

На правах рукописи



Иванова Кира Андреевна

**Роль низкомолекулярных тиолов в развитии и функционировании эффективных и неэффективных симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.)**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

Научный руководитель

доктор биологических наук,  
**Цыганов Виктор Евгеньевич**

Официальные оппоненты:

**Топунов Алексей Федорович**  
доктор биологических наук  
Федеральное государственное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы  
биотехнологии» Российской академии  
наук», институт биохимии им. А.Н. Баха,  
заведующий лабораторией

**Емельянов Владислав Владимирович,**  
кандидат биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Санкт-Петербургский  
государственный университет», доцент

Ведущая организация

**Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки Казанский  
институт биохимии и биофизики  
Казанского научного центра Российской  
академии наук**

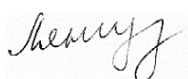
Защита состоится 24 ноября 2021 г. в 14.00 часов на заседании совета 24.1.002.02. при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2, тел. (812)372-54-42, факс (812)372-54-43, [dissovet.24100202@binran.ru](mailto:dissovet.24100202@binran.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (<https://www.binran.ru/dissertatsionnyye-sovety/dissovet-02/>).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Лянгузова Ирина Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Биологическая азотфиксация вносит существенный вклад в круговорот азота в природе. Бобовые растения обладают уникальной способностью вступать в симбиоз с азотфиксирующими бактериями, обобщенно называемыми ризобиями. В результате взаимодействия гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с почвенными бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на корнях растений образуются новые органы – клубеньки, при формировании которых можно проследить за такими процессами, как митотическая реактивация, пролиферация клеток меристемы клубенька, дифференцировка инфицированных клеток, связанная с повторяющимися циклами эндоредупликации, развитие защитных реакций и их подавление при совместимых взаимодействиях с бактериями, необратимая дифференцировка бактерий под действием растительных факторов в особую форму, фиксирующую атмосферный азот, называемую бактероидами (Frendo *et al.*, 2020; Tsyganova *et al.*, 2018). Таким образом, симбиотический клубенек является уникальной моделью для исследования ряда фундаментальных и прикладных вопросов биологии.

При формировании и функционировании такой чувствительной системы, как азотфиксирующий клубенек, окислительно-восстановительное состояние растительной клетки и ее компартментов, определяемое соотношением про- и антиоксидантов и их взаимодействием, контролирует множество процессов (Ribeiro *et al.*, 2015; Matamoros, Becana, 2020). Особого внимания заслуживает водорастворимый антиоксидант и окислительно-восстановительный буфер растений – низкомолекулярный тиол глутатион (GSH). GSH участвует в регуляции развития растений и реакциях на биотический и абиотический стресс (Maughan, Foyer, 2006; Noctor *et al.*, 2012; Frendo *et al.*, 2013), выполняя ряд уникальных функций, не позволяющих заменить его другим тиолом или антиоксидантом (Gest *et al.*, 2013; Foyer *et al.*, 2012; Noctor *et al.*, 2012). GSH может выступать в роли сигнальной молекулы, ферменты его биосинтеза и кодирующие их гены могут являться непосредственной мишенью гормон-индуцируемых ответов, кроме того, GSH напрямую взаимодействует с белками, изменяя их тиол-дисульфидный статус. Такие посттрансляционные модификации могут приводить к изменению активности белков, их стабильности или локализации. У бобовых растений обнаружен уникальный гомолог GSH – гомоглутатион (hGSH), который, вероятно, также участвует в процессах развития и адаптации к стрессу у растений, включая клубенькообразование. Известно, что увеличение содержания этих тиолов коррелирует с увеличением эффективности азотфиксации и увеличением экспрессии генов, участвующих в функционировании клубеньков (Dalton *et al.*, 1993; El Msehli *et al.*, 2011). Напротив, снижение эффективности связывания азота коррелирует со снижением уровней тиолов во время естественного и индуцированного старения клубеньков (Evans *et al.*, 1999; Matamoros *et al.*, 1999; Groten *et al.*, 2005; Marino *et al.*, 2007; Naya *et al.*, 2007).

Транскриптомный анализ растений *Medicago truncatula* с дефицитом синтеза тиолов показал, что на ранних этапах взаимодействия с клубеньковыми бактериями в инокулированных корнях активируются гены, участвующие в защитном ответе растений, особенно регулируемые салициловой кислотой (Pucciariello *et al.*, 2009). Эти результаты коррелируют с данными, полученными на других видах растений, что GSH необходим для оптимальной защиты растений от патогенов, являясь не только источником серы для синтеза вторичных метаболитов, но и участвуя в процессах передачи сигналов и изменении тиол-дисульфидного статуса некоторых белков (Tada *et al.*, 2008).

Эти данные показывают важность GSH и hGSH в развитии и функционировании клубеньков. Особенный интерес представляет неоднозначность функций этих тиолов, которые могут как выполняют роль антиоксидантов и окислительно-восстановительного буфера для нормального протекания высокочувствительных реакций симбиотической

фиксации азота, так и участвовать в индукции и супрессии защитных реакций, сопровождающих формирование клубенька.

**Цель и задачи работы.** Целью данной работы являлось выявление роли низкомолекулярных тиолов в развитии и функционировании эффективных и неэффективных симбиотических клубеньков *P. sativum*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Анализ проявлений защитных реакций в клубеньках неэффективных мутантов *P. sativum*.
2. Анализ уровней экспрессии генов ферментов биосинтеза GSH и hGSH и содержания GSH и hGSH в неинокулированных корнях, в эффективных и неэффективных клубеньках *P. sativum*.
3. Иммунолокализация GSH в эффективных и неэффективных клубеньках *P. sativum*.
4. Изучение влияния обработки ингибитором биосинтеза GSH и hGSH и экзогенным GSH на развитие эффективных и неэффективных клубеньков *P. sativum*.

**Научная новизна работы.** Выявлены новые фенотипические проявления мутаций *sym33-3* и *sym40-1*, связанные с индукцией защитных реакций – отложением суберина в тканях неэффективных клубеньков и увеличении экспрессии генов – маркеров защитных реакций *7RA84*, *HSR203J* и *ABR17*. Впервые показано, что соотношение GSH и hGSH в клубеньках *P. sativum* изменяется после выхода бактерий из инфекционных нитей, что является необходимым условием развития симбиотического клубенька. С использованием симбиотических мутантов *P. sativum* впервые показано, что индукция защитных реакций в неэффективных клубеньках сопровождается изменением в метаболизме GSH и hGSH. Впервые было продемонстрировано, что в неэффективных симбиотических клубеньках недостаток тиолов приводит к нарушению развития меристемы, роста инфекционных нитей и деления симбиосом, а в эффективных – к преждевременной деградациии симбиотических структур.

**Теоретическое и практическое значение.** Результаты диссертации внесли существенный вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов формирования симбиотического клубенька и координации его развития с защитными системами растения, осуществляемой в том числе посредством окислительно-восстановительного баланса с участием низкомолекулярных тиолов GSH и hGSH. Регулирование метаболизма тиолов в клубеньках и корнях бобовых растений может быть важным инструментом не только повышения эффективности симбиотической азотфиксации, но также устойчивости растений к патогенам. Кроме того, изучение параллелей между развитием симбиоза и патогенеза позволяет идентифицировать механизмы защиты растения, которые были использованы в ходе эволюции для развития симбиотических отношений и, соответственно, присутствуют не только у бобовых растений.

**Защищаемые положения диссертации.**

1. Мутации *P. sativum* по генам *sym33-3* и *sym40-1* приводят к восприятию микросимбионта в качестве потенциального патогена и переключению программы симбиоза на защитный ответ.
2. Изменения в активности генов биосинтеза тиолов и количестве GSH и hGSH с одной стороны являются частью программы развития симбиотического клубенька *P. sativum* после высвобождения бактерий из инфекционных нитей, с другой – вовлечены в защитные реакции, индуцируемые при неэффективном симбиозе.
3. В эффективных клубеньках *P. sativum* поддерживается более высокое соотношение GSH : hGSH, чем в неэффективных клубеньках и неинокулированных корнях, GSH необходим для функционирования меристемы клубенька и бактериоидов при эффективном симбиозе.

**Личный вклад соискателя.** Исследования, посвященные изучению роли низкомолекулярных тиолов в формировании и функционировании симбиотического

клубенька *P. sativum*, проведены лично автором. Исключение составляет количественная оценка содержания тиолов в образцах с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим детектированием, выполненная совместно с Русских Я.В. и Черновой Е.Н. в ФГБНУ НИЦЭБ РАН. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем работы.

**Степень достоверности.** Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием современных методик на высокотехнологичном оборудовании в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ и ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» ФГБНУ БИН РАН.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на 14-ти отечественных и международных конференциях, в том числе: II (X) Международной ботанической конференции молодых ученых (2012 г., Санкт-Петербург), 6-й Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (2012 г., Саратов), 18-й Международной Пушинской школы – конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (2014 г., Пушино), 6-м съезде ВОГиС (2014 г., Ростов-на-Дону), Международной конференции «Генетическая интеграция про- и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии» (2015 г., Санкт-Петербург), Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» и 8-м Съезде Общества физиологов растений России (2015 г., Петрозаводск), 19-м Международном конгрессе по азотфиксации (2015 г., Пасифик-Гроув, Калифорния, США), Научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (2016 г., Санкт-Петербург), IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (2016 г., Казань), 4-м Международном симпозиуме по сигналингу и поведению растений (2016 г., Санкт-Петербург), 20-м международном конгрессе по азотфиксации (2017 г., Гранада, Испания), Всероссийской научной конференции с международным участием и Школе молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (2018 г., Иркутск), 13-й Европейской конференции по азотфиксации (2018 г., Стокгольм, Швеция), Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (2019 г., Санкт-Петербург).

Данная работа была финансово поддержана Правительством Санкт-Петербурга (грантом 2014 года), Министерством образования и науки (государственные контракты №№ П1301, № 16.552.11.7085, № 14.607.21.0178, соглашения 8056, 8109), грантом Президента РФ (НШ-337.2012.4), Российским фондом фундаментальных исследований (14-04-00383), Российским научным фондом (14-24-00135, 17-76-30016).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 4 статьи из списка, рекомендованного ВАК, которые включены в международную базу Scopus.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов экспериментальной работы и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Диссертация изложена на 160 страницах, содержит 6 таблиц, 23 рисунка. Список литературы включает 337 наименований, из них 329 – на иностранном языке.

**Благодарности.** Автор выражает признательность и благодарность своему научному руководителю Цыганову В.Е. за обсуждение результатов, конструктивную критику данного исследования, за предоставление интересной темы диссертации и обеспечение условий для ее выполнения. Автор выражает благодарность своим коллегам,

сотрудникам лаборатории молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ Демченко К.Н., Цыгановой А.В., Китаевой А.Б., Серовой Т.А., Кусакину П.Г. и Горшкову А.П., а также сотрудникам других лабораторий ФГБНУ ВНИИСХМ Кулаевой О.А., Леппянен И.В., Кириенко А.Н. за помощь в рабочем процессе и дружескую атмосферу. Автор признательна сотрудникам центра коллективного пользования ФГБНУ ВНИИСХМ и Пинаеву А.Г., а также сотрудникам НИЦЭБ РАН Русских Я.В. и Черновой Е.Н. за помощь в проведении анализов в рамках данной работы. Автор выражает благодарность Долгих Е.А. за конструктивные замечания к проведенному исследованию и тексту диссертации.

