

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ»**

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

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, Цыганов Виктор Евгеньевич

Санкт-Петербург

2021

Оглавление

Список сокращений	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	14
1.1. Развитие симбиотического клубенька.....	14
1.1.1. Сигнальный путь, запускаемый Nod-факторами.....	14
1.1.2. Формирование и рост инфекционной нити	19
1.1.3. Развитие клубенька и его инфицирование бактериями	21
1.1.4. Гистологическая организация недетерминированного клубенька и другие типы клубеньков.....	26
1.2. Иммуитет растений	29
1.3. Роль иммунитета растений в бобово-ризобиальном симбиозе	34
1.3.1. Двойственная роль Nod-факторов.....	34
1.3.2. Поверхностные компоненты ризобий.....	39
1.3.3. Эффекторы ризобий и системы секреции третьего и четвертого типов	41
1.3.4. Контроль иммунного ответа со стороны растения.....	44
1.4. Роль активных форм кислорода в формировании симбиотического клубенька	48
1.5. Тиоловые трипептиды глутатион и гомоглутатион.....	50
Глава 2. Материалы и методы.....	61
2.1. Объекты исследования и условия выращивания.....	61
2.2. Обработка L-бутионин-S,R-сульфоксимином и экзогенным глутатионом	63
2.2.1. Обработка L-бутионин- S,R-сульфоксимином.....	63
2.2.2. Обработка экзогенным глутатионом	64
2.3. Молекулярные методы	64
2.3.1. Выделение тотальной РНК	64
2.3.2. Реакция обратной транскрипции.....	66
2.3.3. Дизайн праймеров и стандартный ПЦР-анализ.....	66
2.3.4. Относительный ПЦР-анализ в режиме реального времени	67
2.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с масс-спектрометрическим детектированием	71

2.4.1. Экстракция.....	71
2.4.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с масс-спектрометрическим детектированием	71
2.5. Методики пробоподготовки и микроскопии	73
2.5.1. Фиксация материала	73
2.5.2. Гистохимический анализ и световая микроскопия	73
2.5.3. Иммунолокализация и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия	75
Глава 3. Результаты исследований	77
3.1. Изучение проявления защитных реакций в клубеньках <i>P. sativum</i> , индуцируемых мутациями <i>sym40-1</i> и <i>sym33-3</i>	77
3.1.1. Анализ гистохимической локализации отложений суберина в клубеньках <i>P. sativum</i> дикого типа и мутантных линий <i>sym40-1</i> и <i>sym33-3</i>	77
3.1.2. Анализ относительной экспрессии генов <i>7RA84</i> (пероксидаза), <i>HSR203J</i> (маркер реакции гиперчувствительности), и <i>ABR17</i> (белок из семейства PR10.4) в клубеньках <i>P. sativum</i> дикого типа и мутантных линий <i>sym40-1</i> и <i>sym33-3</i>	80
3.2. Анализ относительной экспрессии генов биосинтеза тиолов в трехнедельных корнях и клубеньках <i>P. sativum</i> дикого типа и мутантных линий <i>sym40-1</i> , <i>sym33-2</i> и <i>sym33-3</i>	82
3.3. Анализ содержания тиолов в трехнедельных корнях и клубеньках <i>P. sativum</i> дикого типа и мутантных линий <i>sym40-1</i> , <i>sym33-2</i> и <i>sym33-3</i>	84
3.4. Анализ иммунолокализации восстановленной формы GSH в клубеньках <i>P. sativum</i> дикого типа и мутантных линий <i>sym40-1</i> , <i>sym33-2</i> и <i>sym33-3</i>	87
3.5. Анализ влияния обработки L-бутионин-S,R-сульфоксимином на морфологию клубеньков и экспрессию генов в корнях растений дикого типа и мутантных линий <i>sym40-1</i> , <i>sym33-2</i> и <i>sym33-3</i>	93
3.5. Анализ влияния обработки экзогенным глутатионом на морфологию клубеньков и экспрессию генов в корнях растений дикого типа и мутантных линий <i>sym40-1</i> и <i>sym33-3</i>	100
Обсуждение.....	105
1. Проявление защитных реакций в неэффективных симбиотических клубеньках мутантных линий, блокированных на различных стадиях развития симбиоза.....	105

2. Эффективные и неэффективные симбиотические клубеньки отличаются по содержанию и соотношению тиолов	109
3. Локализация GSH указывает на его важную роль в формировании меристемы клубенька, процессах азотфиксации бактериоидов и реакции на стресс у ризобий.....	113
4. GSH и hGSH вовлечены в регуляцию экспрессии генов <i>GSH1</i> , <i>GSHS</i> , <i>Sup15a</i> , <i>TPP</i> , <i>PR1</i> , <i>PR10</i> , <i>NF-YA1</i> в корнях с клубеньками <i>P. sativum</i>	114
5. Недостаток тиолов приводит к уменьшению количества клубеньков, деградации азотфиксирующих клеток, влияет на развитие симбиосом у мутантной линии <i>sym40-1</i> и активность меристемы у мутантной линии <i>sym33-3</i>	116
Заключение	120
ВЫВОДЫ.....	123
Список литературы	124
ПРИЛОЖЕНИЕ	155

Список сокращений

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ДТ – дикий тип

НПИ – недель после инокуляции

ПЦР – полимеразная цепная реакция

GSH – глутатион

hGSH – гомоглутатион

BSO – L-бутионин-S,R-сульфоксимин

ВВЕДЕНИЕ

Растениям, ведущим неподвижный образ жизни, приходится постоянно приспосабливаться к меняющимся условиям окружающей среды, что оказывает огромное влияние на их развитие и функционирование (Sultan, 2000). Одной из важнейших адаптаций к изменениям условий обитания, появившихся в ходе эволюции, является способность бобовых растений формировать азотфиксирующие симбиотические клубеньки в условиях недостатка азота. Симбиотический клубенек представляет собой уникальную модель, в которой можно проследить последовательность и взаимодействие таких процессов, как дедифференцировка клеток внутренней коры корня, 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 бактериоидами (Tsyganova *et al.*, 2018; Benezech *et al.*, 2020). В формировании и функционировании такой чувствительной системы, как азотфиксирующий клубенек окислительно-восстановительное состояние растительной клетки и ее компарментов, определяемое соотношением про- и антиоксидантов и их взаимодействием, контролирует множество процессов (Ribeiro *et al.*, 2015; Matamoros, Vecana, 2020). Большинство антиоксидантов, присутствующих в других органах растений, также содержатся и в клубеньках, однако, в более высокой концентрации, что, вероятно, связано с высокой интенсивностью процессов, связанных с биологической азотфиксацией (Vecana *et al.*, 2010). Особого внимания заслуживает водорастворимый антиоксидант и окислительно-восстановительный буфер растений – низкомолекулярный тиол глутатион (GSH). GSH участвует в регуляции развития и реакции на биотический и абиотический стресс у растений, выполняя ряд уникальных функций, не позволяющих заменить его другим тиолом или антиоксидантом (Maughan,

Foyer, 2006; Foyer, Noctor, 2011; Noctor *et al.*, 2012; Frenedo *et al.*, 2013). 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). Дефицит GSH и hGSH также приводит к значительному снижению количества возникающих клубеньков (Frenedo *et al.*, 2005).

Транскриптомный анализ растений *Medicago truncatula* Gaertn. 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).

Все 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.

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является объектом интенсивных генетических, физиологических и биохимических исследований, будучи при этом важнейшей зернобобовой культурой. Он может взаимодействовать с почвенными бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, формируя азотфиксирующие клубеньки. Для *P. sativum* созданы обширные коллекции симбиотических мутантов (Tsyganov, Tsyganova, 2020), которые являются удобными моделями для выявления специфических функций GSH и hGSH и их мишеней в процессе формирования и функционирования симбиотического клубенька.

Таким образом, 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 инокулированных 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 деградации 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 инокулированных 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 Яной Владимировной и Черновой Екатериной Николаевной в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук (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» ФГБУН 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 Пущинской школы – конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (2014 г., Пущино), 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 для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга), 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 Виктору Евгеньевичу Цыганову 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 Кириллу Николаевичу Демченко, Анне Викторовне Цыгановой, Анне Китаевой,

Татьяне Серовой, Петру Кусакину и Артемию Горшкову, а также сотрудникам других лабораторий ФГБНУ ВНИИСХМ Ольге Кулаевой, Ирине Леппянен, Анне Кириенко за помощь в рабочем процессе и дружескую атмосферу. Автор признательна сотрудникам центра коллективного пользования ФГБНУ ВНИИСХМ и Александру Георгиевичу Пинаеву, а также сотрудникам НИЦЭБ РАН Яне Владимировне Русских и Екатерине Николаевне Черновой за помощь в проведении анализов в рамках данной работы. Автор выражает благодарность Елене Анатольевне Долгих за конструктивные замечания к проведенному исследованию и тексту диссертации.

Автор искренне благодарна своим родителям Марине Геннадьевне и Андрею Валентиновичу Ивановым, сестре Ольге Андреевне Переваловой, а также Алексею Сергеевичу Дмитриеву за безграничную любовь, заботу и поддержку. Автор искренне благодарна своим друзьям за поддержание боевого духа при создании диссертации.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Развитие симбиотического клубенька

Специфика симбиотических отношений заключается в возникновении у организмов новых признаков, отсутствующих в свободноживущем состоянии и обеспечивающих увеличение адаптивного потенциала партнеров. В условиях азотного голодания растения из семейства бобовые (Fabaceae) могут вступать во взаимодействие с почвенными бактериями, ризобиями, что ведет к формированию новых корневых органов – клубеньков. Симбиоз бобовых растений с ризобиями – одна из наиболее эффективных систем биологической азотфиксации, что опосредованно сложной структурой клубеньков, образующихся в результате реализации партнерами специфических программ развития. Клубеньки бобовых растений обеспечивают экологическую нишу для размещения ризобий, структурную основу для обмена партнеров метаболитами, а также для контроля над численностью и физиологической активностью бактерий. Ризобии относятся к классам α - β - и γ -протеобактерий (Berrada, Fikri-Benbrahim, 2014). Основой для функционирования азотфиксирующих симбиозов являются имеющиеся у микробных партнеров гены, контролирующие синтез и секрецию Nod-факторов (Downie, 1998); необходимые для синтеза фермента нитрогеназы (Kaminski *et al.*, 1998); определяющие функционирование бактерий в симбиотическом состоянии (Fischer, 1994; van Rhijn, Vanderleyden, 1995).

1.1.1. Сигнальный путь, запускаемый Nod-факторами

Симбиоз бобового растения и ризобий начинается с сигнального диалога, который инициируется веществами, выделяемыми корнями растений. К этим веществам относятся флавоноиды (Cooper, 2004), взаимодействующие с бактериальным регулятором транскрипции – NodD, который активирует экспрессию *nod* генов, вызывая тем самым образование и выделение Nod-факторов (D'Haese, Holsters, 2002). Ген *nodD*, в отличие от других *nod* генов, характеризуется конститутивной экспрессией (Schultze,

Kondorosi, 1998). Взаимодействие белка NodD с флавоноидами определенной структуры является специфичным. Так, у *R. leguminosarum* bv. *viciae* NodD взаимодействует с нарингенином и апигенином, а у *Sinorhizobium meliloti* – с лютеолином и кверцитином, а у *Bradyrhizobium japonicum* – с изофлавонами генистеином и дайдзеином (Firmin *et al.*, 1986). Nod-факторы, производимые ризобиями, представляют собой липохитоолигосахариды (3-6 остатков *N*-ацетил-*D*-глюкозамина), которые несут на невосстанавливаемом конце высокомолекулярную жирную кислоту (C₁₆-C₂₀) и ряд радикалов – ацетил, сульфат, карбамоил, фукозил – в разных позициях углеводного скелета (Овцына, Тихонович, 2004). Характер таких модификаций важен для определения хозяйской специфичности и определяет способность ризобий формировать клубеньки на корнях определенных бобовых растений.

Восприятие Nod-факторов осуществляется расположенными в эпидермальных клетках растений трансмембранными серин/треонин рецептор–подобными киназами с тремя лизиновыми мотивами (LysM) во внеклеточных доменах (Radutoiu *et al.*, 2003). У *Lotus japonicus* (L.) K. Larsen рецептор состоит из двух белков: Nod factor receptor 1 (NFR1), имеющего активный внутриклеточный киназный домен, и NFR5 с неактивным внутриклеточным киназным доменом, неспособным к автофосфорилированию (Madsen *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006; Madsen *et al.*, 2011). Оба белка, по-видимому, необходимы для распознавания лиганда, но передача сигналов может происходить только через белок с активной киназой. У *M. truncatula* рецептор-подобные киназы кодируются генами *Nod factor perception* (*MtNFP*) (Amor *et al.*, 2003) и *LysM domain-containing receptor-like kinase* (*MtLYK3*) (Limpens *et al.*, 2003). Ортологами этих генов у *P. sativum* являются гены *PsSym10* (Arrighi *et al.*, 2006) и *PsSym37* (Zhukov *et al.*, 2008). Предполагается, что данные киназы формируют гетеродимерные рецепторные комплексы: LjNFR1 и LjNFR5 у *L. japonicus*, MtNFP и MtLYK3 у *M. truncatula*, PsSym10 и PsSym37 у *P. sativum* (Zhukov *et al.*, 2008; Oldroyd, 2013). Следует отметить, что у *M. truncatula* для проявления ранних ответов на Nod-факторы

и для развития инфекции необходима рецепция различных компонентов Nod-фактора. Было предположено, что комплекс MtNFP и MtLYK3 исполняет роль рецептора «проникновения» (Morieri *et al.*, 2013). Поскольку MtNFP является неактивной киназой, то возможно существование не выявленного еще рецептора, объединяясь с которым MtNFP выполняет сигнальную функцию (Fliegmann, Vono, 2015). В случае *P. sativum* вероятно, что рецептором «проникновения» является комплекс PsSym10 и PsSym37 (Zhukov *et al.*, 2008), в то время как сигнальную функцию выполняет комплекс PsSym10 с рецептор-подобной киназой PsK1 (Zhukov *et al.*, 2008; Kirienko *et al.*, 2018).

