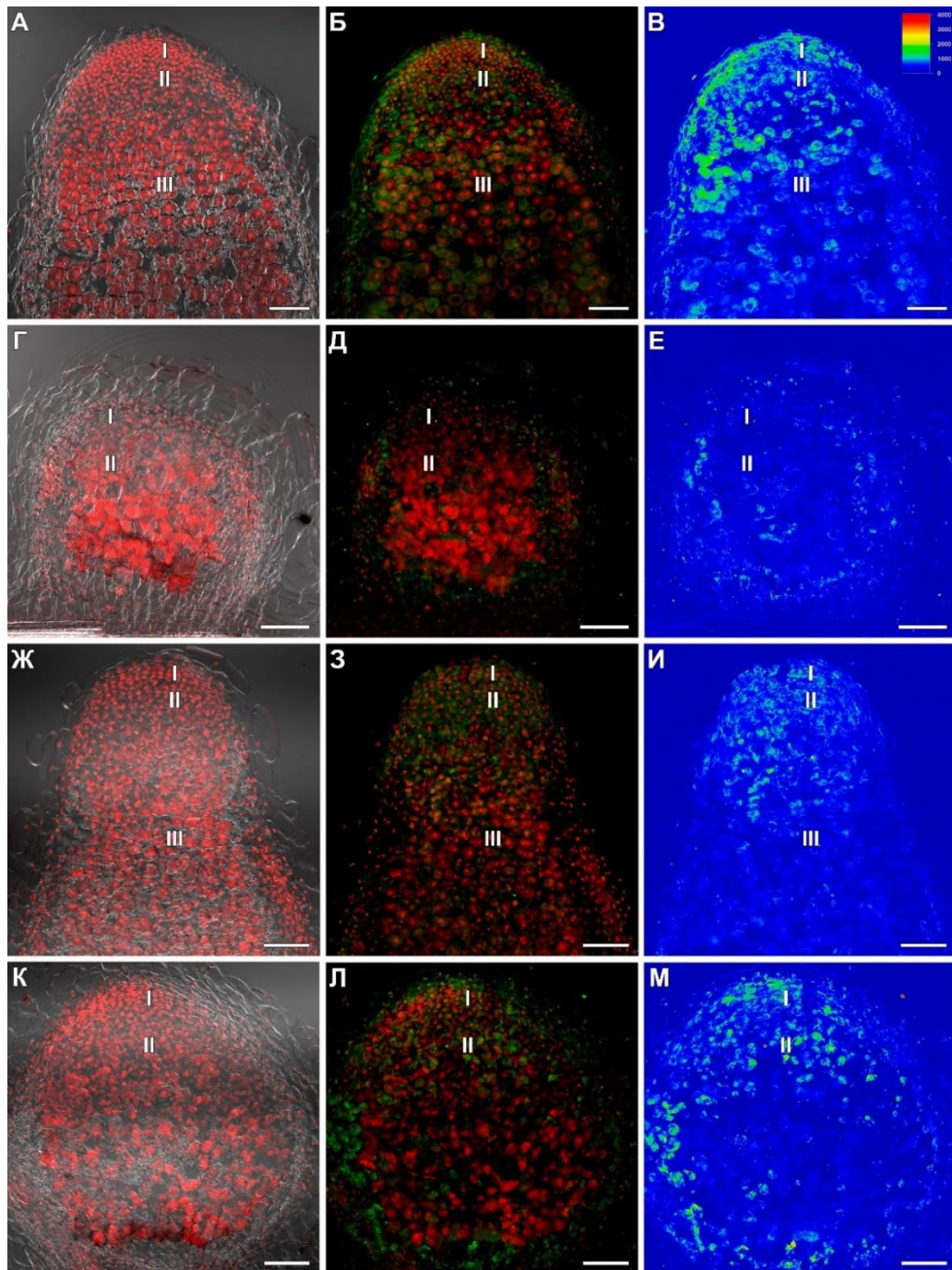


Рис. 12. Иммунолокализация АБК в 4-недельных клубеньках гороха линии дикого типа SGE (А–В) и мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) (Г–М):

А–Е — инокуляция штаммом 3841; Ж–М — инокуляция изолятом бактерий NaPi1.

Наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала — А, Г, Ж и К; наложение зеленого и красного каналов — Б, Д, З и Л. Тепловая карта интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (синий цвет соответствует минимальной интенсивности сигнала, красный — максимальной) — В, Е, И и М.

Зеленый канал — АБК; красный — ДНК (ядра и бактерии). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации.

Масштабная линейка 100 мкм

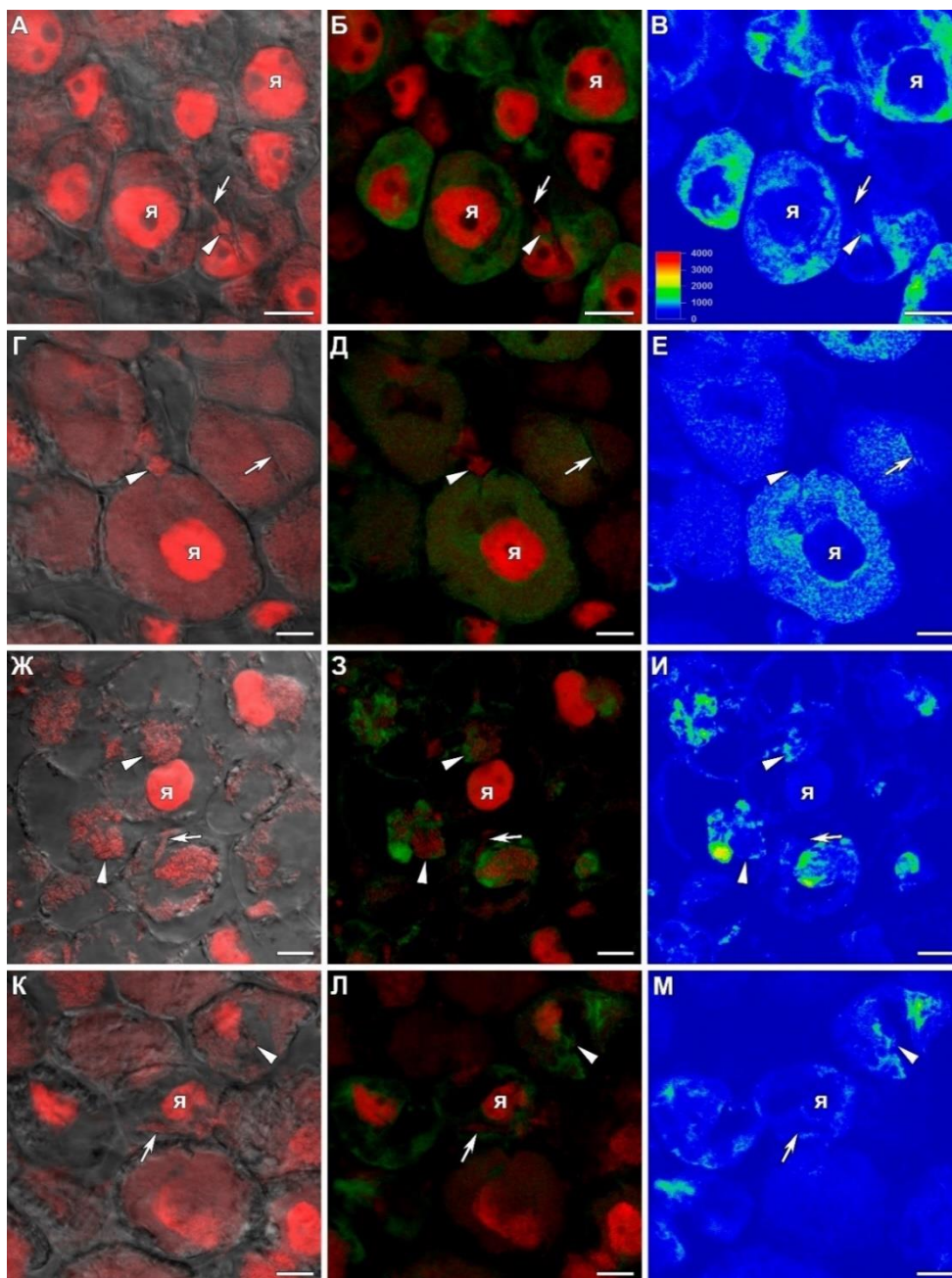


Рис. 13. Иммунолокализация АБК в клетках 4-недельных клубеньков гороха линии дикого типа SGE (А–Е) и мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40-1*) с розовыми клубеньками (Ж–М):

А–Е — инокуляция штаммом 3841; Ж–М — инокуляция изолятом бактерий NaPi1. А–В, Ж–И — зона инфекции; Г–Е — зона азотфиксации; К–М — зона, соответствующая зоне азотфиксации у дикого типа.

Наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала — А, Г, Ж и К; наложение зеленого и красного каналов — Б, Д, З и Л. Тепловая карта интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (синий цвет соответствует минимальной интенсивности сигнала, красный – максимальной) — В, Е, И и М.

Зеленый канал — АБК; красный — ДНК (ядра и бактерии). я — ядро; стрелки — инфекционные нити; наконечники стрелок — инфекционные капли.