Автор искренне благодарна своим родителям Ивановым М.Г. и А.В., сестре Переваловой О.А., а также Дмитриеву А.С. за безграничную любовь, заботу и поддержку. Автор искренне благодарна своим друзьям за поддержание боевого духа при создании диссертации.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы изложены описания развития симбиотического клубенька и иммунитета бобовых растений. Особое внимание уделено роли в этих процессах тиоловых трипептидов GSH и hGSH.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования и условия выращивания.** В работе использованы растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) линии дикого типа SGE (Kosterin, Rozov, 1993) и симбиотические мутанты из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ, полученные на ее основе: мутант *sym40-1* и аллельные мутанты – *sym33-2* и *sym33-3*. Клубеньки мутантной линии *sym40-1* характеризуются образованием гипертрофированных инфекционных капель, аномальной морфологической дифференцировкой бактериоидов (Tsyganov *et al.*, 1998), повышенным накоплением пероксида водорода, в особенности, вокруг ювенильных бактериоидов и преждевременной деградацией симбиотических структур (Цыганова *и др.*, 2009; Serova *et al.*, 2018). Мутантная аллель *sym33-2* является строгой, в этих клубеньках не происходит выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки (Ovchinnikova *et al.*, 2011). Разветвленная инфекционная нить, с аномально утолщенными стенками, блокируется в клетках наружной коры клубенька. Аллель *sym33-3* характеризуются нечетко выраженным фенотипом, в некоторых клетках наблюдается выход бактерий из инфекционных нитей (Tsyganov *et al.* 1998; Voroshilova *et al.*, 2001).

Растения были инокулированы штаммом клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Glenn *et al.*, 1980). В качестве субстрата при выращивании растений был использован вермикулит, дополненный безазотным питательным раствором (Fähræus, 1957). Растения были выращены в климатических камерах при контролируемых условиях. Сбор клубеньков проводился через одну, две, три, четыре или шесть недель после инокуляции (НПИ) в зависимости от анализа.

**Обработка L-бутионин-S,R-сульфоксимином и экзогенным глутатионом.** Растения обрабатывали путем добавления в субстрат 0,1 мМ раствора L-бутионин-S,R-сульфоксимины (BSO) или растворов 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH одновременно. Оценку влияния BSO на клубенькообразование, гистологическую организацию клубеньков, экспрессию генов и количество тиолов в корнях проводили через 2 НПИ. В экспериментах с экзогенным GSH для обработки растений использовали растворы двух концентраций – 0,1 мМ и 1 мМ. Анализ гистологической организации клубеньков, экспрессии генов и количества тиолов в корнях проводили также через 2 НПИ.

**Молекулярно-генетические методы.** Тотальная РНК была выделена из клубеньков и корней с помощью реагента PureZol Isolation Reagent (Bio-Rad) согласно протоколу производителя. ПЦР в режиме реального времени проводилась в автоматическом амплификаторе C1000™ Thermal Cycler, совмещенном с оптическим модулем CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) с использованием iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

**Высокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с масс-спектрометрическим детектированием.** Выделение тиолов осуществляли на основе методики, описанной ранее (Bardarov *et al.*, 2015). Для экстракции использовался 200 мМ дитиотреитол. Анализ экстрактов выполняли с использованием системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии поколения LC-20 Prominence (Shimadzu Corporation) в сочетании с гибридным масс-спектрометром с тандемом орбитальной и линейной ионных ловушек LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) согласно Черновой *и др.* (2018) с небольшими изменениями.

**Световая, флуоресцентная и лазерная конфокальная сканирующая микроскопия.** Анализ локализации суберина в клубеньках проводился с помощью методов флуоресцентной микроскопии срезов, окрашенных нейтральным красным по модифицированной методике (Lulai and Morgan, 1992) на микроскопе AxioImagerZ1 (Carl Zeiss). Для выявления GSH срезы клубеньков были инкубированы с первичными поликлональными антителами (Agriseria). В качестве вторичных антител были использованы антитела к IgG, конъюгированные с AlexaFluor 488 (Thermo Fisher Scientific). ДНК ядер и бактерий была окрашена йодидом пропидия. Исследование образцов проводилось с помощью лазерных сканирующих конфокальных микроскопов LSM 510 META и LSM780 (Carl Zeiss).

**Статистические методы и программное обеспечение.** Статистическая обработка данных проводилась с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) и среды программирования R. Для световой микроскопии было использовано программное обеспечение ZEN 2 core SP1 (Carl Zeiss), для конфокальной микроскопии — ZEN2009 и ZEN2012 (Carl Zeiss).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

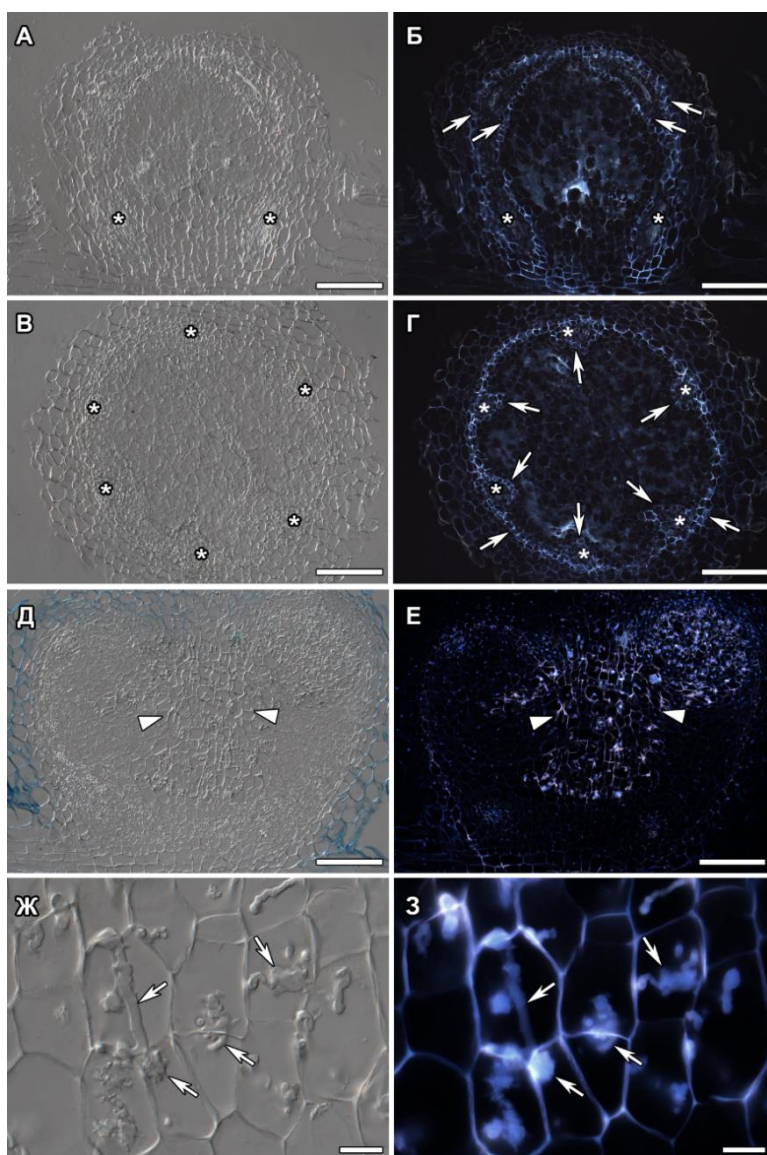
### 1. Проявление защитных реакций в неэффективных симбиотических клубеньках *P. sativum* мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3*

#### 1.1. Анализ гистохимической локализации отложений суберина в трехнедельных клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3*

В рамках данной работы была проанализирована локализация суберина в эффективных и неэффективных клубеньках *P. sativum*. В клубеньках дикого типа через 3 НПИ отложения суберина были выявлены только в эндодерме, отделяющей слой внутренней и наружной коры клубенька в постмеристематических тканях. Утолщение клеточной стенки у растений выполняет барьерную функцию. Выявленные отложения суберина в эндодерме клубеньков дикого типа в первую очередь необходимы для ограничения доступа кислорода в ткани, где функционирует нитрогеназа, необратимо инактивируемая кислородом (Minchin *et al.*, 2008), а также для защиты от излишней дегидратации, солевого стресса и проникновения патогенов (Schreiber *et al.*, 1999).

Отложение суберина в клеточные стенки также является нормальной реакцией растений на патогенную инфекцию. В результате повышается механическая прочность клеточных стенок, ограничивается проникновение и распространение патогена, приток к нему питательных веществ. В бобово-ризобияльном симбиозе растение контролирует каждый этап инфекции, и в случае нарушения программы развития клубенька происходит ее переключение на защитный ответ. Блок развития симбиотического клубенька после выхода бактерий в растительную цитоплазму, происходящий у мутантной линии *sym40-1*, приводит к изоляции от остального растения сразу всего клубенька путем суберинизации клубеньковой эндодермы и эндодермы, окружающей сосудистые пучки (рис. 1А–Г). Ранее сходный фенотип был описан для мутанта *M. truncatula Mtsymb* (Tirichine *et al.*, 2000) и растений с подавленной экспрессией гена *MtNAP2-1* (Combiere *et al.*, 2006). Отложение суберина вокруг проводящих пучков, видимо, ограничивает доступ к клубеньку воды и

питательных веществ, блокируя его дальнейший рост (Tirichine *et al.*, 2000). Мутантные клубеньки также характеризовались арестом клубеньковой меристемы, что было ассоциировано со смыканием клубеньковой эндодермы. Ген *Sym40* – ортолог гена *M. truncatula MtEFD*, кодирующего транскрипционный фактор, являющийся негативным регулятором в цитокининовом сигнальном каскаде (Tsyganov, Tsyganova, 2020). Мутация в гене *Sym40* ведет к многочисленным аномалиям в развитии клубенька, включая ранний арест меристемы (Voroshilova *et al.*, 2009), формирование гипертрофированных инфекционных капель, ярко выраженные защитные реакции (данная работа) и преждевременную деградацию симбиотических структур (Tsyganov *et al.*, 1998; Serova *et al.*, 2018).



**Рисунок 1. —  
Гистохимическая  
локализация отложений  
суберина в трехнедельных  
клубеньках *P. sativum*  
мутантных линий по генам  
*sym40-1* (А–Г) и *sym33-3* (Д–З)**

(А–Г) стрелки указывают на эндодерму, \* — проводящие пучки, (Д–З) наконечники стрелок и стрелки указывают на инфекционные нити. Срезы окрашены нейтральным красным. (А, В, Д, Ж) дифференциально-интерференционный контраст, (Б, Г, Е, З) флуоресцентная микроскопия. (А–Б, Д–З) сагиттальные срезы, (В, Г) поперечные срезы, сделанные из средней части клубенька, соответствующей зоне инфекции в клубеньке дикого типа. Масштабная линейка (А–Е) = 200 мкм, (Ж, З) = 20 мкм.

Ранее было показано, что отложение полифенольных веществ также характерно для мутанта *M. truncatula* по гену *MtSym1* (Benaben *et al.*, 1995). Ген *P. sativum Sym33* является ортологом гена *MtSym1 (MtIPD3)* (Tsyganov, Tsyganova, 2020) и кодирует белок IPD3, взаимодействующий с кальций- и кальмодулин-зависимой протеинкиназой (Ovchinnikova *et al.*, 2011), что приводит к активации органогенеза клубенька (Singh *et al.*, 2014). Отложения суберина в клубеньках мутантной линии *sym33-3* наблюдались в стенках клеток, через которые проходили инфекционные нити (рис. 1Д–Е), и в утолщенных стенках инфекционных нитей (рис. 1Ж–З). Таким образом, мутация в гене *Sym33*, являющемся мастер-регуляторным геном клубенькообразования, приводит к остановке процесса

формирования клубенька и суберинизации его клеток, что является примером защитной реакции растения, которое, таким образом, препятствует выходу бактерий из инфекционных нитей.