Ранние ответы растения на Nod-факторы связаны с определенными физиологическими реакциями в чувствительных корневых волосках. В течение минуты после взаимодействия с Nod-факторами в кончиках корневых волосков увеличивается концентрация ионов Ca^{2+} и снижаются концентрации Cl^- и K^+ , что связано с деполяризацией мембраны (Felle *et al.*, 1998). Спустя 10-15 мин в клетках корневых волосков возникает другой ответ, заключающийся в колебаниях концентрации Ca^{2+} в цитоплазме вокруг ядра (Ehrhardt *et al.*, 1996; Wais *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000) и в самом ядре (Sieberer *et al.*, 2009), что приводит к индукции экспрессии генов, специфичных для симбиоза (Zipfel, Oldroyd, 2017). В регуляцию Ca^{2+} осцилляций вовлечен мевалонат, являющийся вторичным мессенджером (Venkateshwaran *et al.*, 2015) и синтезируемый ферментом 3-гидрокси-3-глутарил кофермент А редуктазой 1 (Kevei *et al.*, 2007). Фермент активируется при взаимодействии с рецептор-подобной киназой с лейцин-богатыми повторами LRR (от англ. Leucine-Rich Repeat). Эта киназа функционирует после MtNFP и MtLYK3 и кодируется генами *Does not make infection 2* (*MtDMI2*) у *M. truncatula* (Endre *et al.*, 2002) и *Symbiosis receptor-like kinase* (*LjSYMRK*) у *L. japonicus* (Stracke *et al.*, 2002). У *P. sativum* ортологом этих генов является ген *PsSym19* (Schneider *et al.*, 1999; Stracke *et al.*, 2002). Расположенный на внешней ядерной мембране калиевый канал MtDMI1 (Ané *et al.*, 2004; Riely *et al.*, 2007), кодируемый у *P. sativum* ортологичным геном *PsSym8* (Edwards *et al.*, 2007) и двумя ортологами у *L.*

japonicus: *LjCASTOR* и *LjPOLLUX* (Charpentier *et al.*, 2008) взаимодействует с кальциевыми каналами MtCNGC15a,b,c (Cyclic nucleotide – gated channel), вызывая выход Ca^{2+} в нуклеоплазму и перинуклеарную цитоплазму (Charpentier *et al.*, 2016). У *M. truncatula* также была идентифицирована АТФ-регулируемая кальциевая помпа MCA8, обеспечивающая поступление Ca^{2+} обратно в просвет ЭПР и ядерной оболочки (Caroen *et al.*, 2011). Кроме того, важная роль в генерации кальциевых осцилляций была показана для нуклеопоринов (Downie, 2014).

Первые морфологические изменения происходят примерно через 1 час после взаимодействия с Nod-факторами и заключаются в остановке роста кончика корневого волоска, его набухании и деформации. Реорганизация актинового и тубулинового цитоскелета может изменять направление движения везикул в сторону от центра апикальной части корневого волоска, тем самым изменяя направление роста (Voigt *et al.*, 2005; Timmers *et al.*, 2007). У *M. truncatula* был выявлен ген *MtDMI3*, мутации по которому приводят к неспособности корневых волосков к скручиванию (Catoira *et al.*, 2000), однако в таких волосках сохраняются Ca^{2+} осцилляции (Walker *et al.*, 2000). Ген *MtDMI3* и ген *PsSym9* (Walker *et al.*, 2000) являются ортологичными и кодируют кальций и кальмодулин-зависимую протеинкиназу (ССаМК). ССаМК может напрямую взаимодействовать с Ca^{2+} , что приводит к автофосфорилированию, связыванию с кальмодулином и фосфорилированию субстрата (Lévy *et al.*, 2004). В отсутствие Ca^{2+} ССаМК остается автоингибированной. Субстратом, который фосфорилирует ССаМК является транскрипционный фактор *LjCYCLOPS* у *L. japonicus*, *MtIPD3* (*Interacting protein with DMI3*) у *M. truncatula* и *PsSym33* у *P. sativum*. *LjCYCLOPS* связывается с промотором и индуцирует экспрессию гена *Nodule Inception* (*LjNIN*) (Singh *et al.*, 2014), транскрипционного фактора, который, в свою очередь, играет ведущую роль, как в развитии инфекции, так и в органогенезе клубенька (Marsh *et al.*, 2007), координируя программы в различных тканях корня (Vernié *et al.*, 2015). NIN также активирует экспрессию гена *Nuclear*

Factor-YA1 (NF-YA1), кодирующего другой транскрипционный фактор (Singh *et al.*, 2014). CYCLOPS может работать в комплексе, в состав которого входят представители транскрипционных факторов семейства GRAS (NSP1, NSP2 (Nodulation signaling pathway 1, 2) и DELLA), необходимым для экспрессии симбиотических генов (Zipfel, Oldroyd, 2017). Таким образом, сигнальный каскад, запускаемый Nod-факторами, приводит к реализации двух генетических подпрограмм развития клубенька: инфекции и органогенеза (Guinel, Geil, 2002; Tsyganov *et al.*, 2002) (Рисунок 1).

Развитие и функционирование симбиотического клубенька сопровождается экспрессией генов ранних и поздних нодулинов, специфично синтезирующихся в клубеньках (Verma *et al.*, 1992). Ранние нодулины участвуют в развитии клубенька, а активация кодирующих их генов осуществляется в течение часов или дней после инокуляции ризобиями. Например, было показано, что у *M. truncatula* MtNSP1 и MtNSP2 формируют комплекс, который ассоциирован с промоторами генов ранних нодулинов (в частности, с геном *Early nodulin 11 (MtENOD11)*) (Hirsch *et al.*, 2009). Гены поздних нодулинов активируются в период фиксации азота, когда появляется необходимость в ферментах углеродного и азотного метаболизма и структурных компонентах.

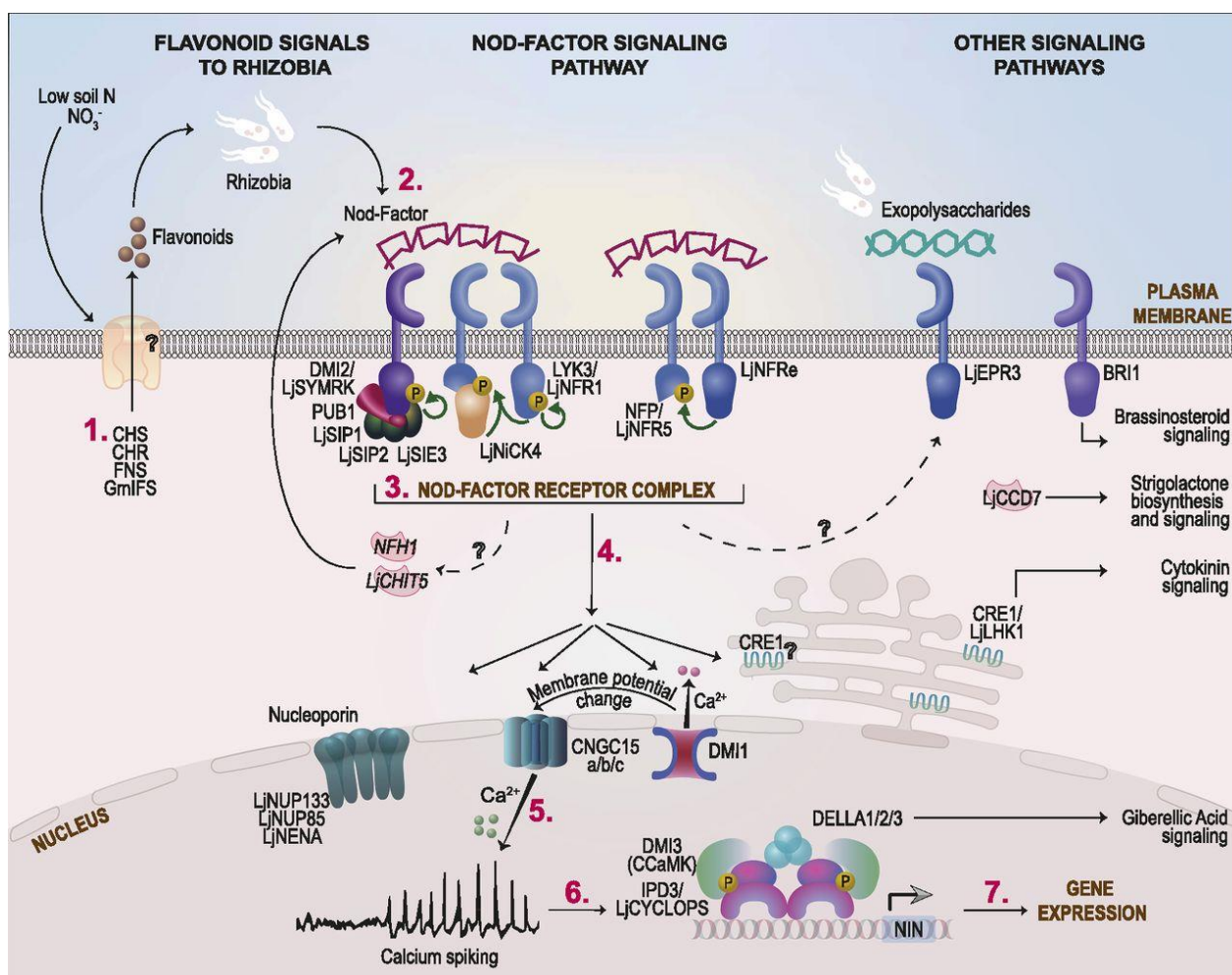


Рисунок 1. — Сигнальный каскад, активируемый Nod-факторами

Флавоноиды, синтезирующиеся растением в условиях недостатка азота в почве (1), запускают выработку бактериальных Nod-факторов (2), которые вместе с другими сигналами воспринимаются рецепторами на плазматической мембране эпидермальных клеток растения (3). Это запускает биохимические и физиологические реакции (4–6), которые приводят к изменениям в экспрессии ядерных генов (7). Подробное описание сигнальных путей и их компонентов дано в основном тексте (Roy *et al.*, 2020).

1.1.2. Формирование и рост инфекционной нити

После прикрепления ризобий к корневому волоску начинается его скручивание. Инфекционный карман (камера), образованный скрученным волоском, в котором бактерия делится и образует микроколонию, затем преобразуется в глобулярный компартмент (Fournier *et al.*, 2015) при участии белка – маркера экзоцитоза Vesicle–Associated Membrane Protein 721e (MtVAMP721e) и секреторного белка MtENOD11 у *M. truncatula*. Таким

образом, бактерии продвигаются вглубь корневого волоска за счет концевого роста этого компартмента, формирующего в итоге инфекционную нить. Однако, для этого необходима активность гена *MtNIN*.

Рост инфекционной нити является апикальным и связан с реструктуризацией цитоскелета растительной клетки и движением ядра от места скручивания корневого волоска к его основанию (Timmers, 2008). С помощью сети эндоплазматических микротрубочек ядро связывается с кончиком растущей инфекционной нити (Timmers *et al.*, 1999). Очевидно, что как актиновый (Hossain *et al.*, 2012), так и тубулиновый цитоскелет (Kitaeva *et al.*, 2016) играют важную роль в формировании и росте инфекционной нити.

Инфекционная нить – тубулярная структура, стенки которой являются продолжением растительной клеточной стенки и сходны с ней по составу (Tsyganova *et al.*, 2021).

У *L. japonicus* был идентифицирован ЛУК-рецептор – Exopolysaccharide receptor 3 (EPR3), опосредующий распознавание бактериальных экзополисахаридов в процессе ризобийной инфекции в клетке корневого волоска, что необходимо для успешного развития инфекционной нити (Рисунок 1) (Kawaharada *et al.*, 2015). Экзопполисахариды ризобий также, вероятно, обеспечивают движение бактерий в инфекционной нити (Rathbun *et al.*, 2002). Было предположено, что матрикс инфекционной нити в процессе колонизации ризобиями переходит из жидкого гелеобразного состояния, в котором ризобии способны передвигаться и делиться, в твердое состояние (Brewin, 2004) в результате действия пероксида водорода (Hérouart *et al.*, 2002). А в случае неэффективной инфекции повышающийся уровень пероксида водорода может приводить к аномальному отвердеванию матрикса и абортации инфекции (Brewin, 2004).

Для *M. truncatula* было показано участие в полярном росте инфекционной нити специфичного для симбиоза адапторного белка реморина MtSYMREM1 (Symbiotic remorin 1) и двух флотиллинов (MtFLOT2, MtFLOT4) – белков, образующих микродомены в плазматической мембране и взаимодействующих

с рецепторами MtLYK3, MtNFP и MtDMI2 (Haney, Long, 2010; Lefebvre *et al.*, 2010). Следует отметить, что в развитии инфекционной нити играют роль также и рассмотренные выше компоненты сигнального пути, активируемые Nod-факторами: LjCYCLOPS, LjNIN, MtNSP1, MtNSP2, MtDELLA, MtNF-YA1, а также E3 убиквитин лигаза которая играет роль не только в инициации и росте инфекционной нити, но и в координации этого процесса с органогенезом клубенька (Yano *et al.*, 2009). У *L. japonicus* ее кодирует ген *LjCERBERUS*, ортологом этого гена у *M. truncatula* является ген *Lumpy Infections (MtLIN)*.

1.1.3. Развитие клубенька и его инфицирование бактериями

Параллельно с развитием инфекционной нити, сигнальный каскад, активируемый Nod-факторами, приводит к образованию клубенькового примордия, что ассоциировано с процессами митотической реактивации, дедифференцировкой и пролиферацией клеток перицикла и внутренней коры в случае недетерминированных клубеньков (т.е. клубеньков с продолжительной активностью клубеньковой меристемы, подробнее см. раздел 1.1.4.) (Timmers *et al.*, 1999). Клеточные деления в корне индуцируются напротив сайта инфекции и перед протоксилемным полюсом (Libbenga, Harkes, 1973). Активированные клетки коры вновь входят в клеточный цикл, покидая стадию G0 (Yang *et al.*, 1994), происходит активация экспрессии гена *MtCycA2*, кодирующего циклин А-типа (необходимый для перехода G0/G1-S) (Roudier *et al.*, 2003), затем, для перехода в М фазу – циклинов В-типа, которые активируются во внутренних слоях коры (Yang *et al.*, 1994). На примере *M. truncatula* была показана последовательность событий при развитии клубенькового примордия. 5 слоев клеток коры корня условно были обозначены как С1 – С5, при этом С1 является самым наружным слоем, а С5 – внутренним, прилегающим к перициклу. После антиклинальных делений в перицикле такие деления начинают происходить в прилежащих слоях коры

C5-C4, затем они сменяются периклинальными, а антиклинальные деления индуцируются уже в слое C3 и эндодерме. Затем, периклинальные деления индуцируются в слое C3, перицикле и эндодерме, некоторые антиклинальные деления индуцируются в слое C2. Таким образом, производные клетки от слоя C3 формируют будущую многослойную меристему, слои C4/5 формируют около 8 слоев, перицикл и эндодерма – от 6 до 8 слоев. В клетках слоев C4/C5 прекращается митотическая активность, они увеличиваются в размерах и в них проникает инфекционная нить. В то же время клетки будущей меристемы остаются небольшого размера и не инфицируются (Рисунок 2). В развитии клубеньковых меристем участвуют гены, кодирующие транскрипционные факторы семейств WUSCHEL-related homeobox (WOX), KNOTTED1-related homeobox (KNOX) и PLETHORA (PLT) и играющие важную роль в функционировании меристем побегов и корня (Osipova *et al.*, 2012; Azarakhsh *et al.*, 2015; Franssen *et al.*, 2015). Для *M. truncatula* также было показано участие в развитии клубеньковой меристемы транскрипционного фактора NF-YA1 (Xiao *et al.*, 2014).