Масштабная линейка 10 мкм

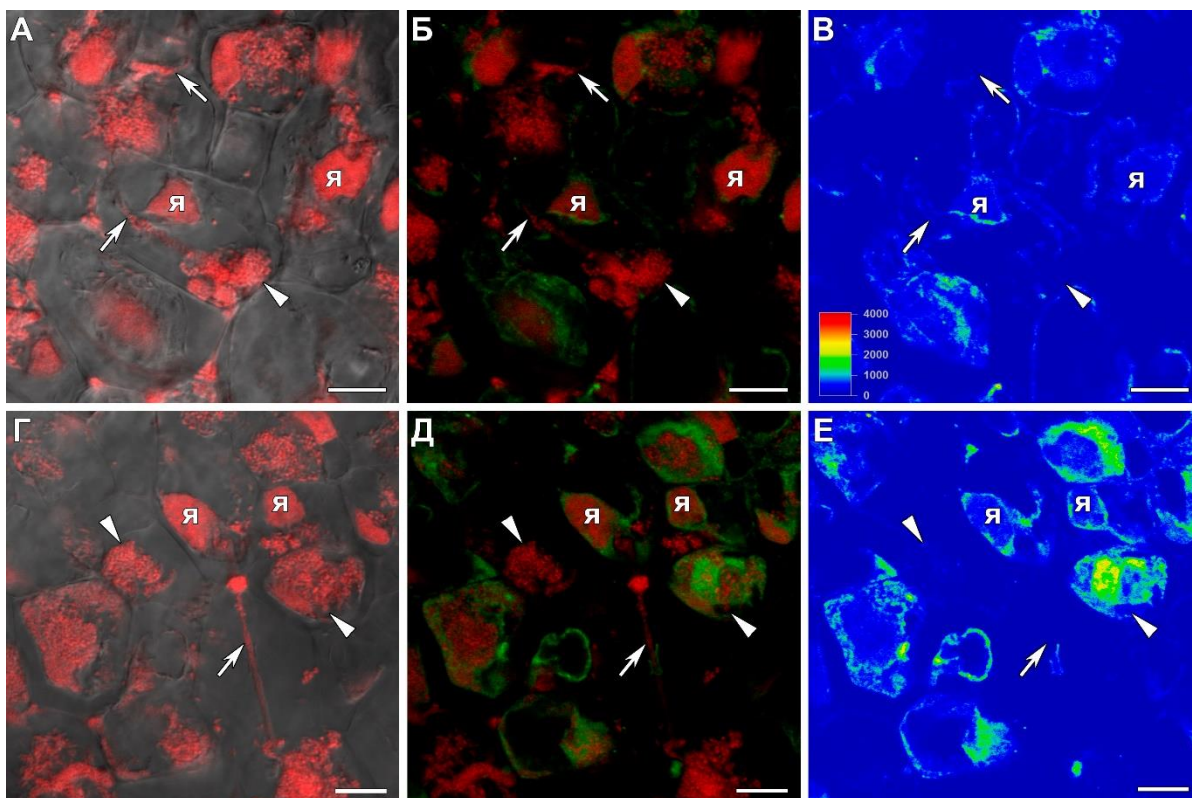


Рис. 14. Иммулокализация АБК в клетках зоны инфекции 4-недельных клубеньков гороха мутанта SGEFix-1 (*sym40-1*):

А–В — инокуляция штаммом 3841; Г–Е — инокуляция изолятом бактерий NaPi1.

Наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала — А, Г; наложение зеленого и красного каналов — Б, Д. Тепловая карта интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (синий цвет соответствует минимальной интенсивности сигнала, красный – максимальной) — В, Е.

Зеленый канал — АБК; красный — ДНК (ядра и бактерии). я — ядро; стрелки — инфекционные нити; наконечники стрелок — инфекционные капли.

Масштабная линейка 10 мкм

Выводы

1. Фенотипы мутантов гороха *sym40* не супрессируются полностью ни одним из проанализированных штаммов *Rhizobium*, что может свидетельствовать о значительном нарушении функционирования продукта этого гена — транскрипционного фактора PsEFD. Частично мутантный фенотип *sym40-1* супрессируется изолятом NaPi1.

2. Абсцизовая кислота участвует в функционировании клубеньков гороха, о чем свидетельствует ее накопление в меристеме и зоне инфекции, а также снижение ее уровня в аномально организованных клубеньках у мутанта *sym40-1*.

Список литературы

1. Долгих Е.А., Кириенко А.Н., Лепянен И.В. и др. Роль фитогормонов в контроле развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. Сообщение II. Ауксины (Обзор) // Сельскохозяйств. биол. 2016. Т. 51. № 5. С. 585–592.
2. Ермилова Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. СПб: ХИМИЗДАТ, 2012. 344 с.
3. Китаева А.Б., Кусакин П.Г., Демченко К.Н. и др. Методические особенности изучения тубулинового цитоскелета в клубеньках бобовых растений // Сельскохозяйств. биол. 2018. Т. 53. № 3. С. 634–644.
4. Медведев С.С. Физиология растений: учебник. СПб: БХВ-Петербург, 2012. 512 с.