## **1.2. Анализ относительной экспрессии генов – молекулярных маркеров защитного ответа в клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3***

Для дальнейшего анализа защитных реакций, протекающих в мутантных клубеньках линий *sym40-1* и *sym33-3*, были проанализированы относительные уровни транскриптов трех молекулярных маркеров защитного ответа: *7RA84* (пероксидаза), *HSR203J* (маркер реакции гиперчувствительности), и *ABR17* (белок, чувствительный к абсцизовой кислоте, PR10.4) (Die *et al.*, 2009; Reguera *et al.*, 2010). Для гена *7RA84* максимальный уровень транскриптов наблюдался через 2 НПИ как в клубеньках дикого типа, так и в мутантных клубеньках. Тем не менее, у мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3* уровни транскриптов были значительно выше, чем у линии дикого типа на каждом сроке анализа. Уровень экспрессии гена *7RA84* вероятно коррелирует с накоплением пероксида водорода в симбиотических клубеньках. В клубеньках дикого типа на сроке 2 НПИ идет рост и ветвление инфекционных нитей. Пероксид водорода в инфекционных нитях недетерминированных клубеньков участвует в перекрестном связывании гликопротеинов матрикса и в его отвердевании, которое, вероятно, необходимо для роста нитей (Wisniewski *et al.*, 2000; Brewin, 2004). Тем не менее, пероксид водорода также является активной формой кислорода и при повышенном накоплении в клетках вызывает окислительный стресс. Таким образом, снижение уровня экспрессии гена *7RA84* на последующих сроках анализа в клубеньках дикого типа, вероятно, является признаком нормального развития симбиотического клубенька и, наоборот, повышенное накопление транскриптов данного гена в неэффективных клубеньках мутантных линий – признаком развития защитных реакций. Так, пероксидаза участвует в лигнификации клеточных стенок путем окислительного воздействия на структурные белки клеточной стенки, таким образом, укрепляя их при поранении или инвазии патогенов (Pérez-de-Luque *et al.*, 2006). Высокая активность гена пероксидазы в клубеньках мутантной линии *sym33-3* также может быть связана с активной суберинизацией центральной части клубенька. Кроме того, большинство субстратов пероксидазы – соединения фенольной природы. Окисляясь до хинонов, они обладают сильным окислительным действием (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006). Это может приводить к развитию реакции гиперчувствительности, активирующейся при взаимодействии растения с патогеном. В клубеньках мутантной линии *sym40-1* было показано чрезмерное накопление пероксида водорода по сравнению с клубеньками дикого типа (Цыганова *и др.*, 2009), развитие окислительного стресса и деградация симбиотических структур (Serova *et al.*, 2018). Эти данные коррелируют с повышенным уровнем экспрессии гена *7RA84* у мутантной линии *sym40-1* по сравнению с линией дикого типа.

Растения способны прерывать распространение патогенов в результате развития реакции гиперчувствительности (Lamb, Dixon, 1997; Hérouart *et al.*, 2002). Реакция гиперчувствительности вовлечена также и в контроль со стороны растения за ходом инфекции при клубенькообразовании, определяя число успешных инфекций (Vasse *et al.*, 1993; Perotto *et al.*, 1994; Gage, 2004). В эффективных азотфиксирующих клубеньках уровень синтеза защитных компонентов относительно невысок и не приводит к инактивации микроорганизмов, а лишь ограничивает их размножение и распространение. В эффективных клубеньках линии дикого типа на всех сроках анализа наблюдался низкий уровень активности гена *HSR203J*, тогда как повышенный уровень экспрессии данного гена в неэффективных клубеньках мутантных линий свидетельствует о развитии в них защитных реакций. Максимальный уровень экспрессии *HSR203J* наблюдался в клубеньках

мутантной линии *sym40-1*, характеризующихся преждевременной деградацией симбиотических структур.

Уровень транскриптов гена *ABR17* был значительно выше в клубеньках мутантной линии *sym40-1*, чем в клубеньках линии дикого типа через 2 и 4 НПИ и не отличался на сроке 6 НПИ. В клубеньках мутантной линии *sym33-3* уровень транскриптов гена *ABR17* не отличался на сроке 2 НПИ и был выше, чем у линии дикого типа на сроке 4 НПИ. В то же время уровень транскриптов этого гена в клубеньках мутантной линии *sym33-3* был значительно ниже, чем у линии дикого типа на сроке 6 НПИ. *ABR17*, принадлежащий к семейству PR10 белков, синтезируется в тканях *P. sativum* в ответ на атаку патогена (Amey *et al.*, 2008). *ABR17*, проявляющий рибонуклеазную активность (Srivastava *et al.*, 2006), может быть вовлечен в контроль бактериальной инфекции и пролиферации (Reguera *et al.*, 2010), а уровень экспрессии этого гена увеличиваться в ответ на восприятие мутантными растениями клубеньковых бактерий не как микросимбионтов, а как патогенов. Наблюдаемый высокий уровень экспрессии этого гена у мутантной линии *sym40-1* может быть связан с выходом ризобий в цитоплазму растительных клеток и высоким уровнем продукции сигналов вирулентности. В то же время относительно невысокий уровень транскриптов в клубеньках мутантной линии *sym33-3* может быть связан с отсутствием выхода бактерий из «запертых» инфекционных нитей.

Таким образом, нарушения программы развития клубенька в следствие симбиотических мутаций *P. sativum sym40-1* и *sym33-3* приводят к восприятию полезных ризобий в качестве патогенов и развитию различных защитных ответов у растения.

## **2. Эффективные и неэффективные симбиотические клубеньки отличаются по содержанию и соотношению тиолов**

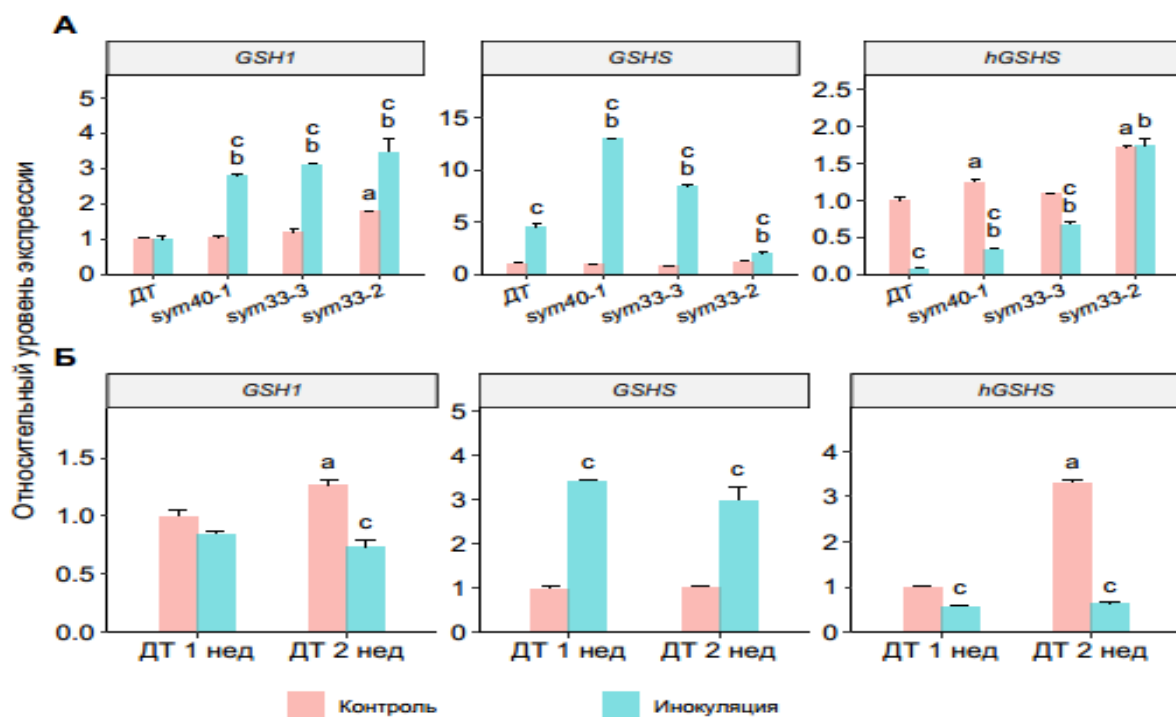
### **2.1. Анализ относительной экспрессии генов биосинтеза тиолов в корнях и клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-2* и *sym33-3***

Была проанализирована экспрессия генов *GSH1* ( $\gamma$ -глутамилцистеин синтетаза), *GSHS* (глутатион синтетаза) и *hGSHS* (гомоглутатион синтетаза) в 3-недельных неинокулированных (контрольных) корнях и клубеньках всех генотипов. Сравнение контрольных (неинокулированных) корней с клубеньками дикого типа использовалось для выявления изменений, связанных с симбиотическими взаимодействиями. Разница между мутантными клубеньками и клубеньками дикого типа может указывать на участие GSH и hGSH в различных стадиях развития клубеньков или в защитных реакциях, связанных с неэффективным симбиозом.

Уровень мРНК гена *GSH1* в клубеньках дикого типа не изменялся по сравнению с контрольными корнями (рис. 2А). В клубеньках мутантов *sym40-1*, *sym33-2* и *sym33-3* наблюдалось достоверное увеличение экспрессии *GSH1* по сравнению с контрольными корнями и клубеньками дикого типа (рис. 2А).

Уровень экспрессии гена *GSHS* достоверно увеличивался в клубеньках по сравнению с контрольными корнями у всех генотипов. Уровни мРНК *GSHS* в клубеньках *sym40-1* и *sym33-3* были достоверно выше, чем в клубеньках дикого типа. Тогда как в клубеньках *sym33-2*, заблокированных на самой ранней стадии развития среди мутантов, уровень экспрессии был ниже, чем в клубеньках дикого типа. Самый высокий уровень экспрессии *GSHS* наблюдался в клубеньках мутанта *sym40-1* (рис. 2А).

Контрольные корни всех генотипов, кроме *sym33-2*, характеризовались более высоким уровнем экспрессии гена *hGSHS* по сравнению с клубеньками. В клубеньках *sym33-2* (без выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки) поддерживался тот же уровень экспрессии *hGSHS*, что и в контрольных корнях (рис. 2А).



**Рисунок 2. — Относительный уровень экспрессии генов биосинтеза GSH и hGSH в клубеньках и неинокулированных корнях *P. sativum* дикого типа (ДТ) и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-3* и *sym33-2***

А — трехнедельные неинокулированные корни (контроль) и клубеньки (инокуляция). Б — однонедельные (1 нед) и двухнедельные (2 нед) неинокулированные корни (контроль) и клубеньки (инокуляция). *GSH1* —  $\gamma$ -глутамилцистеин синтетаза, *GSHS* — глутатион синтетаза, *hGSHS* — гомоглутатион синтетаза. Графики демонстрируют результаты трех независимых экспериментов. А — буквы указывают на достоверные различия ( $P \leq 0,05$ ) **a**, между контрольными корнями мутантных линий и линией дикого типа; **b**, между мутантными клубеньками и клубеньками дикого типа; **c**, между клубеньками и контрольными корнями внутри одного генотипа. Б — **a**, между контрольными корнями дикого типа разного возраста; **c**, между клубеньками и контрольными корнями в пределах одной временной точки.

Был проведен анализ уровней экспрессии генов в одно- и двухнедельных корнях и клубеньках растений дикого типа (рис. 2Б). Наблюдалось значительное повышение уровня экспрессии *GSHS* и небольшое снижение экспрессии *hGSHS* в однонедельных клубеньках по сравнению с контрольными корнями. В двухнедельных клубеньках поддерживался высокий уровень экспрессии *GSHS*, тогда как экспрессия *hGSHS* была значительно снижена по сравнению с контрольными корнями.

Достоверное увеличение уровня экспрессии гена *GSHS* и снижение уровня экспрессии гена *hGSHS* в клубеньках всех генотипов и возрастов по сравнению с неинокулированными корнями, за исключением клубеньков мутантной линии *sym33-2* (рис. 2), указывает на то, что изменения в активности генов *GSHS* и *hGSHS* в тканях корня, вероятно, являются частью программы развития симбиотического клубенька. В клубеньках мутантной линии *sym33-2*, характеризующихся отсутствием выхода бактерий в растительную цитоплазму, профиль экспрессии генов *GSHS* и *hGSHS* больше схож с таковым в неинокулированных корнях. Таким образом, изменения в активности генов биосинтеза GSH и hGSH, по всей видимости, происходят после высвобождения бактерий в цитоплазму растительной клетки в клубеньках.