У *M. truncatula* выход бактерий в клетки, производные от слоев C4/C5, наблюдается спустя 80 часов после инокуляции. Инфицированные клетки увеличиваются в размерах и формируют 8 слоев клеток в основании зрелого клубенька (Xiao *et al.*, 2014). Высвобождение ризобий в цитоплазму растительной клетки происходит через инфекционные капли – выросты инфекционной нити, окруженные плазматической мембраной, но лишённые клеточной стенки (Brewin, 2004). Они содержат матрикс, который по составу сходен с матриксом инфекционной нити (Tsyganova *et al.*, 2021). Было показано участие в контроле формирования и функционирования инфекционных капель таких генов, как *MtSYMREM1*, *MtEFD* (у *P. sativum* ортологом является ген *Pssym40* (Tsyganov, Tsyganova, 2020), *MtNip* (*Numerous infections and polyphenolics*), и гена *LjNup133* (*Nucleoporin 133*), а также элементов везикулярного транспорта: белков SNARE (от англ. SNAP Receptor) и синаптоагминов (Catalano *et al.*, 2007; Gavrin *et al.*, 2017).

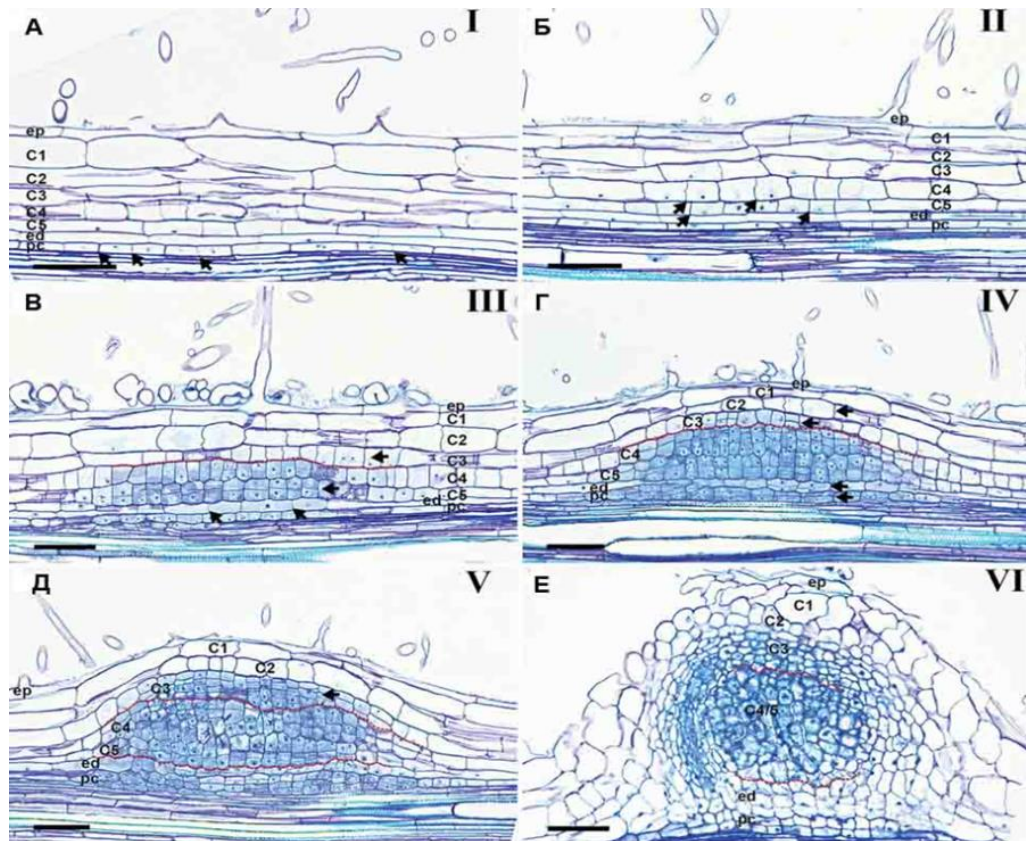


Рисунок 2. — Развитие клубенькового примордия у *M. truncatula*

(А, Б, В) стадии I, II, III. Антиклинальные деления обозначены стрелками. (Г) стадия IV. Периклинальные деления указаны стрелками. (Д) стадия V. Клетки, производные от С3 слоя формируют многоклеточные слои (указаны стрелкой), слои С4/С5 формируют 8 слоев клеток, перицикл и эндодерма участвуют в формировании примерно 6 слоев клеток в основании примордия, слои С2 и С1 несколько раз делятся антиклинально. (Д) стадия VI. На периферии клубенька формируются проводящие пучки, и начинает функционировать меристема. С этого момента примордий становится клубеньком. На В–Д красная линия обозначает границу между клетками, происходящими от слоев С3, С4/5 и эндодермы. ep – эпидерма, С1 – первый слой коры, С2 – второй слой коры, С3 – третий слой коры, С4 – четвертый слой коры, С5 – пятый слой коры, ed – эндодерма, pc – перицикл. Масштабная линейка = 75 мкм. Более подробное описание стадий дано в основном тексте (Xiao *et al.*, 2014).

Высвободившиеся из инфекционной капли в растительную клетку ризобии оказываются отделенными от цитоплазмы мембраной, называемой симбиосомной или перибактероидной, и дифференцируются в специализированную форму – бактериоды. Бактериод, окруженный симбиосомной мембраной, называется симбиосомой, которая и является

основной азотфиксирующей единицей (Tsyganova *et al.*, 2018). Таким образом, ризобии становятся эндосимбионтами. Симбиосомная мембрана претерпевает деления синхронно с бактериоидами, которые оказываются инкапсулированными по одному в недетерминированных клубеньках. У бобовых растений, таких как *L. japonicus*, бактериоиды сопоставимы по размеру со свободноживущими бактериями, сохраняют размер генома и способность к делению (Mergaert *et al.*, 2006). У *P. sativum*, *M. truncatula* и других бобовых растений из клады IRLC (от англ. Inverted Repeat-Lacking Clade), дифференцировка бактериоидов сопровождается морфологическими изменениями и амплификацией генома, что ведет к необратимой потере их способности к делениям. Тем не менее, этот процесс носит постепенный характер и зависит от степени развития симбиоза, как это было показано для *P. sativum* с использованием серии мутантов, заблокированных на различных стадиях развития симбиотических клубеньков (Tsyganov *et al.*, 2003).

Необратимая дифференцировка бактериоидов опосредуется действием специфичных для клубеньков богатых цистеином пептидов (NCR пептидов, от англ. Nodule-Specific Cysteine Rich) (Van de Velde *et al.*, 2010). NCR пептиды имеют сходство с антимикробными пептидами, эффекторами врожденного иммунитета как у растений, так и у животных (Mergaert *et al.*, 2003). Часть NCR пептидов проявляет строгую антимикробную активность, как например, NCR247, ингибирующий биосинтез белка и деление бактериоидов. Он также активирует экспрессию ассоциированного со стрессом сигма-фактора RPOH1 и взаимодействует с бактериальным шапероном GroEL. NCR247 взаимодействует с бактериальной АТФ-синтазой и ферментами цикла трикарбоновых кислот, а также с нитрогеназным комплексом (Farkas *et al.*, 2014; Penterman *et al.*, 2014). Другие NCR пептиды вовлечены не только в дифференцировку бактериоидов, но также необходимы для их выживания внутри растительных клеток (Kim *et al.*, 2015; Horváth *et al.*, 2015). В различных зонах клубенька *M. truncatula* в зависимости от стадии развития бактериоидов экспрессируется различный набор NCR пептидов (Montiel *et al.*,

2017). В выживании и нормальной дифференцировке бактериоидов под действием NCR пептидов участвуют компоненты клеточной стенки ризобий. Мутанты *S. meliloti*, дефектные по синтезу поверхностных полисахаридов (*exoA*, *exoB*, *lpsB*) характеризовались усиленным ответом на действие различных NCR пептидов – увеличением проницаемости мембран или формированием раздутых бактериоидов (Montiel *et al.*, 2017).

Кроме того, у *M. truncatula* доставка растительных полипептидов к симбиосомам влияет на процесс дифференцировки бактериоидов, что было продемонстрировано на мутанте *Mtdnf1* (*Defective in nitrogen fixation 1*), у которого формируется дефектный комплекс сигнальной пептидазы, ответственной за отрезание сигнального пептида в эндоплазматическом ретикулуме (Wang *et al.*, 2010). Бактериальный белок ВасА, являющийся консервативным для многих бактерий и необходимый для поддержания хронических инфекций, вероятно, принимает участие в изменениях симбиосомной мембраны за счет слияния секреторных везикул (содержащих NCR пептиды) с симбиосомами или модифицирует клеточную стенку, изменяя чувствительность бактерий к NCR пептидам (Kereszt *et al.*, 2011).

К генам, вовлеченным в контроль и поддержание симбиосом у *L. japonicus*, относятся *LjSST1* (*Symbiotic sulfate transporter 1*) (Krusell *et al.*, 2005), кодирующий расположенный на симбиосомной мембране специфичный для клубеньков транспортер сульфатов, и *LjSEN1*, кодирующий интегральный мембранный белок, вовлеченный в транспорт железа через симбиосомную мембрану (Накоуама *et al.*, 2012). Для *M. truncatula* это гены, кодирующие белок подобный фосфатидилинозитол фосфолипазе С (*MtDNF2*) (Bourcy *et al.*, 2013), C2H2 (от англ. Cysteine-2/Histidine-2) транскрипционный фактор (*Regulator of symbiosome differentiation (MtRSD)*) (Sinharoy *et al.*, 2013), рецептор-подобную киназу не содержащую аминокислотного остатка аргинина перед аспаратом в активном центре (nonRD киназа) (*Symbiotic cysteine rich receptor-like kinase (MtsymCRK)*) (Sinharoy *et al.*, 2016),

неохарактеризованный белок, локализующийся в эндоплазматическом ретикулуме (*Nodules with activated defense 1 (MtNAD1)*) (Wang *et al.*, 2016).

Бактероиды, окруженные симбиосомной мембраной, являются основными внутриклеточными единицами симбиоза. В зрелых бактериоидах активируется синтез нитрогеназы, катализирующей восстановление молекулярного азота в NH_4^+ , а также других ферментов, обслуживающих эту реакцию. Необходимое условие нормального функционирования бактериоидов – целостность симбиосомной мембраны, а ее деградация – одно из первых последствий дисфункции бактериоидов.

Формирование симбиосом сопровождается выраженной дифференцировкой и инфицированных растительных клеток. В них возрастает количество мембранных структур, участвующих в формировании симбиосомной мембраны и в биосинтезе клеточных белков, а также происходит полиплоидизация и деконденсация хроматина, связанная с усилением транскрипционной активности (Pawlowski, Bisseling, 1996). В результате происходит синтез *de novo* ряда белков, в первую очередь – леггемоглобина и специфичных для клубеньков изоформ ферментов азотного и углеродного обмена (поздних нодулинов). У *M. truncatula* за процесс эндоредупликации растительных клеток отвечает белок MtCCS52A, активатор комплекса, стимулирующего анафазу (Vinardell *et al.*, 2003).

В центральной части клубенька некоторые клетки остаются неинфицированными (Brewin, 2004). Неинфицированные клетки не увеличиваются в объеме и, возможно, играют роль в транспорте метаболитов (Godiard *et al.*, 2011).

1.1.4. Гистологическая организация недетерминированного клубенька и другие типы клубеньков

Описанные выше процессы завершаются формированием сложно устроенного недетерминированного клубенька. Его отличительные признаки – стабильность апикальной меристемы, обеспечивающей рост и постоянное

обновление азотфиксирующей ткани, а также связанная с этим тканевая дифференцировка центральной части (Pawlowski, Bisseling, 1996; Guinel, 2009). Клетки, покидающие меристему, инфицируются и дифференцируются, что приводит к увеличению их размеров. Такие клетки, наряду с оставшимися неинфицированными клетками, формируют зону инфекции (зона II) (Рисунок 3). Значительную часть клубенька занимает зона азотфиксации (зона III). Ее заполняют увеличившиеся в ходе дальнейшей дифференцировки инфицированные клетки с многочисленными азотфиксирующими симбиосомами, а также неинфицированные клетки, которые составляют примерно 20% от общего числа клеток (Velazquez *et al.*, 1995). По мере функционирования клубенька в его базальной части начинается процесс старения клеток, в результате чего формируется зона старения (Рисунок 3). Для клеток этой зоны характерна деградация цитоплазматических и затем симбиотических структур (Van de Velde *et al.*, 2006), что позволяет растениям полностью утилизировать продукты азотфиксации, накопленные в бактериоидах. Если процесс азотфиксации не происходит вследствие бактериальной или растительной мутации, или неблагоприятных физиологических условий, бактериоиды быстро стареют, после чего, содержащая их растительная клетка отмирает (Kneen *et al.*, 1990; Novák *et al.*, 1995). Процесс старения часто запускается в симбиотически неактивных клубеньках (Serova *et al.*, 2018). Для растения-хозяина распад симбиосом является выгодным: он обуславливает рециклизацию фиксированного азота в другие части растения и, кроме того, предотвращает системное распространение ризобий.

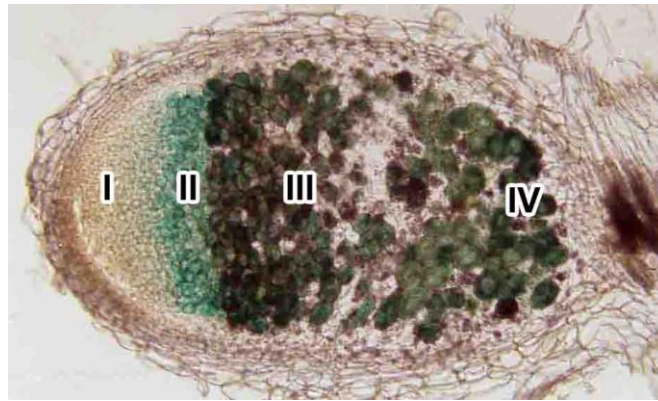


Рисунок 3. — Гистологическая организация клубенька *P. sativum*

I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации, IV — зона старения.