5. Неманкин Т.А. Анализ генетической системы гороха (*Pisum sativum* L.), контролирующей развитие арбускулярной микоризы и азотфиксирующего симбиоза: дис. ... канд. биол. наук // СПб. 2011.
6. Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов. Т. 2. СПб: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2007. 331 с.
7. Тихонович И.А., Андронов Е.Е., Борисов А.Ю. и др. Принцип дополнительности геномов в расширении адаптационного потенциала растений // Генетика. 2015. Т. 51. № 9. С. 831–846.
8. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Молекулярные стратегии и сельскохозяйственное использование растительно-микробных симбиозов // Экол. генетика. 2008. Т. 6. № 2. С. 49–60.
9. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. СПб: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2009. 210 с.
10. Цыганов В.Е. Молекулярно-генетические и клеточные механизмы дифференцировки симбиотического клубенька: дис. ... док. биол. наук // СПб. 2018.
11. Цыганов В.Е., Ворошилова В.А., Розов С.М. и др. Новая серия симбиотических мутантов гороха, индуцированная на линии SGE // Экол. генетика. 2012. Т. 10. № 1. С. 19–26.
12. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями // Усп. совр. биол. 2012. Т. 132. № 2. С. 211–222.
13. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. II. Салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты (Обзор) // Сельскохозяйств. биол. 2018. Т. 53. № 1. С. 3–14.
14. Четкова С.А., Тихонович И.А. Выделение и исследование штаммов *Rhizobium leguminosarum*, эффективных на горохах афганского происхождения // Пром. Микробиол. 1986. Т. 55. С. 143–147.
15. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: «Гилем», 2001. 160 с.
16. Adams V., Li J., Wisniewski J.A. *et al.* Virulence plasmids of spore-forming bacteria //