С другой стороны, уровень экспрессии генов *GSH1*, *GSHS* и *hGSHS* в клубеньках мутантных линий по генам *sym40-1* и *sym33-3* был выше, чем в клубеньках дикого типа, что

может указывать на изменение в метаболизме тиолов, связанное с защитными реакциями, проявляющимися у этих мутантов. Обработка *Arabidopsis thaliana* жасмоновой кислотой, являющейся гормоном стресса, приводила к увеличению уровня транскриптов генов *GSH1* и *GSHS*, не влияя на уровень самого GSH (Xiang, Oliver, 1998). Также количество транскриптов этих генов увеличивалось в ответ на патоген-оомицет *Phytophthora brassicae* (Parisy *et al.*, 2007). В данной работе самым высоким уровнем экспрессии гена *GSHS* и самым низким содержанием GSH по сравнению с клубеньками дикого типа и мутанта *sym33-3* характеризовались клубеньки мутанта *sym40-1* (рис. 2А; табл. 1). Таким образом, в клубеньках мутантной линии *sym40-1* изменения в экспрессии гена *GSHS* могут быть вызваны восприятием мутантными растениями клубеньковых бактерий как потенциальных патогенов и являться частью защитного ответа.

## **2.2. Анализ содержания тиолов в корнях и клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-2* и *sym33-3***

Чтобы оценить корреляцию между изменениями экспрессии генов биосинтеза GSH и hGSH и фактическими уровнями тиолов, было проведено количественное определение низкомолекулярных тиолов в контрольных корнях и клубеньках возрастом 1, 2 и 3 недели (табл. 1).

Концентрация GSH и соотношение GSH : hGSH в клубеньках всех генотипов были значительно выше, чем в контрольных корнях (табл. 1). Однако, у мутанта *sym33-2* соотношение GSH : hGSH было самым низким среди клубеньков. В клубеньках *sym33-3* уровень GSH был сопоставим с уровнем GSH дикого типа, однако, количество hGSH было выше, что приводило к снижению соотношения GSH : hGSH. Несмотря на самый высокий уровень экспрессии *GSHS* в клубеньках мутанта *sym40-1*, количество GSH, как и hGSH, в них были ниже, чем в клубеньках дикого типа и мутанта *sym33-3*. Тем не менее, соотношение GSH : hGSH было таким же, как в клубеньках мутанта *sym33-3*, и выше, чем в клубеньках *sym33-2*. Кроме того, оказалось, что снижение уровня экспрессии гена *hGSHS* в клубеньках по сравнению с контрольными корнями не приводит к соответствующему уменьшению количества hGSH, фактически, уровень hGSH был выше в клубеньках дикого типа и мутанта *sym33-3* по сравнению с контрольными корнями и не изменялся в клубеньках мутантов *sym40-1* и *sym33-2*.

Соотношение GSH : hGSH было максимальным в клубеньках дикого типа и снижалось в мутантных клубеньках в зависимости от стадии их развития (табл. 1). Однако, каждый из изученных генотипов показал свой композиционный состав тиолов в клубеньках. Наибольшая концентрация GSH среди всех генотипов наблюдалась в клубеньках дикого типа и мутанта *sym33-3*, hGSH — в клубеньках *sym33-3*.

Чтобы понять, связаны ли выявленные различия в содержании тиолов со стадией развития клубенька, на которой блокированы мутанты, или с метаболическими изменениями в неэффективных клубеньках, были проанализированы инокулированные корни и клубеньки дикого типа одно- и двухнедельного возраста (табл. 1). В контрольных корнях соотношение GSH : hGSH было сравнимо с таковым в трехнедельных контрольных корнях (табл. 1). Концентрация GSH и соотношение GSH : hGSH в клубеньках увеличивались через 2 НПИ. Соотношение GSH : hGSH было самым высоким среди всех образцов в двухнедельных клубеньках дикого типа (табл. 1). GSH присутствовал в качестве основного тиола во всех проанализированных образцах.

У *Medicago sativa* GSH и hGSH присутствовали во всех органах, однако, соотношение GSH : hGSH варьировало в зависимости от органа, оказываясь самым высоким в корневых меристемах и самым низким в полностью дифференцированных органах (зрелые листья и зона растяжения корня). Кроме того, GSH был ассоциирован с активацией клеточного цикла, тогда как hGSH, напротив, был связан с дифференцированными клетками (Pasternak *et al.*, 2014). Таким образом, возможно, что в недетерминированных клубеньках, где имеют место процессы дедифференцировки,

активации клеточного цикла, и функционирует меристема, соотношение GSH : hGSH и его изменения могут являться важным фактором. Действительно, несмотря на то, что GSH был основным тиолом во всех проанализированных образцах, соотношение GSH : hGSH всегда было выше в клубеньках, в которых происходило высвобождение бактерий из инфекционных нитей, чем в неинокулированных корнях. Отношение GSH : hGSH было максимальным в клубеньках дикого типа через 2 НПИ, что указывает на важную роль GSH в функционировании меристемы клубенька и азотфиксирующих клеток и, вероятно, в высвобождении бактерий.

**Таблица 1. Относительное содержание и соотношение GSH : hGSH в клубеньках и неинокулированных (контрольных) корнях *P. sativum* дикого типа и мутантных линий одно-, двух- и трехнедельного возраста**

	GSH	hGSH	GSH : hGSH
ДТ корни 3 нед.	0,30 ± 0,02	0,14 ± 0,04	2,1
ДТ клуб. 3 нед.	1 ± 0,02	0,25 ± 0,01	4,0
<i>sym40-1</i> корни 3 нед.	0,24 ± 0,03	0,16 ± 0,04	1,5
<i>sym40-1</i> клуб. 3 нед.	0,49 ± 0,05	0,17 ± 0,01	2,9
<i>sym33-3</i> корни 3 нед.	0,27 ± 0,05	0,18 ± 0,05	1,5
<i>sym33-3</i> клуб. 3 нед.	1,05 ± 0,09	0,35 ± 0,01	3,0
<i>sym33-2</i> корни 3 нед.	0,30 ± 0,04	0,22 ± 0,03	1,4
<i>sym33-2</i> клуб. 3 нед.	0,42 ± 0,02	0,20 ± 0,01	2,1
ДТ корни 1 нед.	0,64 ± 0,05	0,39 ± 0,05	1,6
ДТ клуб. 1 нед.	1 ± 0,09	0,41 ± 0,06	2,4
ДТ корни 2 нед.	0,43 ± 0,03	0,25 ± 0,02	1,7
ДТ клуб. 2 нед.	1,29 ± 0,18	0,24 ± 0,06	5,4

ДТ — дикий тип; корни — неинокулированные корни; клуб. — клубеньки; нед. — недели. Данные представляют собой средние значения ± стандартная ошибка среднего для четырех-пяти повторностей. Значения были нормализованы относительно количества GSH (нМ/мг сырого веса) в клубеньках дикого типа через 1 или 3 НПИ.

При этом минимальное содержание обоих тиолов среди клубеньков выявлялось у мутантной линии *sym40-1*, а максимальное — у мутантной линии *sym33-3*. Можно предположить, что как снижение, так и увеличение количества тиолов в неэффективных симбиотических клубеньках может являться частью защитных реакций, в зависимости от стадии, на которой было нарушено развитие клубенька и произошло переключение симбиотической программы на защитный ответ.

У мутантной линии *sym33-3*, где рост инфекционных нитей заблокирован в большинстве клеток клубенька до высвобождения бактерий, накопление GSH и, вероятно, hGSH, становится важным для устойчивости к «болезням», как было показано ранее для *A. thaliana* (Parisy *et al.*, 2007). Это согласуется также с повышенной экспрессией генов *7RA84*, *Hsr203J*, *ABR17* и *PR-1*, *PR-10* (рис. 8) в клубеньках мутанта *sym33-3* по сравнению с клубеньками дикого типа, суберинизацией стенок инфекционных нитей (рис. 1Д–3) и повышенным отложением неэтерифицированного пектина в стенках инфекционных нитей

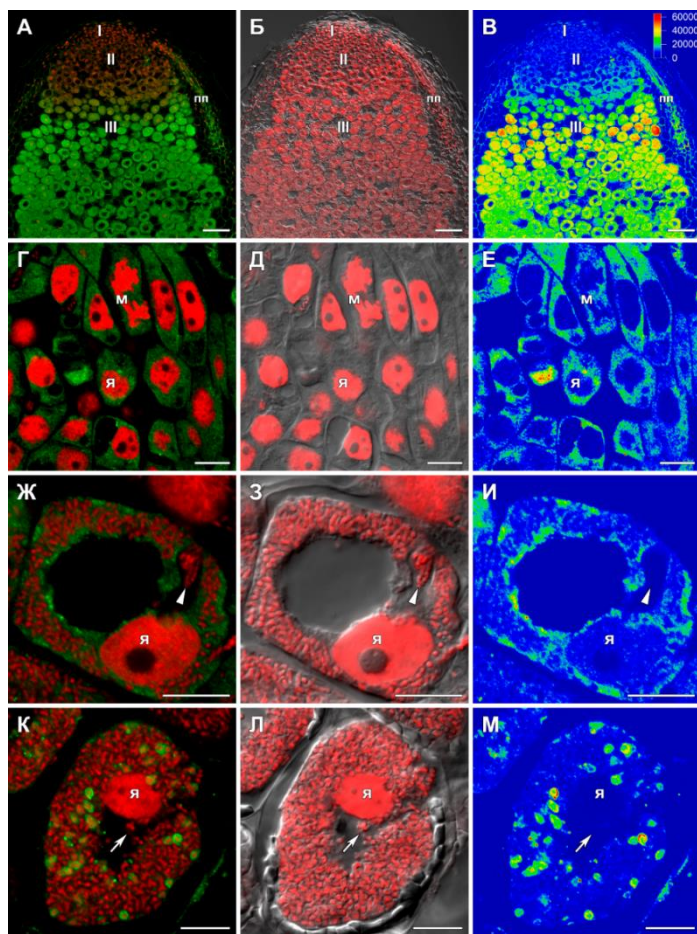
(Ivanova *et al.*, 2015). Положительный эффект GSH на накопление PR-белков и экспрессию генов, связанных с защитным ответом, был показан ранее (Ball *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2004). Повышенный уровень экспрессии гена *hGSHS* по сравнению с клубеньками дикого типа, как и в клубеньках мутанта *sym33-3*, был также обнаружен в мутантных клубеньках *nad1 M. truncatula*. Эти клубеньки характеризовались накоплением фенольных соединений, повышенным уровнем пероксида водорода и активацией генов, связанных с защитным ответом, что в итоге приводило к некрозу инфицированных клеток (Wang *et al.*, 2016).

Развитие клубеньков мутанта *sym40-1* прекращается после высвобождения бактерий в растительную цитоплазму. Снижение количества обоих тиолов также может являться одним из сценариев развития защитных реакций в симбиотических клубеньках растений. Влияние изменений в количестве GSH и hGSH на защитные реакции растений при биотическом стрессе было показано для некоторых бобовых культур (Baldacci-Cresp *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2020). Тиолы необходимы для роста паразитических нематод, которые заражают корни растений и вызывают дифференцировку клеток корня в гигантские клетки, образующие галлы. Метаболизм GSH и hGSH в галлах и неинфицированных корнях различается. Корни *M. truncatula* со сниженным содержанием тиолов в меньшей степени страдали от паразитических нематод (Baldacci-Cresp *et al.*, 2012). В корнях *Glycine max* со сниженным содержанием тиолов, наблюдалось развитие реакции гиперчувствительности и гибель клеток, а также накопление пероксида водорода вокруг областей нематодной инфекции (Chen *et al.*, 2020), что напоминает накопление пероксида водорода вокруг ювенильных бактериоидов в клубеньках мутантной линии *sym40-1* (Цыганова *и др.*, 2009).