Центральная часть клубенька, состоящая из нескольких, описанных выше гистологических зон, окружена периферическими тканями. Наружная кора отделяется от внутренней коры слоем клубеньковой эндодермы (Guinel, 2009). Наружная кора представлена крупными клетками и выполняет защитную функцию, предохраняя, прежде всего, клетки меристемы. Внутренняя кора получила обозначение клубеньковой паренхимы (van de Wiel *et al.*, 1990). Она представлена более мелкими клетками, содержит проводящие пучки, которые окружены своей собственной эндодермой. Количество основных проводящих пучков, связывающих проводящую систему клубенька с проводящей системой корня, различается у разных видов (Guinel, 2009).

Развитие недетерминированных клубеньков характерно лишь для ограниченного числа эволюционно продвинутых бобовых растений из подсемейства Faboideae, таких родов как *Trifolium*, *Medicago*, *Pisum*, *Vicia* и др. В то же время, у таких родов как *Glycine*, *Phaseolus* и *Lotus*, образуются более простые детерминированные клубеньки (Maunoury *et al.*, 2008). В них апикальная меристема существует непродолжительное время, а затем рост клубенька и обновление азотфиксирующей ткани прекращаются. В центральной части не выявляется зональность, а инфицированные клетки чередуются с неинфицированными клетками. Инфекционные нити в

детерминированных клубеньках распространяются преимущественно по межклетникам, а не сквозь клетки. У некоторых Faboideae (*Arachis*, *Stylosanthes*, триба *Aeshynomeneae*) развитие клубеньков происходит не из клеток меристемы, а благодаря активному делению инфицированных клеток коры. Наиболее примитивная организация симбиоза характерна для эволюционно древних цезальпиниевых (подсемейство *Caesalpinioideae*). У этих растений азотфиксация осуществляется бактериями в инфекционных нитях, находящихся в межклетниках коры корня (Bryan *et al.*, 1997).

Таким образом, возникновение и усложнение экологических ниш, предоставляемых растением ризобиям, являлось процессом возрастающей интеграции симбионтов, обеспечивающим повышение эффективности симбиотической азотфиксации. На каждой стадии инфекции ризобиями происходят как адаптивные процессы, обеспечивающие симбиотическое взаимодействие, так и связанные с защитными реакциями растения и активируемые при контроле роста потенциальных патогенов.

Очевидно, что для формирования эффективного симбиотического клубенька, бактерии должны преодолеть различные защитные ответы растений. Недостаточно изученным остается вопрос относительно границы между мутуалистическими и антагонистическими отношениями при формировании бобово-ризобиального симбиоза. Эти отношения представляют собой систему мультифункциональных возможностей, и даже небольшие изменения баланса внутри этих процессов приводят ко взаимному переходу. Таким образом, представляет интерес сравнение процессов развития патогенных и мутуалистических взаимоотношений между растениями и бактериями.

1.2. Иммуитет растений

Для предотвращения развития патогена в растительных тканях функционирует неспецифический иммунитет или паттерн-активированный иммунитет РТІ (от англ. PAMP-triggered Immunity). Он индуцируется

медленно эволюционирующими молекулярными паттернами, ассоциированными с патогенами, PAMP (от англ. Pathogen-associated Molecular Patterns) или молекулярными паттернами, ассоциированными с микробами, MAMP (от англ. Microbe-associated Molecular Patterns), так как аналогичные консервативные структуры присутствуют и у непатогенных микроорганизмов. Такие структуры обобщенно называют элиситорами и их способны узнавать определенные мембранные рецепторы, имеющиеся у растений (Macho, Zipfel, 2014). К ним относят рецептор-подобные киназы и рецептор-подобные белки. Рецептор-подобные киназы состоят из внеклеточного N-терминального домена, богатого лейцином, трансмембранного домена и внутриклеточного киназного домена. Рецепторные nonRD киназы растений всегда участвуют в узнавании элиситоров. RD киназы выполняют более разнообразные функции, участвуя в процессах развития растений, и также являются партнерами nonRD киназ в передаче сигналов при иммунном ответе (Park *et al.*, 2012).

Рецептор-подобные белки содержат только внеклеточный и мембранный домены. Они образуют гетерорецепторный комплекс с рецептор-подобными киназами и с рецептор-подобными цитоплазматическими киназами для передачи сигнала к нижестоящим целевым белкам (Wu, Zhou, 2013; Macho, Zipfel, 2014). Рецептор-подобные белки напоминают по структуре Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors), которые участвуют в узнавании MAMP в клетках животных (Kopp, Medzhitov, 2003).

Хорошо известными примерами функционирования паттерн-распознающих рецепторов являются распознавание пептида flg22 из бактериального флагеллина рецептором Flagellin sensing 2 (FLS2) и EF-Tu-пептида elf18 рецептором Elongation factor thermal unstable receptor (EFR) у растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Zipfel *et al.*, 2006; Peyraud *et al.*, 2017).

Некоторые фитопатогены способны доставлять во внеклеточный матрикс или растительную цитоплазму эффекторы, продукты генов

авирулентности (*Avr*-гены), подавляющие РТІ (например, *AvrPtoB* у *Pseudomonas syringae*), что способствует колонизации тканей растения (Jones, Dangl, 2006). Растение, не способное распознать эти эффекторы, чувствительно к патогену. Такой феномен называется индуцированная эффекторами чувствительность. Однако, если у растения есть кодируемые *R*-генами (от англ. *Resistance*) белки внутриклеточной устойчивости (*R*-белки), распознающие эффекторы, индуцируется новый уровень растительного иммунитета – эффектор-активированный иммунитет ЕТІ (от англ. Effector-triggered Immunity). *R*-белки – нуклеотид-связывающие внутриклеточные белки, содержащие богатые лейцином повторы. Таким образом, при ЕТІ осуществляется принцип «ген-на-ген», то есть белковому эффектору соответствует продукт *R*-гена, комплементарный *R*-белок (Flor, 1971). Взаимодействие генов пары *Avr/R* обычно сопровождается быстрой реакцией гиперчувствительности, препятствующей распространению патогена (Jones, Dangl, 2006). Такие отношения считаются несовместимыми. ЕТІ иммунитет также называется специфическим, так как в отличие от РТІ, который придает растениям устойчивость к широкой группе микроорганизмов, ЕТІ специфичен для изолятов микроорганизмов, продуцирующих данный эффектор. При отсутствии или модификации любого из компонентов пары генов *Avr/R* отношения становятся совместимыми, и развивается заболевание (Robatzek, Saijo, 2008). Как РТІ, так и ЕТІ могут приводить к реакции гиперчувствительности, однако, необходимо отметить, что интенсивность аналогичных молекулярных событий при РТІ и ЕТІ значительно отличается. Для ЕТІ характерны количественно более интенсивные защитные реакции (Tsuda, Katagiri, 2010).

Стоит отметить, что такой элиситор, как хитин, узнается рецепторной киназой с лизиновым доменом. У *A. thaliana* такой рецептор, скорее всего, является гетеротетрамером, состоящим из Chitin elicitor receptor kinase 1 (*AtCERK1*) и Lysin motif receptor-like kinase 5 (*AtLYK5*) (Cao *et al.*, 2014) с тремя внеклеточными *LysM*-доменами (Miya *et al.*, 2007). Связанные с

клеточной стенкой рецепторные киназы WAK (от англ. Wall-associated Receptor Kinases) также могут активировать защитные ответы растений (Zuo *et al.*, 2015). Они узнают образующиеся при повреждении оболочки растительных клеток пектолитическими ферментами олигомеры с определенной константной структурой (Forrest, Lyon, 1990). Такие специфические продукты были названы молекулярными фрагментами, связанными с повреждением DAMP (от англ. Damage-associated Molecular Patterns) (Lotze *et al.*, 2007).

Распознавание элиситоров / эфффекторов растением инициирует выработку вторичных мессенджеров, таких как ионы кальция и активные формы кислорода (АФК), биосинтез растительных гормонов, таких как этилен, салициловая и жасмоновая кислоты, и активацию цитозольных митоген-активируемых протеинкиназ. Сигнал передается через MAPKKK-каскад (от англ. MAP Kinase Kinase Kinase) для активации целого ряда факторов транскрипции растений (WRKY, MYB, NAC и ERF), которые регулируют несколько R-генов, контролирующих синтез связанных с устойчивостью белков и метаболитов. Эти соединения ограничивают распространение патогена за счет своих антимикробных свойств или способности к утолщению клеточной стенки (Рисунок 4). Таким образом, развивающиеся в растении защитные реакции приводят либо к реакции гиперчувствительности, либо к пониженной восприимчивости к патогену (Рисунок 4) (Kushalappa *et al.*, 2016).

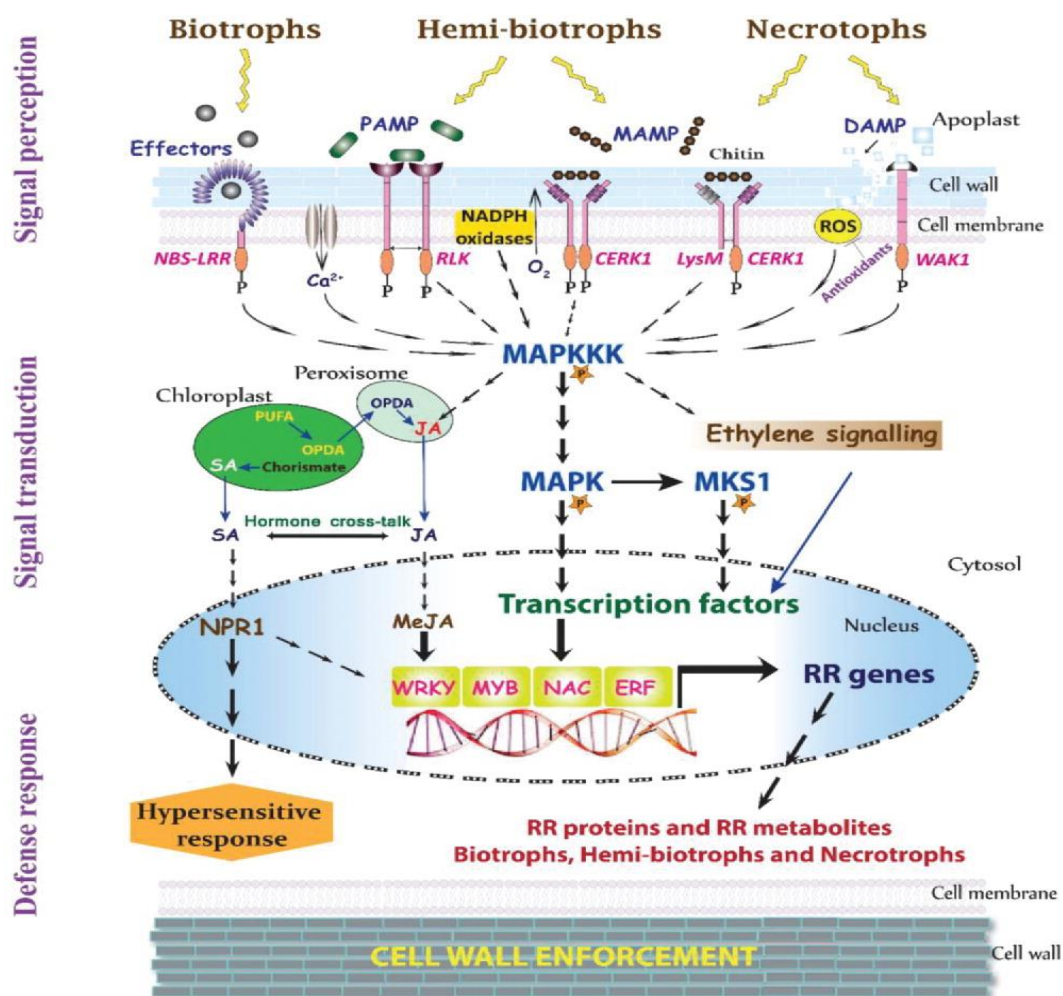


Рисунок 4. — Основные молекулярные участники, вовлеченные во взаимодействие растения с патогеном

Патогены производят элиситоры (PAMP/MAMP/DAMP, хитин) и эффекторы (effectors). Растения распознают эти элиситоры/эффекторы и выстраивают иммунный ответ, опосредованный иерархической системой *R*-генов: рецепторы, распознающие элиситоры (рецептор подобная киназа, RLK; хитин-элиситор рецепторная киназа с LysM доменом, CERK1; киназа, ассоциированная с клеточной стенкой, WAK), рецепторы, распознающие эффекторы (нуклеотид-связывающий внутриклеточный белок, содержащий богатые лейцином повторы, NBS-LRR), фитогормоны (этилен, Ethylene; салициловая кислота, SA; и жасмоновая кислота, JA), митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) и MAPK-киназа киназы (MAPKKK), транскрипционные факторы WRKY, MYB, NAC и ERF (transcription factors), выработка связанных с устойчивостью белков (RR proteins) и метаболитов (RR metabolites), которые непосредственно подавляют развитие патогенов. Продуцируемые биотрофами эффекторы, часто распознаются белками NBS-LRR, что приводит к гиперчувствительному ответу через путь MAPK / SA / белок NPR1 (Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1). Более подробное описание сигнальных путей и их компонентов дано в основном тексте (Kushalappa *et al.*, 2016).

Белки, связанные с устойчивостью, подавляют патогены, детоксифицируют токсины или факторы вирулентности, продуцируемые патогенами, укрепляют клеточные стенки. К PR-белкам относятся β -1-3-эндоглюканазы (PR-2), эндохитиназы (PR-3, 4, 8 и 11), эндопротеиназы (PR-7), специфические ингибиторы протеиназ (PR-6), дефензины (PR-12), пероксидазы (PR-9), оксалат оксидазы (PR-15), тионины (PR-13), белки-переносчики липидов с широкой антибактериальной и противогрибковой активностью (PR-14), рибонуклеаза-подобные белки, участвующие в инактивации рибосом (PR-10). Представители семейства PR-1 и тауматин-подобные белки из семейства PR-5 обеспечивают устойчивость растений к мицелиальным микроорганизмам группы Oomycetes (Kushalappa *et al.*, 2016).