Microbiol. Spectr. 2014. V. 2. № 6. P. 413–422.

17. Altieri M.A. *Agroecology: The Science of Sustainable Agriculture*. Second Edition. Boca Raton: CRC Press, 2018. 448 p.
18. Alves L.M.C., de Souza J.A.M., Varani A.M. *et al.* The family *Rhizobiaceae* // In: *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Eds. Rosenberg E. *et al.* Berlin: Springer, 2014. P. 419–437.
19. Andriankaja A., Boisson-Dernier A., Frances L. *et al.* AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor – dependent Mt *ENOD11* activation in root hairs via a novel *cis*-regulatory motif // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 2866–2885.
20. Beringer J. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* // *J. Gen. Microbiol.* 1974. V. 84. P. 188–198.
21. Berrabah F., Ratet P., Gourion B. Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. № 7. P. 1977–1985.
22. Borisov A.Y., Rozov S.M., Tsyganov V.E. *et al.* Sequential functioning of *Sym-13* and *Sym-31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // *Mol. Gen. Genet.* 1997. V. 254. № 5. P. 592–598.
23. Brewin N.J. Development of the legume root nodule // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991. V. 7. P. 191–226.
24. Brewin N.J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis // *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2004. V. 23. № 4. P. 293–316.
25. Conway G.R., Barbier E.B. *After the Green Revolution: Sustainable agriculture for development*. London: Earthscan, 2013. 212 p.
26. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated // *Crit. Rev. Microbiol.* 1995. V. 21. P. 1–18.
27. Ding Y., Kalo P., Yendrek C. *et al.* Abscisic acid coordinates Nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula* // *Plant Cell*. 2008. V. 20. P. 2681–2695.
28. Escandón M., Cañal M.J., Pascual J. *et al.* Integrated physiological and hormonal profile of heat-induced thermotolerance in *Pinus radiata* // *Tree Physiol.* 2016. V. 36. P. 63–77.
29. Evans H.J., Palacios R., Jaime M. *et al.* *New Horizons in Nitrogen Fixation: Proceedings of the 9th International Congress on Nitrogen Fixation*. Cancun: Springer, 1993. P. 183.
30. Fåhræus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique // *Microbiology*. 1957. V. 16. № 2. P. 374–381.
31. Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S. *et al.* Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. № 1. P. 61–76.
32. Ferguson B.J., Mathesius U. Signaling interactions during nodule development // *J. Plant Growth Regul.* 2003. V. 22. № 1. P. 47–72.
33. Ferguson B.J., Mathesius U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions // *J. Chem. Ecol.* 2014. V. 40. № 7. P. 770–790.