### **3. Анализ иммулокализации восстановленной формы GSH в трехнедельных клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-2* и *sym33-3***

В клубеньках дикого типа сигнал, ассоциированный с GSH, был обнаружен в цитоплазме меристематических клеток (рис. 3Г–Е), в цитоплазме и ядрах инфицированных клеток в зоне инфекции (рис. 3Ж–И), в цитоплазме и симбиосомах в клетках зоны азотфиксации (рис. 3К–М), в клетках паренхимы клубенька и проводящих пучках (рис. 3А–В). Сигнал отсутствовал или был едва заметен в матриксе инфекционных нитей и капель (рис. 3Ж–И). В клубеньках мутанта *sym40-1* метка в основном ассоциировалась с инфицированными клетками (рис. 4А–В), максимум сигнала наблюдался в бактериях, вышедших из инфекционных капель (рис. 4Г–Е), в матриксе инфекционных нитей и в гипертрофированных инфекционных каплях сигнала не наблюдалось (рис. 4Г–Е). В клубеньках мутанта *sym33-2* уровень сигнала, ассоциированного с GSH, был невысоким и локализовался в цитоплазме. На мутантных растениях *sym33-3* образовывались белые клубеньки с «запертыми» инфекционными нитями без выхода бактерий (рис. 5А–В). В некоторых из этих инфекционных нитей, которые, вероятно, первыми колонизировали клубеньковый примордий, интенсивный сигнал был ассоциирован с бактериями (рис. 5Г–Е). Так как аллель *sym33-3* характеризуется нечетко выраженным фенотипом, не все нити оказываются заблокированными и в некоторых клубеньках в определенных клетках происходит выход бактерий. Сигнал не был обнаружен в таких инфекционных нитях, но наблюдался в цитоплазме и ядрах инфицированных клеток (рис. 5Ж–И). Интенсивный сигнал был ассоциирован с вышедшими бактериями (рис. 5К–М).

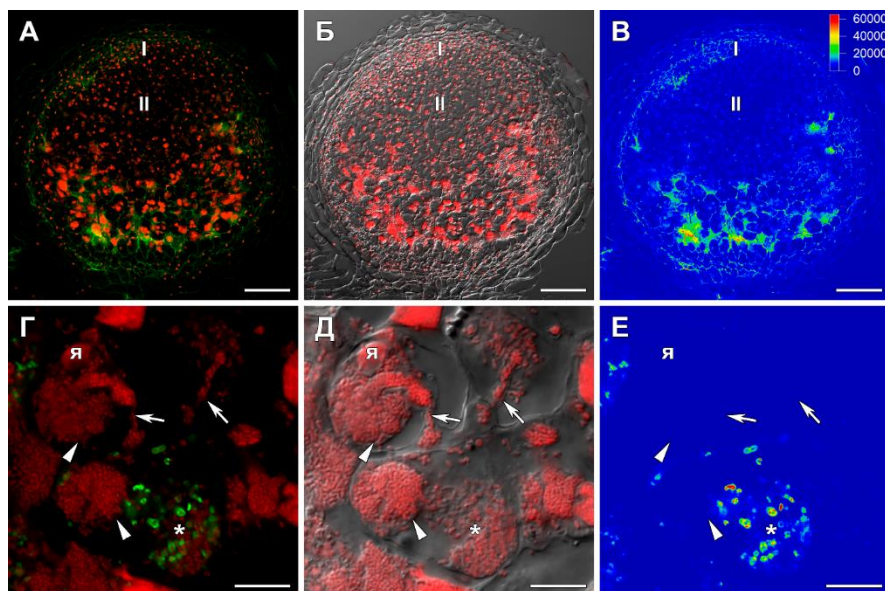
GSH необходим для деления клеток в кончике корня (Vernoux *et al.*, 2000), и его количество контролирует переход клеток из фазы G1 в фазу S клеточного цикла, что сопровождается перемещением GSH в ядра в фазе G1 (Diaz-Vivancos *et al.*, 2010a, b). В настоящем исследовании метка, ассоциированная с GSH, в большом количестве обнаруживалась в меристеме, а также присутствовала в ядрах инфицированных клеток из зоны инфекции, но не из зоны азотфиксации. По-видимому, GSH может стимулировать меристематическую активность и повторяющиеся раунды эндоредупликации в симбиотических клубеньках.



**Рисунок 3. — Иммулокализация GSH в трехнедельных клубеньках *P. sativum* дикого типа**

Общий вид клубенька (А–В); клетки меристемы (Г–Е); клетки из зоны поздней инфекции (Ж–И); азотфиксирующая клетка (К–М). Зоны клубенька обозначены римскими цифрами: I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации, пп — проводящий пучок, м — митоз, я — ядро, стрелка указывает на инфекционную нить, наконечник стрелки — на инфекционную каплю. Наложение зеленого и красного каналов (А, Г, Ж, К), наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала (Б, Д, З, Л). Тепловая карта с обозначением распределения интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (В, Е, И, М). Зеленый канал — иммулокализация GSH, красный канал — ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная

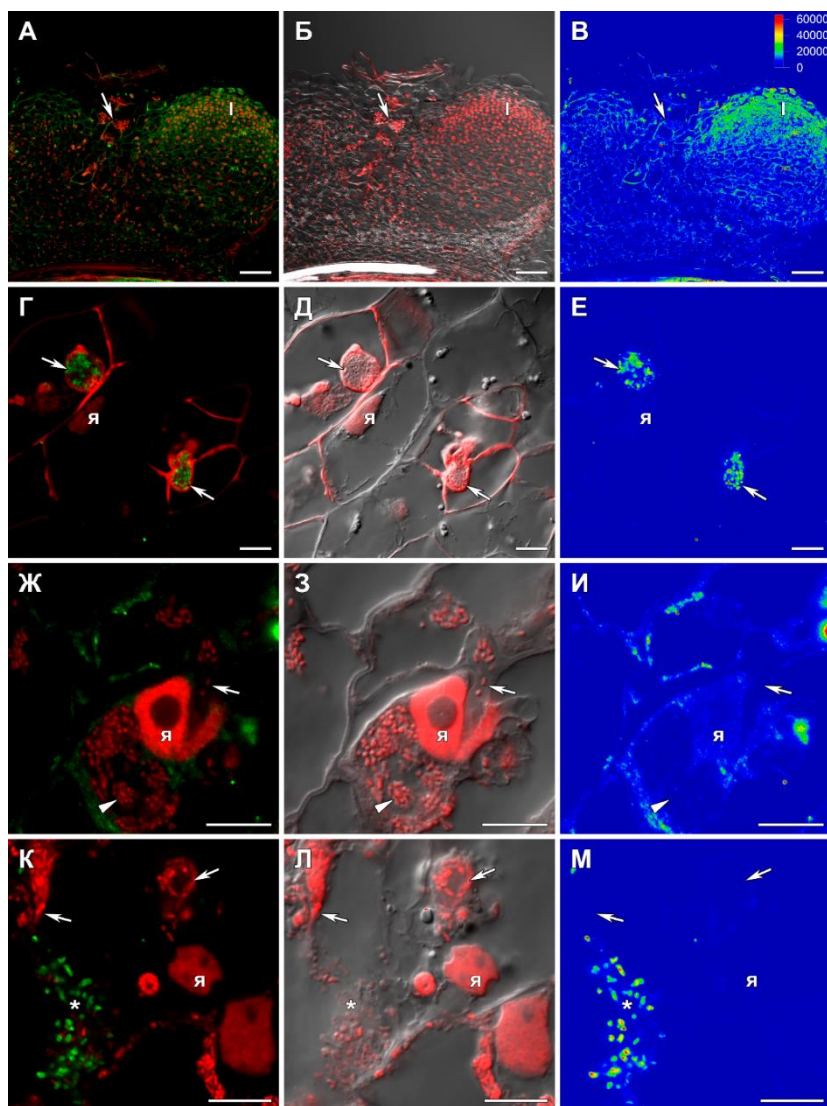
линейка = 100 мкм (А–В), 10 мкм (Г–М).



**Рисунок 4. — Иммулокализация GSH в трехнедельных клубеньках клубеньках *P. sativum* мутантной линии *sym40-1***

Общий вид клубенька (А–В); инфицированные клетки (Г–Е). Зоны клубенька обозначены римскими цифрами: I — меристема, II — зона инфекции, я — ядро, стрелка указывает на инфекционную нить, наконечник стрелки — на инфекционную каплю, \* — вышедшие бактерии. Наложение зеленого и красного каналов (А, Г), наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала (Б, Д). Тепловая карта с обозначением распределения интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (В, Е). Зеленый канал — иммулокализация GSH, красный канал — ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная

линейка = 100 мкм (А–В), 10 мкм (Г–Е).



**Рисунок 5. —  
Иммунолокализация GSH  
в трехнедельных  
клубеньках клубеньках *P.  
sativum* мутантной линии  
*sym33-3***

Общий вид клубенька (А–В);  
запертые инфекционные нити  
(Г–Е); инфицированные  
клетки (Ж–И); клетки с  
вышедшими бактериями (К–  
М). I — меристема, я — ядро,  
стрелка указывает на  
инфекционную нить,  
наконечник стрелки — на  
инфекционную каплю, \* —  
вышедшие бактерии. Наложение  
зеленого и красного каналов (А,  
Г, Ж, К), наложение дифференциально  
-интерференционного  
контраста и красного канала  
(Б, Д, З, Л). Тепловая карта с  
обозначением распределения  
интенсивности  
флуоресцентного сигнала  
зеленого канала (В, Е, И, М).  
Зеленый канал —  
иммунолокализация GSH,  
красный канал — ДНК ядер и  
бактерий/бактероидов.

Масштабная линейка = 100 мкм (А–В), 10 мкм (Г–М).

В клубеньках дикого типа наиболее интенсивное мечение было связано со зрелыми бактериоидами в клетках зоны азотфиксации, что подтверждает ранее полученные данные (Matamagos *et al.*, 2013). В клубеньках невозможно определить происхождение GSH – растительное или бактериальное. Недавно было показано, что дефицит GSH у *Sinorhizobium meliloti* 2011 (*gshB*) не влияет на дифференцировку бактериоидов, но запускает процесс раннего старения клубеньков (Yang *et al.*, 2020). Можно сделать вывод, что GSH в бактериоидах необходим для их правильного функционирования и азотфиксации.

В клубеньках дикого типа метка, ассоциированная с GSH, не обнаруживалась в инфекционных нитях и каплях. Интенсивное мечение наблюдалось только в «запертых» инфекционных нитях мутантной линии *sym33-3* и высвобожденных в растительную цитоплазму бактериях в клубеньках мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3*. В клубеньках мутантов *sym33* наблюдается деградации бактерий внутри некоторых инфекционных нитей (Цыганова *и др.*, 2019), а в клубеньках мутанта *sym40-1* пероксид водорода накапливается вокруг ювенильных бактериоидов (Цыганова *и др.*, 2009). Вероятно, ризобии могут использовать GSH для преодоления стресса, вызванного активацией растительных защитных реакций у этих мутантов.