1.3. Роль иммунитета растений в бобово-ризобиальном симбиозе

В случае бобово-ризобиального симбиоза иммунитет растения контролирует установление и развитие совместимого взаимодействия на протяжении всего процесса инфекции, запущенного самим растением. В клубеньках, после выхода в растительную цитоплазму, дифференцированные бактерии могут фиксировать азот и транспортировать образующийся в результате аммоний в растение в случае формирования мутуалистического взаимодействия (Poole *et al.*, 2018). Однако образование клубеньков не всегда идет на пользу растению. Некоторые ризобии не обеспечивают хозяина азотом, находясь в клубеньках, демонстрируя тем самым паразитический образ жизни (Schumpp, Deakin, 2010; Crook *et al.*, 2012; Price *et al.*, 2015). Контроль бобовыми растениями собственного иммунитета при взаимодействии как с мутуалистическими, так и паразитическими популяциями ризобий до сих пор остается малоизученным.

1.3.1. Двойственная роль Nod-факторов

Некоторые аналогии между развитием симбиоза и патогенеза прослеживаются уже на самых ранних стадиях, когда растения активируют

nod гены ризобий сигналами, сходными с флавоноидными фитоалексинами (например, глицеолин у *Glycine max* (L.) Merr., пизатин у *P. sativum*). Выделяющиеся при этом Nod-факторы, имеют структурное сходство с элиситорами – хитиновыми олигосахаридами (ХО), являющимися PAMP (Boller, Felix, 2009; Hamel, Beaudoin, 2010) (Рисунок 5). Тем не менее, в то время как Nod-факторы, как правило, включают четыре или пять остатков N-ацетилглюкозамина, наиболее активные элиситоры хитина имеют бóльшую степень полимеризации. Так, например, исследования на *Oryza sativa* L. и *A. thaliana* показали, что шесть-восемь остатков ХО более активно влияют на экспрессию генов и другие защитные ответы, чем те, что имеют от трех до пяти остатков N-ацетилглюкозамина (Shibuya, Minami, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Кроме того, существуют значительные различия в активных концентрациях этих молекул. Nod-факторы могут быть активны при концентрации до 10^{-13} М, тогда как ХО активны при концентрациях от 10^{-9} до 10^{-6} М (Gough, Cullimore, 2011).

Помимо структурного сходства этих гликанов в их восприятие растением вовлечены рецептор-подобные киназы с LysM во внеклеточных доменах. В обоих типах взаимодействия один белок (CERK1 или NFR1) имеет активный внутриклеточный киназный домен, тогда как второй белок (LYK5 или NFR5) имеет неактивный внутриклеточный киназный домен. Домены LysM, как полагают, являются участками для связывания веществ, содержащих N-ацетилглюкозамин. В ходе эволюции растений ХО, очевидно, служили иммуногенными паттернами, активирующими белковый LysM рецептор, вызывая тем самым у растения иммунный ответ и остановку инфекции. Биохимический потенциал растительного белка LysM с тех пор, вероятно, благоприятствовал эволюции рецептора, воспринимающего уже не ХО, а Nod-факторы и содействующего микробной инфекции и симбиозу (Gust *et al.*, 2012).

Хитин

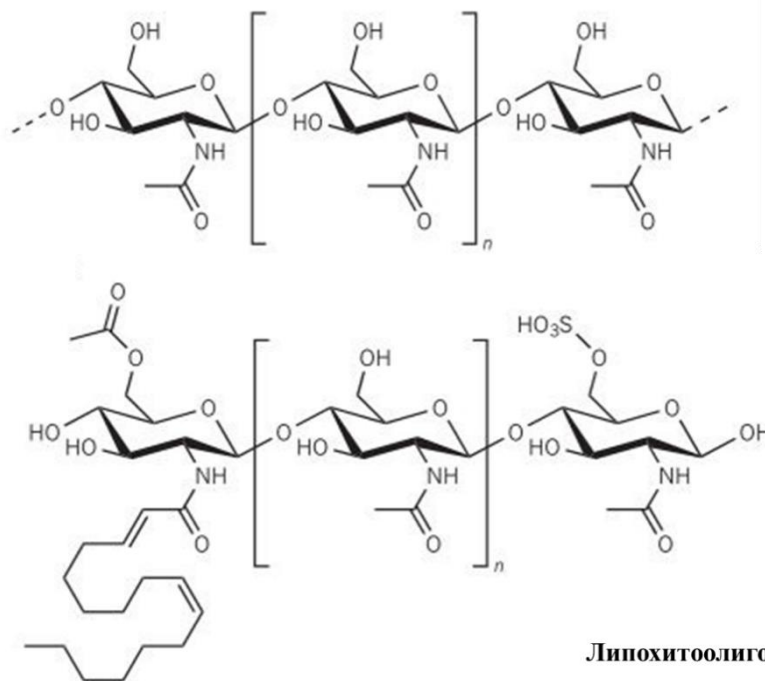


Рисунок 5. — Структурное сходство между хитиновыми олигосахаридами и Nod-факторами

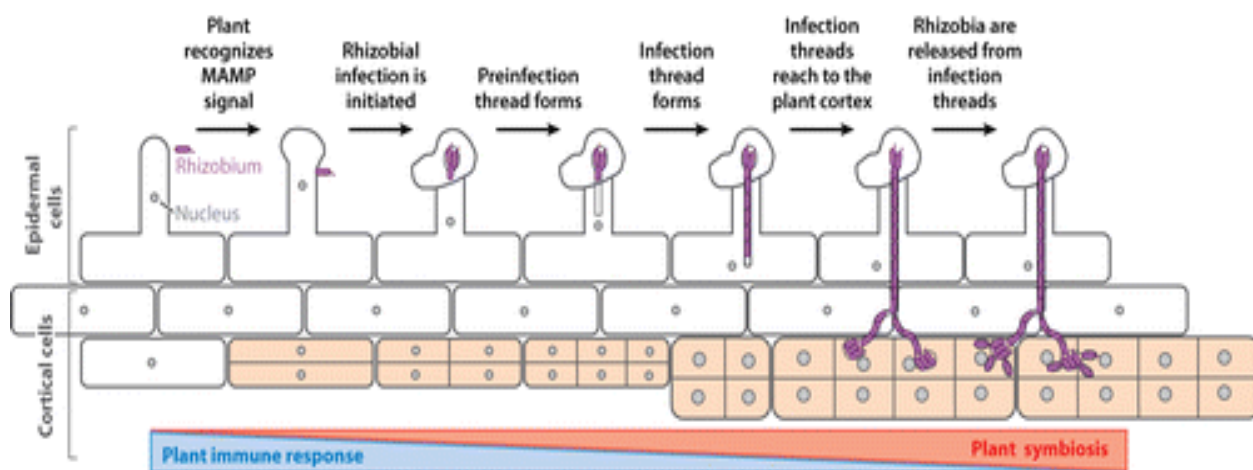
Хитин представляет собой простую молекулу, состоящую из повторяющихся единиц *N*-ацетил-*D*-ацетилглюкозамина. Nod-факторы представляют собой липохитоолигосахариды, состоящие из 3–6 остатков *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, которые несут на невозстанавливаемом конце жирную кислоту, а также различные заместители (ацетил, карбамонил, фукозил, сульфат) в разных позициях углеродного скелета в зависимости от штамма ризобий.

Эта идея подтверждается данными о том, что белки CERK1 и NFR могут выполнять двойную функцию в симбиозе и в ответе на атаку патогена (Miyata *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Например, исследование на микрочипах показало, что обработка длинноцепочечными ХО вызывает экспрессию симбиотических генов у *L. japonicus*. С использованием химерных генов *AtCERK1* и было показано, что несколько аминокислотных замен в киназном домене рецептора хитина *AtCERK1* запускают сигнальный каскад, приводящий к формированию симбиотических клубеньков у мутанта *nfr1*, несущего мутацию в одном из компонентов рецептора к Nod-фактору (Nakagawa *et al.*, 2011).

В тоже время, Nod-факторы сами могут активировать защитные сигнальные пути, такие как *LjNFR1*-зависимая экспрессия некоторых защитных генов у *L. japonicus* (Nakagawa *et al.*, 2011) и гибель клеток в листьях *Nicotiana benthamiana* Domin в ответ на сверхэкспрессию пары рецепторов к Nod-факторам (Madsen *et al.*, 2011). Nod-факторы противоположным образом влияют на экспрессию некоторых генов защитного ответа в эпидерме *M. truncatula*. Так, ген, кодирующий PR2-подобный белок снижал свою экспрессию, а гены, кодирующие PR1-, PR3-, PR10-белки, WRKY и другие, показывали повышение экспрессии (Jardinaud *et al.*, 2016).

Тем не менее, индукция Nod-факторами большинства генов, связанных с активацией защитных реакций, во время симбиоза является временной или совсем отсутствует (El Yahyaoui *et al.*, 2004; Lohar *et al.*, 2006; Høglund *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2011). Кроме того, было показано, что Nod-факторы подавляют РТИ в листьях различных видов растений, включая небобовые, независимо от наличия рецепторов к Nod-факторам (Liang *et al.*, 2013). Добавление Nod-факторов, либо короткоцепочечных ХО к проросткам *A. thaliana* приводило к подавлению иммунного ответа растения на РАМР (Liang *et al.*, 2013). Однако, концентрация ХО с короткой цепью, необходимая для этого эффекта, была в десять раз выше, чем у Nod-факторов, что указывает на некоторую специфичность. Nod-факторы снижали ассоциированное с РАМР накопление АФК также, как и индукцию генов защитного ответа. Обработка Nod-факторами также изменяла другие типичные РТИ-ответы, включая устойчивость к *P. syringae* DC3000 (Liang *et al.*, 2013). Уровни салициловой кислоты были значительно повышены в корнях бобовых, инокулированных ризобиями, неспособными продуцировать Nod-факторы, в отличие от корней, инокулированных штаммом дикого типа (Martínez-Abarca *et al.*, 1998). Салициловая кислота является фитогормоном, участвующим в устойчивости растений к болезням и ингибирующим клубенькообразование (Stacey *et al.*, 2006).

В целом, Nod-факторы, вероятно, активируют набор генов, включая рецепторы, связанные с узнаванием МАР, которые нужны для предотвращения проникновения несимбиотических бактерий в ткани корня при ризобийной инфекции. Это может быть важным в естественных условиях, где ризобии конкурируют с многочисленными микроорганизмами (Рисунок 6). Было также показано, что два гена *MtDNF2* и *MtSYMRK*, снижающие иммунный ответ растений в функционирующих клубеньках (Bourcy *et al.*, 2013; Berrabah *et al.*, 2014), индуцируются Nod-факторами через 4 и 24 часа после инфекции. Это подразумевает, что *MtDNF2* и *MtSYMRK* играют роль также и на ранних стадиях симбиотических взаимодействий.



 Cao Y, et al. 2017.
Annu. Rev. Plant Biol. 68:535–61

Рисунок 6. — Баланс симбиотического и иммунного ответа в процессе клубенькообразования

Ризобийные МАР активируют временный иммунный ответ (обозначен голубым цветом) у растений. Ризобии избегают РТИ, производя Nod-факторы. Чтобы успешно проникнуть в корни бобовых, ризобии также выделяют эффекторы для модуляции иммунитета хозяина, что позволяет установить симбиоз (обозначен красным цветом) (Cao *et al.*, 2017).

1.3.2. Поверхностные компоненты ризобий

Повышенный уровень защитных реакций препятствует установлению бобово-ризобиального симбиоза (Stacey *et al.*, 2006; Lopez-Gomez *et al.*, 2011; Gourion *et al.*, 2015). Так, присутствие на корневой системе *M. truncatula* фитопатогена *P. syringae* штамм DC3000 индуцирует защитный ответ, который препятствует развитию клубеньков (Chen *et al.*, 2017). Для формирования полноценного клубенька необходимо продвижение ризобий вглубь корня посредством инфекционной нити, а затем их высвобождение в цитоплазму растительных клеток с последующей дифференцировкой в бактериоиды и формированием симбиосом. Очевидно, что на всех описанных выше этапах ризобии подвергаются угрозе быть воспринятыми растением в качестве патогенов, поэтому неудивительно, что в ходе эволюции бактерии создали эффективные системы, позволяющие им избегать защитных реакций растения. К таким системам можно отнести синтез разнообразных поверхностных полисахаридов и системы секреции.

Ризобиальные МАР, такие как флагеллин, липополисахариды, экзополисахариды, β -глюканы и полисахариды К-антигенного типа показывают нехарактерную активность и, по-видимому, не обладают способностью активировать РТІ у бобовых растений (Tellström *et al.*, 2007). Было показано, что ризобиальный флагеллин лишен эпитопа flg22, необходимого для активации FLS2, что помогает ризобиям избегать восприятия растением в качестве патогенов (Lopez-Gomez *et al.*, 2011). Более того, поверхностные компоненты ризобий принимают активное участие в супрессии защитных реакций бобовых растений. Из поверхностных компонентов ризобий наиболее изучен кислый экзополисахарид, или сукциноглюкан (Рисунок 7).

Рецептор EPR3 *L. japonicus*, опосредующий распознавание экзополисахаридов в процессе ризобийной инфекции, является наиболее близким гомологом LYK3 *A. thaliana*, связанным со способностью Nod-факторов подавлять защитные реакции (Liang *et al.*, 2013). Поэтому возможно, что EPR3 также способствует супрессии экзополисахаридами иммунного ответа растения.

Липополисахариды ризобий также могут подавлять защитные реакции, например, синтез АФК в растениях (Albus *et al.*, 2001; Fraysse *et al.*, 2003; Scheidle *et al.*, 2005) и индукцию экспрессии генов защитного ответа (Tellström *et al.*, 2007), а липополисахаридные мутанты часто не способны вступать в симбиоз (Campbell *et al.*, 2003; D'Haese, Holsters, 2004). Нормально сформированный слой пептидогликана необходим для предотвращения индукции растительных иммунных ответов бактериями (Gully *et al.*, 2016). Компонентами поверхности ризобий, вовлеченными в диалог с защитными системами растений, оказались также циклические β -глюканы, играющие важную роль в адаптации бактериоидов к новым физиологическим условиям за счет повышения осмотической стабильности клеток. Нарушение синтеза этих глюканов, приводит к формированию псевдоклубеньков (Chen *et al.*, 2002; D'Antuono *et al.*, 2005).