34. Fliegmann J., Bono J. Lipo-chitooligosaccharidic nodulation factors and their perception by plant receptors // *Glycoconj. J.* 2015. V. 32. № 7. P. 455–464.
35. Gonzalez-Rizzo S., Crespi M., Frugier F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti* // *Plant Cell.* 2006. V. 18. № 10. P. 2680–2693.
36. Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J. *et al.* 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.
37. Jardinaud M.F. MtEFD, a *Medicago truncatula* ERF transcription factor regulating symbiotic nodule differentiation in a bacterial strain-specific way // In: *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses.* Dordrecht: Springer, 2017. P. 151.
38. Jin Y., Liu H., Luo D. *et al.* DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways // *Nature Commun.* 2016. V. 7. P. 1–14.
39. Jochum T., Fastnacht A., Trumbore S.E. *et al.* Direct raman spectroscopic measurements of biological nitrogen fixation under natural conditions: an analytical approach for studying nitrogenase activity // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 2. P. 1117–1122.
40. Kirienko A.N., Porozov Y.B., Malkov N.V. *et al.* Role of a receptor-like kinase K1 in pea *Rhizobium* symbiosis development // *Planta.* 2018. V. 248. № 5. P. 1101–1120.
41. Kisiala A., Laffont C., Emery R.J.N. *et al.* Bioactive cytokinins are selectively secreted by *Sinorhizobium meliloti* nodulating and nonnodulating strains // *Mol. Plant–Microbe Interact.* 2013. V. 26. № 10. P. 1225–1231.
42. Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A. *et al.* Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: Bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements // *New Phytol.* 2016. V. 210. № 1. P. 168–183.
43. Kosterin O.E., Rozov S.M. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I // *Pisum Genet.* 1993. V. 25. № 8. P. 27–31.
44. Kuykendall L.D. *Rhizobiales* ord. nov // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2015a. Online © 2015 Bergey's Manual Trust.
45. Kuykendall L.D. *Rhizobiaceae* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2015b. Online © 2015 Bergey's Manual Trust.
46. Kuykendall L.D., Young J.M., Martínez-Romero E. *et al.* *Rhizobium* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2015. Online © 2015 Bergey's Manual Trust.
47. Lal R. Soils and sustainable agriculture. // *Agron. Sustain. Dev.* 2008. V. 28. P. 57–64.
48. Libbenga K.R., Harkes P.A.A. Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum* L. // *Planta.* 1973. V. 114. P. 17–28.
49. Lie T.A. Symbiotic specialisation in pea plants: The requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from Afghanistan // *Proc. Assoc. Appl. Biol.* 1976. V. 88. № 3. P. 462–465.
50. Lorteau M.A., Ferguson B.J., Guinel F.C. Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle // *Physiol. Plant.* 2001. V. 112. № 3. P. 421–

51. MacLean A.M., Finan T.M., Sadowsky M.J. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes // *Plant Physiol.* 2007. V. 144. № 2. P. 615–622.
52. Mahanty T., Bhattacharjee S., Goswami M. *et al.* Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 24. № 4. P. 3315–3335.
53. Maróti G., Kondorosi É. Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: Are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 1–6.
54. Marsch-Martinez N., Greco R., Beckeret J.D. *et al.* *BOLITA*, an Arabidopsis AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways // *Plant Mol. Biol.* 2006. V. 62. P. 825–843.
55. Messinese E., Mun J., Yeunet L.H. *et al.* A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula* // *Mol. Plant–Microbe Interact.* 2007. V. 20. № 8. P. 912–921.
56. Miller J.B., Pratap A., Miyahara A. *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling // *Plant Cell.* 2013. V. 25. № 2. P. 5053–5066.
57. Minchin F., James E., Becana M. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules // In: *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Eds. Dilworth, M.J. *et al.* Berlin: Springer, 2008. P. 321–362.
58. Morzhina E.V., Tsyganov V.E., Borisov A.Y. *et al.* Four developmental stages identified by genetic dissection of pea (*Pisum sativum* L.) root nodule morphogenesis // *Plant Sci.* 2000. V. 155. № 1. P. 75–83.
59. Mousavi S.A., Willems A., Nesme X. *et al.* Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations // *Syst. Appl. Microbiol.* 2015. V. 38. № 2. P. 84–90.
60. Nash J.H.E., Ma S., Iyer V.N. Characterization of Sym plasmids of *Rhizobium leguminosarum* strains able to nodulate *Pisum sativum* cv Afghanistan // *Plant Mol. Biol.* 1988. V. 11. P. 427–432.
61. van Noorden G.E., Ross J.J., Reid J.B. *et al.* Defective long-distance auxin transport regulation in the *Medicago truncatula* super numeric nodules mutant // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. № 4. P. 1494–1506.
62. Oldroyd G.E.D., Murray J.D., Poole P.S. *et al.* The rules of engagement in the legume–rhizobial symbiosis // *Annu. Rev. Genet.* 2011. V. 45. № 1. P. 119–144.
63. Oldroyd G.E.D. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants // *Nature Rev. Microbiol.* 2013. V. 11. № 4. P. 252–263.
64. Ormeño-Orrillo E., Servín-Garciduñas L.E., Rogel M.A. *et al.* Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics // *Syst. Appl. Microbiol.* 2015. V. 38. № 4. P. 287–291.