#### 4. Анализ влияния обработки L-бутионин-S,R-сульфоксимином и экзогенным глутатионом на морфологию клубеньков и экспрессию генов в корнях с клубеньками *P. sativum* дикого типа и мутантных линий

##### 4.1. GSH и hGSH вовлечены в регуляцию экспрессии генов *GSH1*, *GSHS*, *Cyp15a*, *TPP*, *PR1*, *PR10*, *NF-YA1* в корнях с клубеньками *P. sativum*

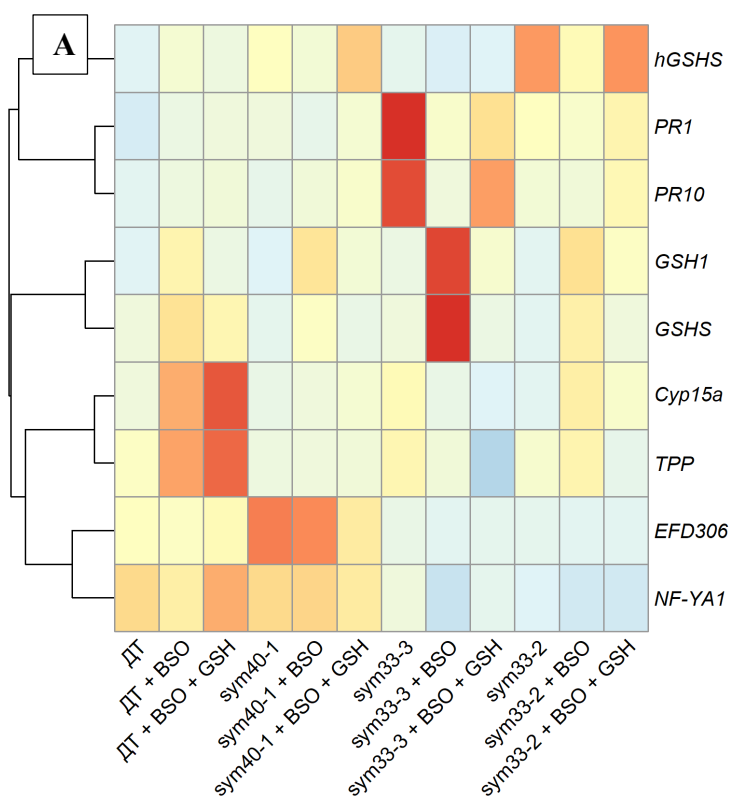
Было изучено влияние концентрации тиолов на экспрессию некоторых генов в корнях с клубеньками растений необработанных, обработанных 0,1 мМ раствором BSO, или обработанных растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH через 2 НПИ. Был проанализирован уровень экспрессии генов, вовлеченных в развитие клубенька (*EFD*, *NF-YA1*), в биосинтез GSH и hGSH (*GSH1*, *GSHS*, *hGSHS*), в защитные реакции растений (*PR1*, *PR10*) и старение клубенька (*TPP*, *Cyp15a*) (рис. 6А).

Анализ уровня экспрессии *GSH1* и *GSHS* показал увеличение количества транскриптов в обработанных раствором BSO корнях с клубеньками у всех генотипов. Недостаток GSH и hGSH в корнях с клубеньками растений дикого типа приводил к повышению уровня экспрессии генов *Cyp15a*, *TPP*, *PR1*, *PR10*, и к снижению уровня экспрессии гена *NF-YA1*. Уровень экспрессии гена *NF-YA1* также снижался при обработке раствором BSO корней мутантной линии *sum33-3*. Экспрессия гена *hGSHS* у этих генотипов не изменялась. В необработанных корнях с клубеньками мутантной линии *sum33-3* уровень экспрессии генов *PR1* и *PR10* был значительно выше, чем в корнях с клубеньками у дикого типа, однако, в ответ на недостаток GSH и hGSH экспрессия этих генов подавлялась. Уровень экспрессии генов *Cyp15a* и *TPP* снижался в обработанных растворами BSO и GSH корнях с клубеньками мутантной линии *sum33-3* (рис. 6А).

Уровень экспрессии генов *GSH1*, *GSHS*, *hGSHS*, *EFD*, *NF-YA1*, *PR1*, *PR10*, *Cyp15a* был также проанализирован в корнях с клубеньками необработанных и обработанных растворами разных концентраций GSH через 2 НПИ (рис. 6Б). Уровень экспрессии генов биосинтеза GSH и hGSH достоверно не изменялся в обработанных корнях с клубеньками растений дикого типа, тогда как уровни экспрессии этих генов были повышены в растениях мутантной линии *sum33-3*, обработанных обеими концентрациями GSH, за исключением гена *hGSHS*, чей уровень экспрессии повышался только в ответ на обработку растений 0,1 мМ раствором GSH. Обработка 0,1 мМ раствором GSH приводила к увеличению уровня экспрессии генов *EFD* и *NF-YA1*, участвующих в развитии клубеньков, в корнях с клубеньками дикого типа и мутантной линии *sum33-3*. Обработка 1 мМ раствором GSH приводила к увеличению уровня экспрессии генов защитного ответа, *PR1* и *PR10*, и гена-маркера старения клубеньков *Cyp15a* в корнях с клубеньками мутантной линии *sum33-3*, но не у растений дикого типа (рис. 6Б). Эти данные также подтверждают двойную роль GSH и hGSH в регуляции развития клубеньков и защитных реакций у растений *P. sativum*.

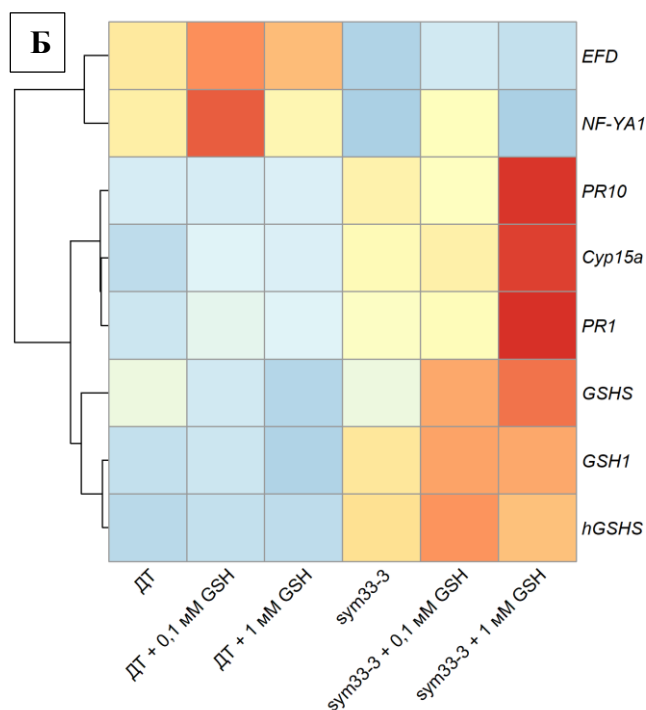
Таким образом, гены *GSH1*, *GSHS*, *Cyp15a*, *TPP*, *PR1*, *PR10* активировались в ответ на недостаток тиолов в корнях с клубеньками растений дикого типа. В то же время уровень их экспрессии достоверно не изменялся в корнях с клубеньками растений дикого типа, обработанных только GSH, что свидетельствует о том, что экспрессия этих генов реагирует на снижение концентрации тиолов. Тогда как на регуляцию генов биосинтеза GSH и hGSH у мутантной линии *sum33-3* влияют как увеличение, так и снижение содержания тиолов и, возможно, соотношение GSH : hGSH. Это различие может быть связано с сигнальным каскадом GSH, ассоциированным с защитными реакциями у мутанта *sum33-3*. В то же время, для *PR*-генов и *Cyp15a*, было показано снижение уровня экспрессии у этого мутанта в ответ на недостаток тиолов, тогда как увеличение уровня их экспрессии происходило только при обработке растений 1 мМ раствором GSH, но не 0,1 мМ GSH. Это указывает на то, что концентрация GSH играет роль в регуляции экспрессии некоторых генов, по крайней мере, в корнях с клубеньками мутантной линии *sum33-3*. Двойная роль GSH, опосредованная концентрацией, подтверждается тем фактом, что экспрессия гена *NF-YA1* снижается в ответ на недостаток тиолов в корнях с клубеньками растений дикого типа и

мутанта *sym33-3* и повышается (вместе с геном *EFD*) в растениях обоих генотипов, обработанных только 0,1 мМ раствором GSH.



**Рисунок 6. — Тепловые карты относительного уровня экспрессии генов**

В корнях с клубеньками *P. sativum* дикого типа (ДТ) и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-3* и *sym33-2*, обработанных растворами L-бутионин-S,R-сульфоксимида (BSO) и глутатиона (GSH) через 2 НПИ (А); в корнях с клубеньками дикого типа и мутантной линии *sym33-3*, обработанных 0,1 мМ или 1 мМ раствором глутатиона (GSH) через 2 НПИ (Б).

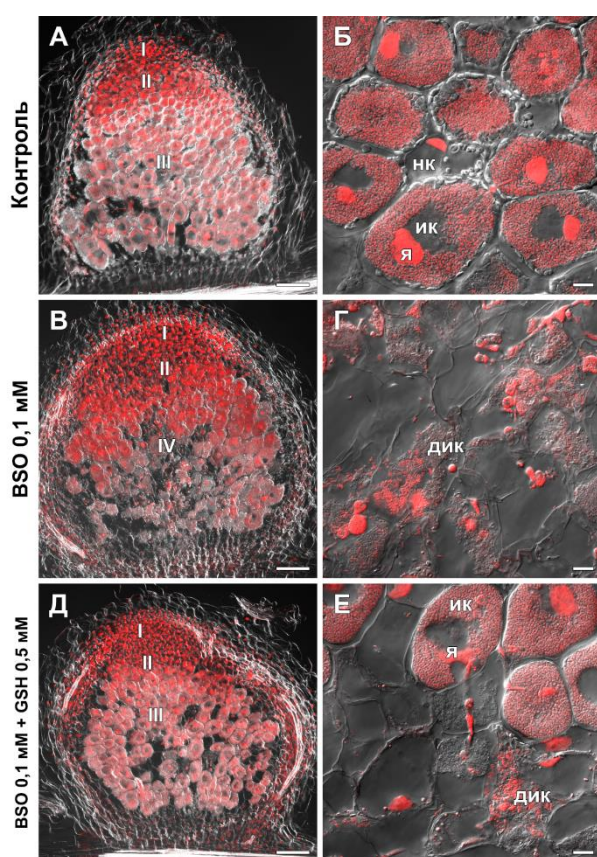


Цветовая шкала отражает значения относительной экспрессии генов, преобразованные по Z для каждого гена. Уровни экспрессии генов сравнивали с использованием двустороннего дисперсионного анализа ( $P \leq 0,05$ ).

Таким образом, экспрессия генов *GSH1* и *GSHS* в корнях с клубеньками может активироваться недостатком тиолов, тогда как определенное количество GSH необходимо для нормальной экспрессии гена *NF-YA1* и повышения уровня его экспрессии в корнях с клубеньками. Также заманчиво предположить, что изменения в экспрессии *PR*-генов и *Cyp15a* могут коррелировать с понижением концентрации *hGSH* в корнях с клубеньками мутантной линии *sym33-3*, что может являться косвенным доказательством участия *hGSH* в регуляции растительных защитных реакций.

#### 4.2. Анализ влияния обработки L-бутионин-S,R-сульфоксимином на клубенькообразование и морфологию клубеньков *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-2* и *sym33-3*

Анализ с помощью ВЭЖХ показал, что обработка 0,1 мМ раствором BSO приводила как минимум к 94% и 96% снижению количества GSH и hGSH, соответственно, в корнях с клубеньками у растений всех генотипов. У растений дикого типа, обработанных раствором BSO, наблюдалось снижение количества клубеньков на 46% и преждевременная деградация симбиотических структур в основании и центральной части клубеньков, что указывает на индукцию раннего старения (рис. 7В–Г). Растения дикого типа, обработанные растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH, имели такое же количество клубеньков, что и необработанные, а уровни GSH и hGSH в корнях с клубеньками достигали 237% и 88% (от уровня необработанных растений), соответственно. В этих клубеньках не индуцировалось преждевременное разрушение клеток зоны азотфиксации (рис. 7Д–Е), однако, в некоторых клетках были видны следы деградации (рис. 7Е).