1.3.3. Эффекторы ризобий и системы секреции третьего и четвертого типов

У *G. max* контроль специфичности и формирование инфекционных нитей осуществляется не только через узнавание Nod-факторов, но и с помощью R-белков. *GmRj4* аллель, присутствующая в некоторых экотипах *G. max*, ограничивает формирование клубеньков с определенными ризобиями, включая штамм *Bradyrhizobium elkanii* USDA 61. При таком взаимодействии не развиваются инфекционные нити (Yasuda *et al.*, 2016). Такая же картина наблюдается для гена *GmRj2* (Yang *et al.*, 2010). Его продукт представляет собой типичный растительный белок внутриклеточной резистентности с

нуклеотид-связывающим доменом и повторами, обогащенными лейцином. Прямое или не прямое узнавание микробных молекул-эффекторов этими рецепторами запускает активацию сигнального каскада ETI (Tang *et al.*, 2016), что блокирует взаимодействие на самых ранних этапах (Yasuda *et al.*, 2016). Так, взаимодействия растений, несущих аллели *GmRj2* и *GmRj4*, со штаммами ризобий, у которых присутствуют аллели *NopP* и *MA20_12780*, являются несовместимыми. Цитоплазматические эффекторы доставляются этими ризобиями через функционирующую систему секреции третьего типа (ТЗСС) (Tsukui *et al.*, 2013; Tsurumaru *et al.*, 2015; Sugawara *et al.*, 2018). Стоит отметить, что сигнальный путь, запускаемый Nod-факторами, не ослабляется в данных взаимодействиях (Sugawara *et al.*, 2018). Тем не менее, растительный иммунитет способен приводить к несовместимому взаимодействию, даже с ризобиями, чьи Nod-факторы проходят контроль специфичности.

Оказалось, что потеря ТЗСС может быть ключевым шагом, позволяющим переключить симбиотическое взаимодействие с несовместимого на совместимое (Sugawara *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018). Многие бактериальные патогены животных и растений используют ТЗСС, образовавшуюся в ходе эволюции из жгутиковой системы бактерий, для доставки различных эффекторов в своих хозяев (Huesck, 1998). Такие системы секреции, очевидно, могут играть важную роль и в становлении симбиоза у определенных видов ризобий. ТЗСС была детально охарактеризована у нескольких штаммов ризобий (Deakin, Broughton, 2009). Синтез ТЗСС и эффекторов, которые она выделяет, регулируется флавоноидами и транскрипционным активатором NodD. При исследовании штамма *Rhizobium* sp. NGR234, характеризующегося широким кругом растений-хозяев, было показано, что некоторые из этих эффекторов стимулируют образование симбиоза у определенных бобовых растений, в то время как у других либо не влияют совсем, либо значительно снижают способность к симбиозу (Deakin, Broughton, 2009). Штаммы MAFF303099 *Mesorhizobium loti* и USDA61 *B. elkanii* также через ТЗСС выделяют несколько индуцируемых флавоноидами

эффекторных белков, некоторые из которых аналогичны эффекторам патогенов, и, вероятно, влияют на метаболизм растений (Okazaki *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2009). Было показано (Okazaki *et al.*, 2013), что штамм дикого типа *B. elkanii* USDA61, способен формировать клубеньки не только на *G. max* дикого типа, но и на мутанте *En1282*, который несет мутацию по гену *Gmnfr1*, кодирующему один из компонентов рецептора к Nod-фактору. В то же время мутант с дефектом по генам, кодирующим компоненты ТЗСС, не был способен формировать клубеньки на мутантных растениях. Мутантный штамм *BEnodC*, неспособный продуцировать Nod-факторы, также формировал клубеньки на мутантных растениях. Было показано, что в отсутствие запуска пути сигнальной трансдукции, ведущего к формированию симбиотического клубенька Nod-фактором, этот путь активируется на этапе функционирования генов растений *GmENOD40* и *GmNIN*. Это свидетельствует о том, что ТЗСС способна к независимой от Nod-фактора активации пути сигнальной трансдукции, приводящем к развитию клубенька, хотя точный механизм пока остается неизвестным (Okazaki *et al.*, 2013).

Другой системой секреции, играющей определенную роль в развитии симбиотических клубеньков, является система секреции четвертого типа (Т4СС), которая эволюционировала на основе системы конъюгации (Deakin, Broughton, 2009). В симбиотической системе *Medicago-Sinorhizobium* Т4СС способствует увеличению количества клубеньков, хотя это не создает особых преимуществ для растения (Nelson *et al.*, 2017). Эта система секреции, хотя и является факультативной для клубенькообразования в симбиозе с *Medicago*, широко распространена среди штаммов *S. meliloti* (Cao *et al.*, 2018). Т4СС также может иметь негативное влияние на бобово-ризобиальный симбиоз. Например, Т4СС *M. loti* ухудшает эффективное образование клубеньков на *Leuceana leucoccephala* (Lam.) de Wit (Hubber *et al.*, 2004).

Таким образом, в ходе эволюции некоторые ризобии научились использовать системы секреции, используемые патогенными бактериями, для доставки факторов вирулентности в клетки хозяев, для доставки эффекторов,

способствующих развитию симбиотических отношений. Интересно, что у ризобий гены, кодирующие ТЗСС и Т4СС, часто кластеризованы в локусах с теми, что вовлечены в важные для симбиотического процесса функции, на так называемых симбиотических островках, где плотность инсерционных последовательностей очень высока. Эти функции можно разделить на две группы – относящиеся к клубенькообразованию и к фиксации азота. Было показано, что нарушение в последовательности *NopP*, связанное с инсерционной последовательностью, или спонтанной точковой мутацией в *ТЗСС*, приводит к муталистическому взаимодействию с *GmRj2* (Sugawara *et al.*, 2018). Кроме того, Сугавара с соавторами обнаружили, что спонтанная рекомбинация между инсерционными последовательностями симбиотического локуса, приводящая к потере генов, необходимых для фиксации азота и кодирующих ТЗСС, приводила к образованию паразитического штамма, способного образовать клубеньки на *GmRj2*, но не фиксирующего азот (Sugawara *et al.*, 2018). Частота таких превращений из несовместимых микроорганизмов в мутуалистов или паразитов в естественной среде должна быть довольно высокой, так как объединение генов клубенькообразования, фиксации азота и систем секреции в локусах ризобиального генома, богатых инсерционными последовательностями – нередкое явление (Benezech *et al.*, 2020).

1.3.4. Контроль иммунного ответа со стороны растения

Хотя ризобии хорошо адаптированы к действию защитных систем хозяина, те все же частично индуцируются даже в случае образования нормальных азотфиксирующих клубеньков. Так, только небольшая доля бактерий способна вызвать образование мест инфекции, из которых развиваются клубеньки, большинство инфекционных нитей абортируется в эпидерме или коре (Vasse *et al.*, 1993). В случае симбиоза *R. meliloti* – *M. sativa*, было выявлено наличие мест инфекции, в которых наблюдают полный некроз бактериальных и растительных клеток (Vasse *et al.*, 1993). В таких

некротических сайтах была выявлена активная кислая растительная хитиназа, которая связана с развитием защитных реакций. Напротив, фенилаланинаммиак лиаза и халкон синтаза – ферменты, которые играют важную роль в биосинтезе флавоноидов – обнаруживались как в некротических, так и в живых клетках. Таким образом, растение-хозяин ограничивает развитие значительной части инфекционных нитей за счет ответов, сходных с реакцией гиперчувствительности. Следует отметить, что такие ответы индуцируются только теми ризобиями, которые производят Nod-факторы. Очевидно, что они играют двоякую роль: с одной стороны, запускают симбиотический сигнальный каскад, а с другой – могут быть элиситорами реакции гиперчувствительности, что позволяет растению контролировать количество сайтов инфекции. Весьма существенным является вопрос о том, почему реакция гиперчувствительности запускается только в некоторых сайтах инфекции. Кроме того, как было указано выше, Nod-факторы могут быть функционально заменены ТЗСС, вирулентным фактором патогенов, что еще раз подчеркивает двойственный характер влияния Nod-факторов на растительный иммунитет.

Даже при совместимых взаимодействиях сама инфекционная нить является агрессивной средой для ризобий, вызывая активацию ответа на общий стресс у бактерий. Так, для мутантного штамма *V. japonicum* без сигма-фактора экстрацитоплазматического стресса EcfG, было показано, что при взаимодействии с растениями *G. max*, образующиеся немногочисленные клубеньковые примордии не развивались в клубеньки, содержали всего несколько инфекционных нитей и не содержали инфицированных клеток, либо были слабо колонизированы. Эти факты свидетельствуют о том, что процессы, контролируемые сигма-фактором EcfG имеют решающее значение для процесса инфекции. Активность данного сигма-фактора наблюдалась в клетках микроколонии в скрученном корневом волоске, а также внутри инфекционных нитей, но не в азотфиксирующих бактериоидах. Примечательно, что подобный паттерн экспрессии был также описан для

РроЕ2 *S. meliloti*, однако, этот ортолог сигма-фактора EcfG *B. japonicum* был необязателен для формирования симбиоза (Jamet *et al.*, 2003; Capela *et al.*, 2006; Sauviac *et al.*, 2007).

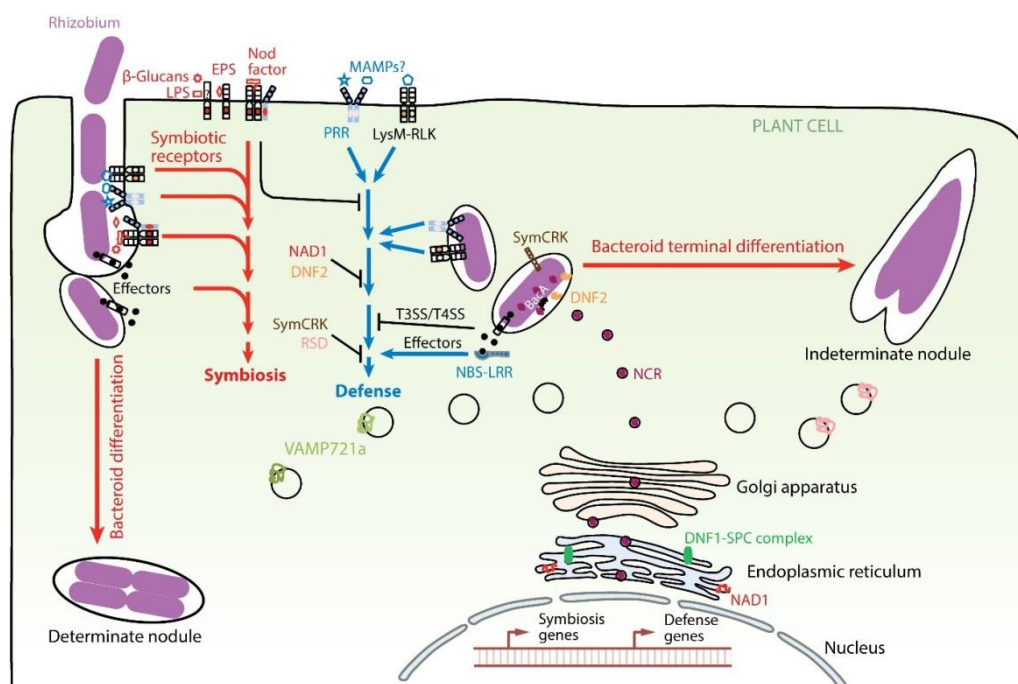
Отсутствие сигнала в бактериоидах указывает на то, что ответ на общий стресс не активируется на этом этапе (Ledermann *et al.*, 2018). Это свидетельствует о том, что бобовые растения имеют различные механизмы для подавления своих иммунных ответов и обеспечения устойчивости бактериоидов. В последнее время идентифицировано много новых генов-участников этого процесса. Так, после выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки такие гены как *MtDNF2*, *MtRSD1*, *MtSymCRK*, и *MtNad1* подавляют растительные защитные реакции (Рисунок 8).

У *M. truncatula* *MtDNF2* кодирует белок, подобный фосфатидилинозитол-фосфолипазе C (Bourcy *et al.*, 2013) Интересно, что условия выращивания растений могут влиять на результат работы *MtDNF2*, который при выращивании в особо чистых условиях на агарозе или фитогеле оказывается необязательным для формирования эффективного симбиоза (Berrabah *et al.*, 2014).

Ген *M. truncatula* *MtRSD1* кодирует C2H2 транскрипционный фактор. *MtRSD1* действует как транскрипционный репрессор гена *MtVAMP721a*, который кодирует ассоциированный с везикулами мембранный белок 721a. Эта репрессия, вероятно, блокирует альтернативный секреторный путь, который может конкурировать с тем, что вовлечен в биогенез симбиосом, или может влиять на защитные реакции. Мутант *Mtrsd1* формирует неэффективные клубеньки с недифференцированными симбиосомами (Sinharoy *et al.*, 2013).

MtSymCRK кодирует рецептор-подобную киназу не содержащую аминокислотного остатка аргинина перед аспаратом в активном центре (Berrabah *et al.*, 2014). Мутант по этому гену формирует неэффективные и некротичные клубеньки, в которых бактериоиды мельче, чем в диком типе. Экспрессия генов, кодирующих некоторые из NCR-пептидов, сильно снижена

в этих клубеньках. В то же самое время, экспрессия генов, связанных с защитным ответом, значительно увеличена. В клубеньках обнаруживалась смесь мертвых и живых бактериоидов (Sinharoy *et al.*, 2016).



AR Cao Y, et al. 2017. Annu. Rev. Plant Biol. 68:535–61

Рисунок 8. — Защитные реакции в бобово-ризобииальном симбиозе

Рецептор распознавания паттернов хозяина распознает ризобииальные MAMP, вызывая временную индукцию защитных ответов у растений. Рецепторы NFR1 и NFR5 связываются с Nod-факторами и запускают симбиотический сигнальный каскад. Во время колонизации ризобии секретируют эффекторный белки через T3SS и T4SS для снижения или блокировки иммунных ответов хозяина, что позволяет установить симбиотические отношения. Растительные белки DNF2, NAD1, RSD и SymCRK участвуют в подавлении иммунитета хозяина, который, по-видимому, специфически ингибирует терминальную дифференцировку бактериоидов. Сокращения: EPS, экзополисахариды; LPS, липополисахариды; LRR, богатый лейцином повтор; LysM, лизиновый мотив; MAMP, микроб-ассоциированные молекулярные структуры; NBS, сайт связывания нуклеотидов; NFR, рецептор к Nod-фактору; PRR, рецептор распознавания паттернов; RLK, рецептор-подобная киназа; T3SS, система секреции типа III; T4SS, система секреции IV типа (Cao *et al.*, 2017).