65. Pan H., Stonoha-Arther C., Wang D. Plants control nodulation by regulating proteolysis of the receptor-like kinase DMI2 // *Plant Physiol.* 2018. V. 177. № 2. P. 792–802.
66. Pershina E.V., Ivanova E.A., Korvigo I.O. *et al.* Investigation of the core microbiome in main soil types from the East European plain // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 631–632. P. 1421–1430.
67. Plet J., Wasson A., Ariel F. *et al.* MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula* // *Plant J.* 2011. V. 65. P. 622–633.
68. Provorov N.A., Tikhonovich I.A. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2003. V. 50. № 1. P. 89–99.
69. Ridge R.W., Rolfe B.G. *Rhizobium sp.* degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. V. 50. № 3. P. 717–720.
70. Rightmyer A.P., Long S.R. Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncatula* in response to auxin transport inhibitors // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2011. V. 24. № 11. P. 1372–1384.
71. Rodríguez-Navarro D.N., Dardanelli M.S., Ruíz-Saíñz J.E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants // *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. V. 272. P. 127–136.
72. Rubiales D., Mikic A. Introduction: Legumes in sustainable agriculture // *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2015. V. 34. P. 2–3.
73. Rungruangmaitree R., Jiraungkoorskul W. Pea, *Pisum sativum*, and its anticancer activity // *Pharmacogn. Rev.* 2017. V. 11. № 21. P. 39–42.
74. Schlaman H.R.M., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. Regulation of nodulation gene expression by *nodD* in rhizobia // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. № 16. P. 5177–5182.
75. Serova T.A., Tsyganova A. V, Tsyganov V.E. Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages // *Protoplasma.* 2018. V. 255. № 5. P. 1443–1459.
76. Singh S., Katzer K., Lambert J. *et al.* CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development // *Cell Host Microbe.* 2014. V. 15. № 2. P. 139–152.
77. Spink H., Kondrosi A., Hooykaas P. *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. 566 p.
78. Spink H., Sheeley D.M., van Brussel A.A.N. *et al.* A novel highly saturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium* // *Nature.* 1991. V. 354. P. 125–130.
79. Stagnari F., Maggio A., Galieni A. *et al.* Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview // *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2017. V. 4. № 2. P. 1–13.
80. Sullivan J.T., Brown S.D., Ronson C.W. The NifA-RpoN regulon of *Mesorhizobium loti* strain R7A and its symbiotic activation by a novel LacI/GalR- family regulator // *PLoS ONE.* 2013. V. 8. № 1. P. e53762.
81. Suzuki A., Akune M., Kogiso M. *et al.* Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. № 7. P. 914–