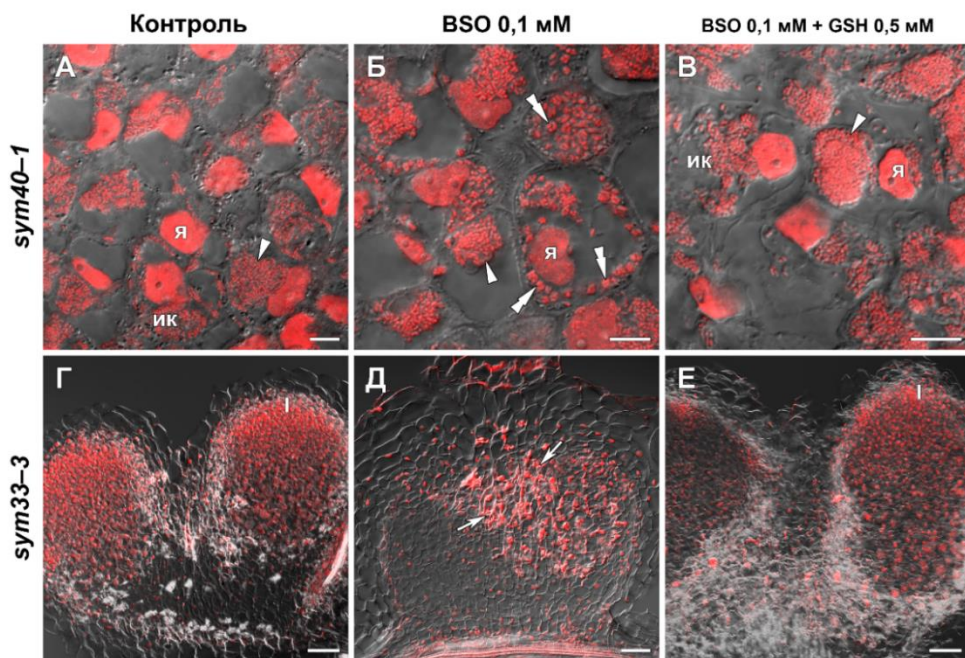
**Рисунок 7. — Гистологическая организация клубеньков *P. sativum* дикого типа, обработанных растворами L-бутионин-S,R-сульфоксимином (BSO) и глутатиона (GSH) через 2 недели после инокуляции**

I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации, IV — зона старения; я — ядро; ик — инфицированная клетка; нк — неинфицированная клетка; дик — деградирующая инфицированная клетка. (А, В, Д) общий вид. (Б, Г, Е) инфицированные клетки. (А–Б) необработанные клубеньки (контроль). (В–Г) клубеньки на растениях, обработанных 0,1 мМ раствором BSO. (Д–Е) клубеньки на растениях, обработанных растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH. Наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала, красный канал — ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 100 мкм (А, В, Д), 10 мкм (Б, Г, Е).

У растений мутантной линии *sym40-1*, обработанных BSO, количество клубеньков уменьшалось только на 26%, и было таким же, как и у необработанных растений, после обработки растворами BSO и GSH. В обработанных BSO клубеньках мутанта *sym40-1* микроскопический анализ выявил многочисленные симбиосомы, содержащие несколько бактериоидов (рис. 8Б), что не наблюдалось в необработанных (рис. 8А) или обработанных растворами BSO и GSH клубеньках (рис. 8В). В обработанных растворами BSO и GSH корнях с клубеньками мутантной линии *sym40-1* уровни GSH и hGSH составляли 103% и 113%, соответственно.

На обработанных раствором BSO растениях мутантной линии *sym33-3* наблюдалось снижение количества клубеньков на 98%, на обработанных растворами BSO и GSH — на 50% по сравнению с необработанными растениями. Развитие мутантных клубеньков *sym33-3*, обработанных раствором BSO, было нарушено на ранней стадии, вероятно, из-за

остановки развития меристемы, кроме того, инфекционные нити проявляли признаки частой блокировки и образовывали вздутия (рис. 8Д). Такой же эффект на развитие инфекционных нитей наблюдался в клубеньках мутантной линии *sym33-2*. В корнях с клубеньками, обработанными растворами BSO и GSH количество GSH и hGSH составляло только 38% и 18%, соответственно, от количества тиолов в необработанных растениях. Однако, не было выявлено отличий таких клубеньков от клубеньков на необработанных растениях (рис. 8Г, Е).



**Рисунок 8. — Гистологическая организация клубеньков *P. sativum* мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3*, обработанных растворами L-бутионин-S,R-сульфоксимида (BSO) и глутатиона (GSH) через 2 недели после инокуляции**

Клетки клубеньков мутантной линии *sym40-1* (А–В); общий вид клубеньков мутантной линии *sym33-3* (Г–Е). Необработанные клубеньки (А, Г); клубеньки на растениях, обработанных раствором 0,1 мМ раствором BSO (Б, Д); клубеньки на растениях, обработанных растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH (В, Е). я — ядро; ИК — инфицированная клетка; наконечник стрелки указывает на инфекционные капли; двойной наконечник — на аномальные симбиосомы, содержащие несколько бактериоидов; I — зона меристемы; стрелками обозначена зона распространения заблокированных инфекционных нитей. Наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала, красный канал — ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 10 мкм (А–В), 100 мкм (Г–Е).

Содержание тиолов снижается во время естественного и индуцированного старения в клубеньках *G. max* (Evans *et al.*, 1999), *P. sativum* (Groten *et al.*, 2005) и *Phaseolus vulgaris* (Loscos *et al.*, 2008). В данной работе обработка растений раствором BSO вызвала индукцию раннего старения, проявляющегося в деградации зоны азотфиксации в клубеньках дикого типа и увеличении уровня экспрессии генов, связанных со старением *Cyp15a* и *TPP*. Таким образом, GSH и hGSH имеют решающее значение для функционирования азотфиксирующих клеток в клубеньках *P. sativum*.

Обработанные раствором BSO клубеньки мутантной линии *sym40-1* характеризовались образованием многочисленных симбиосом, содержащих несколько бактериоидов, окруженных общей симбиосомной мембраной. Ранее такой тип симбиосом был описан для клубеньков *P. sativum* мутантной линии *sym31* и клубеньков, выращенных в условиях дефицита бора (Borisov *et al.*, 1997; Bolaños *et al.*, 2001). Предполагалось, что этот фенотип может быть связан с модификацией и неправильной локализацией симбиосомной изоформы лектиноподобного гликопротеина NLEC-1 (Dahiya *et al.*, 1998).

Анализ распределения NLEC-1 в клубеньках мутантной линии *sym40-1*, обработанных раствором BSO, заслуживает дальнейшего изучения.

Блок развития меристемы и специфическое прерывание роста инфекционных нитей наблюдались в клубеньках мутанта *sym33-3* с недостатком GSH и hGSH. Эти морфологические изменения могли быть вызваны подавлением экспрессии гена *NF-YA1*, так как сходный фенотип наблюдался у мутанта *M. truncatula nf-ya1-1* (Laporte *et al.*, 2014). NF-YA1 представляет собой ССААТ box-связывающий фактор транскрипции, необходимый для формирования и функционирования меристемы клубенька, а также контролирующей рост инфекционных нитей и колонизацию тканей клубенька (Combieg *et al.*, 2006). Изменение свойств клеточной стенки инфекционной нити может объяснять вздутия и неупорядоченный характер роста инфекционной нити, наблюдаемые у мутанта *nf-ya1-1* (Laporte *et al.*, 2014) и в клубеньках мутанта *sym33-3* с недостатком GSH и hGSH.

Снижение синтеза тиолов значительно уменьшало количество клубеньков во всех генотипах. Это совпадает с данными, полученными для *M. truncatula*, где ингибирование синтеза GSH и hGSH уменьшало количество формирующихся клубеньков и боковых корней (Frendo *et al.*, 2005). Эти факты указывают на то, что уменьшение количества клубеньков у обработанных раствором BSO растений всех генотипов могло происходить, по крайней мере частично, из-за нарушения формирования меристемы в тканях корня. Интересно отметить, что на растениях, обработанных растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH, количество клубеньков было таким же, как и на необработанных растениях для всех генотипов, за исключением мутанта *sym33-3*. Это означает, что в растениях мутантной линии *sym33-3* могут существовать дополнительные факторы, регулирующие количество клубеньков. Клубеньки мутанта *sym33-3*, характеризуются усилением защитных ответов и, вероятно, повышенным синтезом салициловой кислоты – негативного регулятора клубенькообразования (Цыганова, Цыганов, 2018). Это косвенно подтверждается высоким уровнем экспрессии генов *PR1* и *PR10*, которые индуцируются салициловой кислотой, в необработанных растениях мутантной линии *sym33-3* и обработанных растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH, по сравнению с другими генотипами. Принимая во внимание, что меристема все-таки формировалась в клубеньках мутантной линии *sym33-3*, обработанных растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH, где уровни GSH и hGSH составляли только 38% и 18% от уровней этих тиолов в необработанных растениях, можно предположить, что определенный минимальный уровень тиолов является существенным для функционирования меристемы, но является недостаточным для восстановления количества клубеньков у данного мутанта.

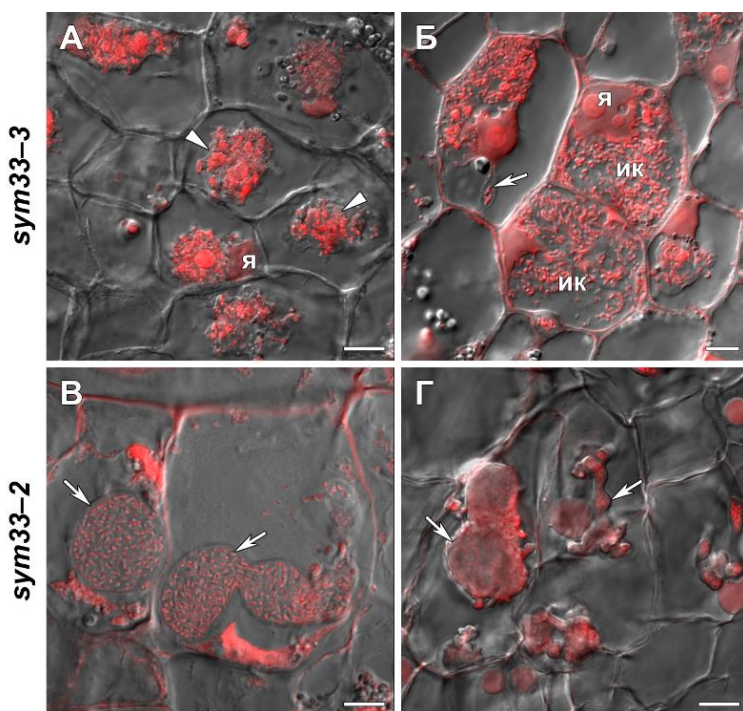
Таким образом, недостаток тиолов приводит к разрушению азотфиксирующих клеток в клубеньках дикого типа, что может быть доказательством прямой роли GSH и hGSH в поддержании и функционировании инфицированных клеток. В то же время, другие эффекты недостатка этих тиолов, наблюдаемые в мутантных клубеньках, могут указывать на их функции в развитии меристемы, формировании определенного числа клубеньков, росте инфекционных нитей и делении симбиосом.

#### **4.3. Анализ влияния обработки экзогенным глутатионом на морфологию клубеньков *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3***

Чтобы изучить влияние концентрации тиолов и их соотношения на развитие клубеньков, корни *P. sativum* дикого типа и мутантных линий обрабатывали 0,1 мМ или 1 мМ раствором GSH. Обработка растений *P. sativum* дикого типа 0,1 мМ раствором GSH в течение 2 недель приводила к двукратному увеличению количества GSH и не влияла на количество hGSH в корнях с клубеньками. В то же время обработка раствором 1 мМ GSH вызвала трехкратное увеличение количества обоих тиолов. У мутантной линии *sym40-1* обработка 0,1 мМ раствором GSH не влияла на количество GSH, но приводила к 25% увеличению количества hGSH в корнях с клубеньками. Обработка раствором 1 мМ GSH вызывала почти трехкратное увеличение количества обоих тиолов, как и в корнях растений

дикого типа. Корни с клубеньками мутантной линии *sym33-3*, характеризовались 25% увеличением уровня GSH и 35% снижением количества hGSH после обработки 0,1 мМ раствором GSH, и только 1,5-кратным увеличением количества GSH и двукратным увеличением hGSH после обработки 1 мМ раствором GSH.