MtNAD1 кодирует небольшой неохарактеризованный белок, локализующийся в эндоплазматическом ретикулуме. Клубеньки мутанта *Mtnad1-1* характеризуются увеличенными перибактероидными пространствами в симбиосомах и некоторые симбиосомы содержат по два

бактероида. Инфицированные клетки и симбиосомы подвергаются некрозу сразу после выхода бактерий из инфекционных капель (Wang *et al.*, 2016).

Однако, гены *MtDNF2*, *MtSymCRK*, *MtRSD1* и *MtNAD1* не работают вместе в одном сигнальном пути. На основании экспрессионного паттерна и генетического анализа было предположено, что *MtDNF2* работает до *MtSymCRK* и *MtRSD1* (Berrabah *et al.*, 2015). Необходимо отметить, что механизмы, опосредованные *MtSymCRK*, *MtDNF2*, *MtNAD1* и *MtRSD1*, являются специфичными для растений с необратимой дифференцировкой бактериоидов в клубеньках (Yu *et al.*, 2019). Мутанты по генам *MtNAD1* и *MtSymCRK* у *L. japonicus* не демонстрируют фенотипы с усилением защитных реакций, запрограммированной клеточной гибелью и ранним старением в клубеньках (Yu *et al.*, 2019). Таким образом, существуют различия в роли врожденного иммунитета растений в клубеньках с обратимой и необратимой дифференцировкой ризобий в бактериоиды и механизмах подавления РТИ и обеспечения устойчивости бактериоидов.

Участие упомянутых выше NCR пептидов и белка ВасА в дифференцировке бактерий в растениях, принадлежащих к кладе IRLC, является поразительным примером, как элементы инфекции бактерий и системы защиты растения были использованы в ходе эволюции для развития симбиотических отношений, в результате чего появилась необратимая дифференцировка бактериоидов, имеющая, вероятно, эволюционное преимущество, поскольку было показано, что она возникала в эволюции неоднократно (Oono *et al.*, 2011).

1.4. Роль активных форм кислорода в формировании симбиотического клубенька

Сантос с соавторами (Santos *et al.*, 2001) показали, что *M. sativa* отвечает на инокуляцию диким штаммом *S. meliloti* временной выработкой АФК. Добавление Nod-факторов приводит к кратковременному увеличению уровня пероксида водорода в кончике активно растущего корневого волоска у

Phaseolus vulgaris L. (Cárdenas, Quinto, 2008). Однако, уже через несколько минут сами Nod-факторы ингибируют продукцию пероксида водорода (Shaw, Long, 2003; Lohar *et al.*, 2007), так как это является необходимым для деформаций корневых волосков при установлении симбиоза (Lohar *et al.*, 2007). Обработка специфическим ингибитором НАДФН-оксидазы RВОН, ключевого фермента, участвующего в производстве АФК, предотвращает скручивание корневых волосков и ризобиальную инфекцию (D'Haese *et al.*, 2003; Peleg-Grossman *et al.*, 2012). Супероксид-анион и пероксид водорода также выявляются в инфекционных нитях и в инфицированных клетках растения (Santos *et al.*, 2001; Ramu *et al.*, 2002; D'Haese *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2004). Пероксид водорода, вероятно, положительно влияет на рост инфекционной нити (Rathbun *et al.*, 2002). Кроме того, специфическая посттрансляционная модификация белков пероксидом водорода может происходить в матриксе инфекционной нити (Oger *et al.*, 2012). Роль пероксида водорода подтверждается формированием aberrantных инфекционных нитей и задержкой клубенькообразования при инокуляции растений штаммом *S. meliloti* со сверхэкспрессией гена, кодирующего каталазу (Jamet *et al.*, 2007).

Пероксид водорода, по-видимому, также контролирует дифференцировку бактерий в симбиотическую форму, т.к. мутант *S. meliloti* по каталазе (*katB/katC*) формировал клубеньки с недифференцированными бактериоидами (Jamet *et al.*, 2003). Недавно было показано, что тиоредоксин TrxS1 контролирует дифференцировку бактериоидов через окислительно-восстановительное состояние цистеин-богатого пептида NCR335 (Ribeiro *et al.*, 2015). Кроме того, перексид водорода накапливался вокруг симбиосомной и бактериоидной мембран стареющих симбиосом, что указывает на его роль в процессе старения (Alesandrini *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2004).

Следует также отметить, что в азотфиксирующих клубеньках многочисленные процессы способствуют образованию АФК. Так, синтез супероксид-аниона и пероксида водорода ассоциирован с высокой дыхательной активностью, необходимой для поддержания эффективной

азотфиксации, автоокислением кислородсодержащих форм леггемоглобина и окислением некоторых белков с сильным восстановительным потенциалом (нитрогеназы, ферредоксина, гидрогеназы) (Chang *et al.*, 2009). Однако, эти процессы не приводят к развитию окислительного взрыва, как, например, при взаимодействии с патогенными микроорганизмами (del Río, 2015; Sewelam *et al.*, 2016).

Таким образом, бобовое растение должно иметь механизмы для гомеостатического контроля уровней АФК, регулируя их участие в сигнальных каскадах и в метаболизме, как для формирования устойчивости к болезням при патогенных взаимодействиях, так и для клубенькообразования при симбиотических (Vecana *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2015; Damiani *et al.*, 2016). Одним из таких механизмов является антиоксидантная система защиты растения, в том числе, тиоловый трипептид GSH. GSH не только взаимодействует с АФК, изменяя окислительно-восстановительное состояние клетки и ее компартментов, но также может по-разному взаимодействовать с белками посредством тиол-дисульфидного обмена и связанных с ним процессов (Matamoros, Vecana, 2020). Это стратегическое положение между клеточными окислителями и восстановителями, делает систему GSH идеальной для выполнения также и сигнальных функций. GSH участвует в физиологических процессах, связанных с развитием растений, взаимодействием с симбиотическими микроорганизмами и защитными ответами (Noctor *et al.*, 2012).

1.5. Тиоловые трипептиды глутатион и гомоглутатион

Синтез GSH включает в себя две АТФ-зависимые реакции (Рисунок 9А). Первая, лимитирующая, реакция образования γ -Глу-Цис из глутамата и цистеина катализируется γ -глутамилцистеин синтетазой (γ -ECS), которая кодируется геном *GSH1*. Образующаяся амидная связь между γ -карбоксильной группой глутамата с аминогруппой цистеина защищает GSH от гидролиза пептидазами. Вторая стадия синтеза GSH из γ -Глу-Цис и глицина

катализируется глутатион синтазой (GSHS), которая кодируется геном *GSHS* (Frendo *et al.*, 2001) (Рисунок 9А).

Биологические функции GSH связаны в основном с обратимыми окислительно-восстановительными реакциями тиоловой группы цистеина, которые приводят к сосуществованию в клетке в двух основных стабильных форм этого тиола: восстановленной и окисленной, в которой две молекулы связаны дисульфидной связью. В оптимальных условиях значения отношения восстановленной формы к окисленной довольно высоки в клетке. Редокс-статус GSH поддерживается на высоком уровне с помощью глутатионредуктазы, которая использует НАДФН в качестве восстановителя (Queval *et al.*, 2011).

У растений GSH вместе с аскорбатом являются основными клеточными окислительно-восстановительными буферами (Rouhier *et al.*, 2008a). GSH обнаружен практически во всех компартментах клетки, однако, наиболее высокой концентрацией характеризуются митохондрии, цитозоль и хлоропласты растительной клетки (Queval *et al.*, 2011). GSH может реагировать с остатками цистеина белков с образованием смешанных дисульфидов посредством процесса глутатионилирования, но по сравнению с животными, этот процесс по-прежнему малоизучен у растений (Dixon *et al.*, 2005; Zaffagnini *et al.*, 2012). Глутаредоксины, которые связывают окислительно-восстановительный потенциал GSH с изменениями тиол-дисульфидного статуса белков, участвуют в процессе деглутатионилирования и в регенерации множества ферментов, таких как пероксиредоксины и метионинсульфоксидредуктазы (Rouhier *et al.*, 2008b; Rouhier, 2010; Lillig, Berndt, 2013).

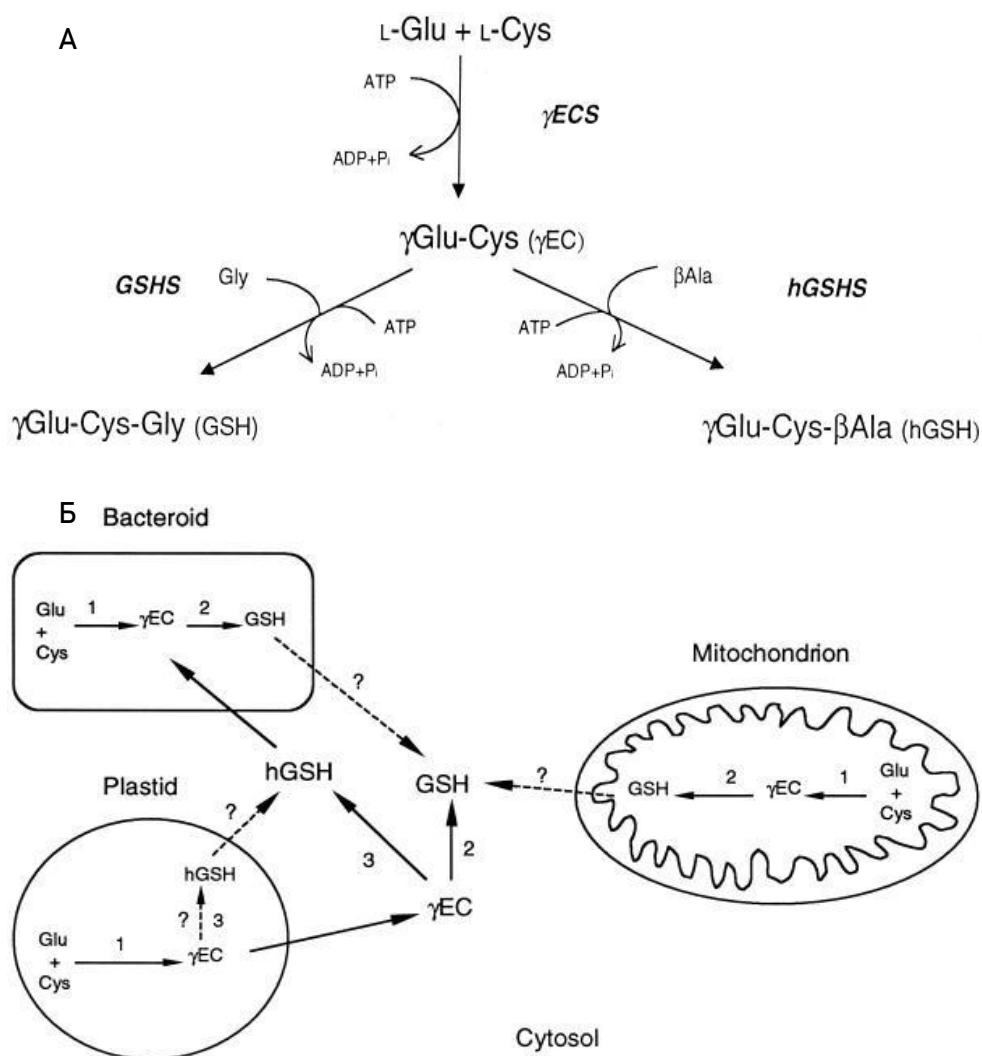


Рисунок 9. — Синтез GSH и hGSH

АТФ-зависимые реакции, с образованием γ -Глу-Цис из глутамата и цистеина γ -глутамилцистеин синтетазой (γ -ECS), и добавление глицина к С-концу γ -Глу-Цис, катализируемое глутатион синтетазой (GSHS). При синтезе hGSH β -аланин заменяет глицин во второй реакции, катализируемой гомоглутатион синтетазой (hGSHS). Ферменты: γ -ECS (1), GSHS (2) и hGSHS (3). В клубеньках бобовых растений, продуцирующих GSH, реакция 1 происходит в бактериоидах, пластидах и митохондриях, а реакция 2 – в бактериоидах, митохондриях и цитозоле. В клубеньках бобовых растений, продуцирующих hGSH, реакция 1 происходит в бактериоидах и пластидах, реакция 2 – в бактериоидах, а реакция 3 – в цитозоле и, вероятно, также в пластидах. Стрелки в прерывистых линиях указывают на возможный вклад бактериоидов и митохондрий в цитозольный пул GSH и пластид – в цитозольный пул hGSH (Moran *et al.*, 2000).

GSH может также реагировать с многочисленными эндогенными и ксенобиотическими электрофильными соединениями через глутатион-S-трансферазы (Dixon *et al.*, 2010; Cummins *et al.*, 2011). Наконец, GSH также

защищает растения от тяжелых металлов путем образования фитохелатинов, которые являются олигомерами GSH. Фитохелатины синтезируются фитохелатинсинтазой, которая использует GSH в качестве субстрата (Clemens, 2006).

GSH играет решающую роль в развитии растений и адаптации растений к окружающей среде. Анализ фенотипов мутантов *A. thaliana* с дефицитом GSH показал, что GSH участвует в развитии эмбриона и растительных меристем (Vernoux *et al.*, 2000; Cairns *et al.*, 2006; Schippers *et al.*, 2016). В исследованиях мутанта *A. thaliana Atrax1*, который имеет только половину нормального уровня GSH в листьях, была показана конститутивная экспрессия индуцируемой фотоокислительным стрессом аскорбатпероксидазы 2, что свидетельствует о роли GSH также в передаче световых сигналов (Ball *et al.*, 2004).

Однако роль GSH не ограничивается регуляцией роста растений и адаптацией к абиотической среде. GSH участвует в ответах растений и на биотические стимулы (Frendo *et al.*, 2013). GSH необходим для оптимальной защиты растений от патогенов. Некоторые эффекты GSH во время взаимодействия с патогенами, вероятно, связаны с его сигнальной ролью, тогда как другие – с синтезом фитогормонов и вторичных метаболитов. Важные данные были получены путем анализа мутантов *A. thaliana* с дефицитом GSH. Мутант *Atpad2* был идентифицирован как дефектный по синтезу индольного фитоалексина камалексина, содержащего один атом S на молекулу, и тиазольное кольцо которого частично образовано из цистеина (Glazebrook, Ausubel, 1994). Этот мутант, дефектный по гену *GSH1*, характеризуется также нарушенным синтезом защитных белков, салициловой кислоты и повышенной чувствительностью к патогенам *P. syringae*, *Phytophthora brassicae* и *Botrytis cinerea* (Roetschi *et al.*, 2001; Ferrari *et al.*, 2003; Parisy *et al.*, 2007). При изучении мутантов *A. thaliana*, дефектных по гену *GSH1*, среди которых *Atpad2* имел самое низкое содержание GSH в листьях, *Atcad2* – промежуточное, и *Atrax1* – самое высокое содержание GSH по

сравнению с растениями дикого типа, было показано, что количество GSH в этих мутантах коррелировало с их устойчивостью к *P. brassicae* (Parisy *et al.*, 2007). Было выдвинуто предположение, что определенный уровень GSH необходим для синтеза соединений, связанных с защитой от патогенов и устойчивости к болезням. Этот уровень может варьироваться в зависимости от условий и специфичности патогена. В случае синтеза камалексина было показано, что GSH необходим в качестве предшественника тиазольного кольца этого фитоалексина (Böttcher *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2011).