82. Suzaki T., Kawaguchi M. Root nodulation: A developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2014. V. 21. P. 16–22.
83. Szczyglowski K., Shaw R.S., Wopereis J. *et al.* Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus* // *Mol. Plant–Microbe Interact.* 1998. V. 11. № 7. P. 684–697.
84. Tikhonovich I.A., Provorov N.A. Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion // *Ann. Appl. Biol.* 2011. V. 159. P. 155–168.
85. Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y. *et al.* The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Mol. Gen. Genet.* 1998. V. 259. № 5. P. 491–503.
86. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Herrera-Cervera J.A. *et al.* Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum* // *New Phytol.* 2003. V. 159. № 2. P. 521–530.
87. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Priefer U.B. *et al.* Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis // *Ann. Bot.* 2002. V. 89. № 4. P. 357–366.
88. Vance C.P. Carbon and nitrogen metabolism in legume nodule // In: *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Eds. Dilworth, M.J. *et al.* Berlin: Springer, 2008. P. 293–320.
89. Vance C.P., Gantt J.S. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. // *Physiol. Plant.* 1992. V. 85. № 2. P. 266–274.
90. Vasse J., de Billy F., Camut S. *et al.* Correlation between ultrastructural differentiation of bacterioids and nitrogen fixation in alfalfa nodules // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. № 8. P. 4295–4306.
91. Vasse J., de Billy F., Truchet G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti* — alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction // *Plant J.* 1993. V. 4. № 3. P. 555–566.
92. Vedam V., Haynes J.G., Kannenberg E.L. *et al.* A *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide lipid-A mutant induces nitrogen-fixing nodules with delayed and defective bacteroid formation. // *MPMI.* 2004. V. 17. № 3. P. 283–291.
93. Van de Velde W., Zehirov G., Szatmari A. *et al.* Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis // *Science.* 2010. V. 327. P. 1122–1126.
94. Vernie T., Moreau S., de Billy F. *et al.* EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula* // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 2696–2713.
95. Vitha S., Mews M., Volkmann D. Immunofluorescence detection of F-actin on low melting point wax sections from plant tissues // *J. Histochem. Cytochem.* 1997. V. 45. № 1. P. 89–95.
96. Voroshilova V.A., Boesten B., Tsyganov V.E. *et al.* 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* // Mol. Plant–Microbe Interact. 2001. V. 14. № 4. P. 471–476.
97. Voroshilova V.A., Demchenko K.N., Brewin N.J. *et al.* Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads // New Phytol. 2009. V. 181. № 4. P. 913–923.
98. de Vries F.T., Bardgett R.D. Plant-microbial linkages and ecosystem nitrogen retention: Lessons for sustainable agriculture // Front. Ecol. Environ. 2012. V. 10. № 8. P. 425–432.
99. Yang C., Bueckert R., Schoenau J. *et al.* Symbiosis of selected *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains with diverse pea genotypes: effects on biological nitrogen fixation // Can. J. Microbiol. 2017. V. 63. № 11. P. 909–919.
100. Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H. *et al.* The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development // Mol. Plant-Microbe Interact. 2008. V. 21. № 12. P. 1600–1608.
101. Zipfel C., Oldroyd G.E.D. Plant signalling in symbiosis and immunity // Nature. 2017. V. 543. № 7645. P. 328–336.

Приношу особую благодарность моему научному консультанту — Цыганову Виктору Евгеньевичу под руководством которого была выполнена данная работа.

Приношу благодарность сотрудникам лаборатории молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ за сотрудничество, помощь и ценные советы, в особенности: Петру Глебовичу Кусакину, Анне Борисовне Китаевой, Кире Андреевне Ивановой и другим.

Я благодарю преподавателей биологического факультета СПбГУ за те знания, которыми они делились со мной на протяжении четырех лет моей учебы.

Я благодарен преподавателям и сотрудникам кафедры микробиологии, показавшим мне, насколько удивительными бывают микроорганизмы.

Я благодарен своему школьному учителю биологии — Васильевой Ольге Ивановне за привитый интерес к науке.

Особую признательность хочется высказать моим родителям Киричеку Андрею Николаевичу и Киричек Инне Николаевне за их любовь, заботу и поддержку.