Микроскопический анализ клубеньков дикого типа и мутантной линии *sym40-1* после обработки растворами GSH различных концентраций не выявил каких-либо хорошо заметных отличий от необработанных клубеньков. Обработка GSH мутантной линии *sym33-3* приводила к образованию структур, подобных инфекционным каплям во многих клетках клубеньков, некоторые из них были гипертрофированы, особенно после обработки 1 мМ раствором GSH (рис. 9А), в некоторых клетках происходил выход бактерий (рис. 9Б). Однако, эти клетки с хаотично расположенными бактериоидами отличались по структурной организации от инфицированных клеток дикого типа (рис. 9Б). Обработка корней мутантной линии *sym33-2* раствором 1 мМ GSH не изменяла степень инфекции клубеньковых примордиев, но приводила к чрезмерному росту и набуханию инфекционных нитей, которые проявляли признаки частой остановки и формировали вздутия в наружной коре клубенька (рис. 9В–Г). Никаких видимых изменений в гистологической структуре клубеньков мутанта *sym33-2* после обработки корней 0,1 мМ раствором GSH по сравнению с необработанными растениями не наблюдалось.



**Рисунок 9. — Гистологическая организация клубеньков *P. sativum* мутантных линий *sym33-3* и *sym33-2*, обработанных 1 мМ раствором глутатиона через 2 недели после инокуляции**

Клетки клубенька мутантной линии *sym33-3* (А–Б); клетки клубенька мутантной линии *sym33-2* (В–Г). я — ядро; ик — инфицированная клетка; стрелка указывает на инфекционные нити, наконечник стрелки — на инфекционные капли. Наложение дифференциально-интерференционного контраста и красного канала, красный канал — ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 100 мкм.

Клубеньки мутантной линии *sym33-3*, обработанные 1 мМ раствором GSH, были инфицированы в большей степени, чем клубеньки на необработанных растениях, однако, это сопровождалась усилением экспрессии *PR*-генов и гена цистеиновой протеазы *Syp15a*, а также дезорганизацией бактериоидов в инфицированных клетках. Можно сделать вывод, что стимуляция инфекции в этих клубеньках вызывает также и усиление защитных реакций, что впоследствии приведет к деградации инфицированных клеток, как это происходит в клубеньках мутанта *sym40-1*.

Стоит отметить, что обработка корней с клубеньками мутантов *sym33* 1 мМ раствором GSH также приводила к нарушениям в развитии инфекционных нитей. Возможным объяснением может быть способность GSH изменять свойства арабиногалактанпротеин экстензинов, локализованных в просвете инфекционных нитей (Bradley *et al.*, 1992). Такие арабиногалактанпротеин экстензины, окружая бактерии в

инфекционных нитях, могут ограничивать их рост, а также регулировать рост самих инфекционных нитей (Wisniewski *et al.*, 2000). Эти данные подтверждают участие GSH в контроле роста инфекционных нитей. GSH в зависимости от концентрации может влиять на уровень экспрессии гена *NF-YA1* или напрямую – взаимодействуя с арабиногалактанпротеин экстензинами в матриксе инфекционных нитей. Более того, параллель между эффектами недостатка тиолов и обработки растений 1 мМ раствором GSH подчеркивает неоднозначную роль этого тиола в азотфиксирующем симбиозе и тонкую настройку клеточного ответа в соответствии с фактическим содержанием GSH.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ризобии могут вступать с бобовыми растениями как в мутуалистические, так и в паразитические взаимоотношения. Поэтому растения должны контролировать все этапы развития клубенька и его функционирования, чтобы избежать нежелательных затрат энергии, отделяя защитные механизмы от процессов деления и дифференцировки клеток. Координация процессов развития и защитных ответов, осуществляемая посредством взаимодействия активных форм кислорода, фитогормонов, GSH/hGSH и окислительно-восстановительного баланса, является необходимой для регуляции такой чувствительной системы, как симбиотический клубенек (Foyer *et al.*, 2009; Foyer, Noctor, 2013; Diaz-Vivancos *et al.*, 2015).

С использованием линии *P. sativum* дикого типа и симбиотических мутантных линий, заблокированных на разных стадиях развития клубенька и характеризующихся проявлением разнообразных защитных ответов, были выявлены функции GSH и hGSH.

Количество GSH и hGSH, а также их соотношение играют роль в восприятии растениями *P. sativum* ризобий в качестве симбионтов или патогенов. Более высокое соотношение GSH : hGSH в клубеньках по сравнению с корнями, необходимо для развития симбиоза и высвобождения бактерий в растительную клетку. В симбиотическом клубеньке *P. sativum* GSH участвует в меристематической активности клеток и, вероятно, также в эндоредупликации в инфицированных клетках, росте инфекционных нитей, поддержании азотфиксации в бактериоидах и адаптации к стрессовому воздействию у ризобий. GSH и hGSH необходимы для устойчивости азотфиксирующих клеток и вовлечены в защитные реакции растений. Для участия GSH и hGSH в симбиотических взаимодействиях или защитных реакциях, их количество и соотношение в клубеньке должно строго контролироваться.

Дальнейшие исследования необходимы, чтобы окончательно прояснить специфическую роль hGSH в развитии и функционировании симбиотических клубеньков, а также выявить селективное преимущество, обеспечиваемое hGSH для бобовых растений, которое позволило сохранить активность гена *hGSHS* в процессе эволюции.

## ВЫВОДЫ

1. Мутации *P. sativum sym33-3* и *sym40-1* приводят к восприятию микросимбионта в качестве потенциального патогена, что проявляется в отложении суберина в тканях неэффективных клубеньков и экспрессии генов – маркеров защитных реакций. Стимуляция инфекции в мутантных клубеньках *sym33-3* экзогенным GSH вызывает усиление защитных реакций.
2. Изменения в активности генов *GSHS* и *hGSHS* и количестве тиолов GSH и hGSH, наблюдаемые после высвобождения бактерий из инфекционных нитей в клубеньках *P. sativum*, являются частью программы развития симбиотического клубенька.
3. В эффективных клубеньках *P. sativum* поддерживается более высокое соотношение GSH : hGSH, чем в неэффективных клубеньках и инокулированных корнях.
4. GSH необходим для функционирования меристемы клубенька *P. sativum* и бактериоидов при эффективном симбиозе.

5. Снижение концентрации GSH и hGSH в корнях *P. sativum* приводит к уменьшению числа клубеньков и индукции раннего старения в клубеньках дикого типа, проявляющегося в деградации зоны азотфиксации и увеличении уровня экспрессии генов – маркеров старения. В клубеньках мутантной линии *sym40-1* недостаток GSH и hGSH приводит к формированию симбиосом, содержащих несколько бактериоидов.
6. Как снижение, так и увеличение концентрации тиолов в неэффективных клубеньках *P. sativum* по сравнению с клубеньками дикого типа, являются частью защитных реакций, проявление которых зависит от стадии, на которой было нарушено развитие клубенька и произошло переключение симбиотической программы на защитный ответ.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### **Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ:**

1. Tsyganova A.V., **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Histological and ultrastructural nodule organization of the pea (*Pisum sativum*) mutant SGEFix<sup>-5</sup> in the *Sym33* gene encoding the transcription factor *PsCYCLOPS/PsIPD3* // Ecological genetics. 2019. V. 17.1. P. 65-70. (Scopus)
2. **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Antioxidant defense system in symbiotic nodules of legumes // Agricultural Biology. 2017. V. 52.5 P. 878-894. (Scopus)
3. **Ivanova K.A.**, Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations *sym40* (*PsEFD*), *sym33* (*PsIPD3/PsCYCLOPS*) and *sym42* // Protoplasma. 2015. V. 252.6. P.1505-1517. (WoS, Scopus)
4. **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Defense responses during the Legume – *Rhizobium* symbiosis: induction and suppression // Agricultural Biology. 2014. V. 3. P. 3-12. (Scopus)

### **Публикации в других научных изданиях:**

1. Чернова Е.Н., **Иванова К.А.**, Русских Я.В., Кулаева О.А. Масс-спектрометрический анализ низкомолекулярных тиолов в тканях растений (на примере гороха посевного *Pisum sativum* L.). // Региональная экология. 2018. Т. 52. С. 82-94.
2. **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Nodule development is accompanied by a change in the glutathione / homoglutathione ratio in *Pisum sativum* L. VII International congress and associate symposiums of Vavilov society of geneticists and breeders on the 100th anniversary of the Department of Genetics of Saint Petersburg State University. June 18-22, 2019, Saint Petersburg, Russia, P.952.
3. **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. The role of glutathione and homoglutathione at different stages of pea (*Pisum sativum* L.) nodule development. 13th European Nitrogen Fixation Conference. 18–21 August, 2018, Stockholm, Sweden.
4. **Иванова К.А.**, Кулаева О.А., Кусакин П.Г., Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Роль низкомолекулярных тиолов в процессах формирования и дифференцировки симбиотического клубенька гороха посевного (*Pisum sativum* L.) Всероссийская научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды». 10–15 июля 2018, Иркутск, Россия. С. 362-365.
5. **Ivanova K.A.**, Tsyganova A.V., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Novel evidence for distinct roles of glutathione and homoglutathione during pea (*Pisum sativum*) nodule development. 20th International Congress on Nitrogen Fixation. 3–7 September, 2017, Granada, Spain. P.161
6. **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Role of low-molecular-weight thiols during development of effective and ineffective Legume-*Rhizobium* symbiosis. 4th

International Symposium on Plant Signaling and Behavior. June 19–23, 2016, Saint Petersburg, Russia, P. 185.

7. **Иванова К.А.**, Цыганов В.Е. Роль глутатиона и гомоглутатиона при формировании эффективного и неэффективного бобово-ризобияльного симбиоза. IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». 20–23 сентября 2016, Казань, Россия. С. 69-70.
8. **Иванова К.А.**, Цыганов В.Е. Роль низкомолекулярных тиолов при формировании эффективного и неэффективного бобово-ризобияльного симбиоза. Конференция «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма». 21–24 июня 2016, Санкт-Петербург, Россия, С. 376-377.
9. **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Glutathione and homoglutathione are essential at different stages of pea nodule development and are involved in defense responses in ineffective nodules. 19th International Congress on Nitrogen Fixation. October 4–9, 2015, Pacific Grove, CA, USA. P. 153.
10. **Иванова К.А.**, Цыганов В.Е. Функционирование антиоксидантной системы в эффективном и неэффективном бобово-ризобияльном симбиозе. Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». 21–26 сентября 2015, Петрозаводск, Россия. С. 218.
11. **Иванова К.А.**, Цыганов В.Е. Глутатион как основной элемент антиоксидантной защиты в симбиотических клубеньках гороха: иммунолокализация и анализ экспрессии генов биосинтеза. Международная конференция «Генетическая интеграция прокариот и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии». 24–27 июня 2015, Санкт-Петербург, Россия. С. 72.
12. **Иванова К.А.**, Цыганов В.Е. Молекулярно-генетический анализ роли глутатиона в развитии симбиотических клубеньков гороха. VI Съезд ВОГИС и ассоциированные генетические симпозиумы. 15–20 июня 2014, Ростов-на-Дону, Россия. С. 77-78.
13. **Иванова К.А.**, Кусакин П.Г., Цыганов В.Е. Роль глутатиона как основного антиоксиданта в развитии симбиотических клубеньков гороха. 18-ая Международная Пуштинская школа – конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». 21–25 апреля 2014, Пушкино, Россия. С. 386.
14. **Иванова К.А.**, Цыганова А.В., Бревин Н.Дж., Цыганов В.Е. Проявления защитных реакций в ходе развития неэффективного симбиоза между горохом посевным *Pisum sativum* и клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. II(X) Международная ботаническая конференция молодых ученых. 11–16 ноября 2012, Санкт-Петербург, Россия. С. 62
15. **Иванова К. А.**, Цыганова А. В., Бревин Н. Дж., Цыганов В. Е. Анализ защитных реакций при формировании неэффективных симбиотических клубеньков гороха посевного. VI Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». 24–28 сентября 2012, Саратов, Россия. С. 108.