Помимо влияния на синтез камалексина и устойчивость к микроорганизмам, мутант *Atpad2* демонстрирует пониженную устойчивость к насекомому *Spodoptera littoralis*. Два основных индола и алифатические глюкозинолаты, продуцируемые в ответ на поедание насекомыми, накапливаются у этого мутанта в гораздо меньшей степени, чем у растений дикого типа, причем этот эффект может быть устранен добавлением GSH, но не дитиотреитола – общего восстановителя дисульфидов. Вероятно, как и в случае с камалексином, GSH необходим для синтеза глюкозинолата в качестве источника серы, а не в качестве сигнальной или регуляторной молекулы (Schlaeppli *et al.*, 2008).

Однако GSH не только служит источником восстановленной серы для синтеза вторичных метаболитов, но и участвует в процессах передачи сигналов. Экзогенный GSH может имитировать действие грибных элиситоров и вызывать активацию экспрессии защитных генов (Dron *et al.*, 1988; Wingate *et al.*, 1988), включая *PR1* (Gomez *et al.*, 2004; Senda, Ogawa, 2004). Более того, накопление GSH запускается инфекцией различных патогенов (Edwards *et al.*, 1991; May *et al.*, 1996). Содержание GSH увеличивается во время взаимодействия между галловыми нематодами и *M. truncatula* (Baldacci-Cresp *et al.*, 2012). Накопление GSH в корнях представителей *Brassicaceae* является положительным маркером килы – болезни, вызванной биотрофным патогеном *Plasmodiophora brassicae* (Wagner *et al.*, 2012). Эти ответы также могут включать характерные временные изменения окислительно-

восстановительного состояния GSH (Vanacker *et al.*, 2000; Parisy *et al.*, 2007). Подобные эффекты, вызываются также экзогенной салициловой кислотой или биологически активными аналогами салициловой кислоты (Mou *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2006; Koornneef *et al.*, 2008).

Тиол-дисульфидный статус также участвует в контроле мастер-регулятора NPR1, который вместе с другими NPR-белками является частью рецептора салициловой кислоты (Tada *et al.*, 2008; Backer *et al.*, 2019). Индукция экспрессии *PR*-генов в этом салицилат-зависимом пути происходит за счет мономеризации олигомерного цитозольного белка NPR1, которая открывает сигнальный мотив ядерной локализации и NPR1 перемещается в ядро, где он взаимодействует с факторами транскрипции TGA, которые также являются редокс-чувствительными (Després *et al.*, 2003). Преобразование NPR1 в мономер требует прямого взаимодействия с салициловой кислотой (Backer *et al.*, 2019), а также восстановления дисульфидных связей олигомерной формы. Это преобразование происходит *in vitro* в буфере GSH / GSSG (Mou *et al.*, 2003). Хотя активация белка NPR1 происходит за счет восстановления дисульфидных связей, изначальным стимулом, ведущим к активации *PR*-генов, является окисление. Чрезмерное окисление может приводить к реакции гиперчувствительности, что в большинстве случаев связано с продукцией АФК в апопласте, однако, окислительный стресс внутри клетки также может приводить к подобным реакциям. Вероятно, окислительно-восстановительный потенциал GSH (или накопление GSSH) может играть роль в процессах запрограммированной клеточной гибели. Например, увеличение общего уровня GSH в листьях, вызванное эктопической сверхэкспрессией γ -ECS в хлоропластах табака, приводило к накоплению GSSH, что было ассоциировано с образованием повреждений и усилением экспрессии *PR*-генов (Creissen *et al.*, 1999). Кроме того, повреждения, как при реакции гиперчувствительности, вызванные внутриклеточным окислительным стрессом, также сопровождались накоплением GSSH (Smith *et al.*, 1984; Chamnongpol *et al.*, 1998; Chaouch *et al.*,

2010). Тем не менее, вряд ли существует простая прямая взаимосвязь между окислительно-восстановительным потенциалом GSH и клеточной гибелью (Noctor *et al.*, 2012).

Наконец, GSH играет ключевую роль во взаимодействии бобовых растений с симбиотическими бактериями. У представителей семейства *Fabaceae* обнаружен уникальный гомолог GSH – гомоглутатион (hGSH), у которого глицин заменен на β -аланин (Klarheck, 1988). Тиоловая группа, присутствующая в цистеине и являющаяся химически наиболее важной для биологических функций GSH, присутствует и в hGSH. У hGSH к γ -Глу–Цис присоединяется β -аланин с помощью фермента гомоглутатионсинтетазы (hGSHS), кодируемой геном *hGSHS* (Frendo *et al.*, 2001; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2002) (Рисунок 9А). Мутанты *A. thaliana*, нокаутированные по генам *GSH1* и *GSHS* имеют летальные фенотипы на стадии эмбриона (Cairns *et al.*, 2006) и проростка, соответственно (Pasternak *et al.*, 2008). Однако, подобных данных до сих пор не получено для *hGSHS*.

Филогенетический анализ показал, ген *hGSHS* появился в результате дупликации гена *GSHS*, которая произошла после расхождения между порядками *Fabales*, *Solanales* и *Brassicales*. Анализ структуры этих генов у *M. truncatula* показал, что они локализуются в кластере и в одинаковой ориентации в геноме, таким образом, вероятно, являются результатом тандемной дупликации. hGSH обнаруживается в основном в подсемействе *Faboideae* у видов, принадлежащих к трибам, встречающимся преимущественно в пределах четырех клад: *Millettoid sensu lato*, *Robinoid*, *Galegeae sensu lato* и *Vicioid*. Все эти клады принадлежат к так называемой кладе Старого Света («Old World clade»), что указывает на то, что дупликация гена, приведшая к образованию hGSHS, вероятно, произошла после дивергенции клады Старого Света (Shoemaker *et al.*, 2006; Soltis *et al.*, 2009). Однако не все виды в кладе Старого Света способны синтезировать hGSH, и даже в пределах одной трибы обнаруживаются различия в относительном содержании hGSH и GSH (Colville *et al.*, 2015). Это говорит о том, что

способность синтезировать hGSH могла быть потеряна у некоторых видов. Дупликация генов ведет к избыточности и короткому периоду ослабления давления отбора, в течение которого в дублированных генах накапливаются мутации. Дублированные гены, которые сохраняются в период ослабленного давления отбора, относительно стабильны (Schlueter *et al.*, 2004). Экспрессия большинства дублированных генов подавляется, кроме случаев, дающих какое-либо преимущество (Lynch, Conery, 2000). Появление hGSH у пары видов клады *Mimosoid* предполагает, что синтез hGSH мог возникать независимо до дивергенции подсемейства *Faboideae*, возможно, из-за изолированных событий дубликации генов, однако, эта способность впоследствии могла быть потеряна у других видов данной клады из-за отсутствия преимуществ для вида. Тем не менее, сохранение синтеза hGSH у видов подсемейства *Faboideae* предполагает, что hGSH может выполнять у них важные функции. Селективное преимущество, обеспечиваемое hGSH, все еще остается невыясненным. hGSH, как GSH может выполнять антиоксидантные функции, роль в метаболизме серы и связывании тяжелых металлов. Не было выявлено очевидной связи между возникновением hGSH и географическим происхождением семян или климатическими условиями. Тем не менее, присутствие специфических цис-регуляторных элементов в промоторных областях каждого из генов, *GSHS* и *hGSHS*, указывает на то, что у бобовых растений эти тиолы могут выполнять разные функции, либо выполнять сходные функции, которые разделены во времени или пространстве (Clemente *et al.*, 2012). Действительно, hGSH имеет тенденцию накапливаться в листьях и корнях бобовых растений, тогда как GSH обычно присутствует в высоких концентрациях в семенах (Colville *et al.*, 2015). У *M. sativa* GSH связан с меристематическими клетками, активацией клеточного цикла и индукцией соматического эмбриогенеза, тогда как hGSH – с дифференцированными клетками и пролиферацией эмбрионов (Pasternak *et al.*, 2014). У *L. japonicus* *GSHS* экспрессируется только в клубеньках, тогда как *hGSHS* также экспрессируется в листьях и корнях (Matamoros *et al.*, 2003), у *M.*

truncatula *hGSHS* экспрессируется в корнях и клубеньках, а *GSHS* экспрессируется во всех тканях (Frendo *et al.*, 1999). Экспрессия *GSHS* и *hGSHS* в бобовых растениях также по-разному регулируется в ответ на сигнальные молекулы или стресс. В корнях *M. truncatula* экспрессия генов *GSH1* и *GSHS*, но не *hGSHS* может индуцироваться окисью азота (Innocenti *et al.*, 2007), в корнях *L. japonicus* *GSHS* активировался ауксинами, цитокининами и полиаминами, тогда как уровень экспрессии *hGSHS* оставался неизменным (Весана *et al.*, 2010). Экзогенный пероксид водорода приводил к увеличению уровня экспрессии генов *GSH1* и *hGSHS* в клубеньках фасоли, в то время как хлорид кадмия, хлорид натрия или жасмоновая кислота не вызывали такого эффекта (Loscos *et al.*, 2008). Длительная обработка CdCl_2 растений *P. sativum* дикого типа приводила к небольшому повышению уровня экспрессии *GSHS* в корнях, в то время как у мутантных растений, устойчивых к кадмию, было выявлено небольшое снижение экспрессии. В то же время экспрессия гена *hGSHS* усиливалась при действии CdCl_2 как у мутанта, так и у растений дикого типа (Кулаева, Цыганов, 2014).

Существенная роль GSH и hGSH в клубенькообразовании была продемонстрирована для *M. truncatula* (Frendo *et al.*, 2005; Pucciariello *et al.*, 2009). Эксперименты с использованием антисмысловых конструкций к *GSHS* и *hGSHS* и ингибитора γ -ECS L-бутионин-S-R-сульфоксимины показали, что в растениях со сниженным уровнем тиолов уменьшалось число клубеньков и снижался уровень экспрессии генов ранних нодулинов *MtENOD12* и *MtENOD40*. В то же время не наблюдалось изменений в развитии инфекции, и изменения в уровне экспрессии гена *MtRip1*, маркера инфекционного процесса. Уменьшение числа клубеньков было связано с уменьшением и числа боковых корней (Frendo *et al.*, 2005). Ранее было показано, что GSH необходим для деления клеток в кончике корня (Vernoux *et al.*, 2000) и его концентрация в клубеньке наиболее высока в меристеме и зоне инфекции (Matamoros *et al.*, 1999). Как оказалось, снижение уровня синтеза тиолов в растениях *M. truncatula* также приводило к снижению уровня экспрессии гена аквапорина

PIP2, вовлеченного в формирование клубеньковой меристемы. В то же время, у растений наблюдалось увеличение уровня экспрессии генов, регулируемых салициловой кислотой (Pucciariello *et al.*, 2009). Активация генов, регулируемых салициловой кислотой, вероятно, опосредована редокс-чувствительным белком NPR1, подавляющим деформацию корневых волосков и экспрессию нодулинов. Таким образом, на ранних этапах взаимодействия наличие определенного пула GSH и hGSH в растительных клетках, по-видимому, является необходимым условием для ингибирования салицилат-индуцируемых защитных механизмов и колонизации ризобиями растения-хозяина (Peleg-Grossman *et al.*, 2009).

Роль GSH и hGSH была также исследована в зрелых клубеньках *M. truncatula* (El Msehli *et al.*, 2011). Было показано, что сверхэкспрессия *GSH1* приводила к увеличению содержания GSH, но не hGSH, что коррелировало с повышением эффективности фиксации азота. Снижение уровня экспрессии *GSH1* с помощью РНК-интерференции приводило к понижению эффективности фиксации азота и снижению количества тиолов, а также к уменьшению размера клубеньков. При этом экспрессия гена *GSH1* наблюдалась в меристеме, зоне инфекции и начале зоны азотфиксации, *hGSHS* – в коре и проводящих пучках, а *GSHS* – в коре и в зоне азотфиксации. Наблюдаемые различия в паттернах экспрессии *GSHS* и *hGSHS*, указывают на различия в регуляции синтеза GSH и hGSH в различных тканях клубенька (El Msehli *et al.*, 2011). Исследования методами внутриклеточного фракционирования и иммулокализации в клубеньках показали, что γ -ECS локализуется в пластидах, в то время как GSHS и hGSHS локализованы преимущественно в цитозоле (Moran *et al.*, 2000; Clemente *et al.*, 2012) (Рисунок 9Б).

Ризобии имеют собственные ферменты синтеза GSH (Moran *et al.*, 2000), тем не менее, бактериоды *P. vulgaris*, например, в значительном количестве накапливают hGSH в результате поглощения из инфицированных клеток растения (Moran *et al.*, 2000). GSH вероятнее всего тоже потребляется

бактероидами в метаболических реакциях, нежели экспортируется в растение (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2002). Бактериальный GSH играет важную роль при формировании симбиотического взаимодействия и в функционировании бактериального симбионта в клубеньке. Было показано, что мутанты *R. tropici* и *R. etli* по гену *GSHS*, не могут конкурировать со штаммами дикого типа при образовании клубеньков (Ricciolo *et al.*, 2000; Taté *et al.*, 2012). Большинство сайтов инфекции, индуцированных мутантом *R. etli* на главном корне претерпевали преждевременную абортацию, а сформировавшиеся клубеньки показывали низкую нитрогеназную активность, что может быть связано со сниженной функциональностью переносчиков глутамин в бактериоидах, дефектных по синтезу GSH (Taté *et al.*, 2012). Дефицит GSH у мутантного штамма *S. meliloti* 2011 не влиял на дифференцировку бактериоидов, однако, запускал процесс раннего старения клубеньков у *M. truncatula* через 10 дней после инокуляции и преждевременную деградацию бактериоидов. Клубеньки, индуцированные мутантом *R. tropici*, дефектным по синтезу GSH, на корнях *P. vulgaris*, также претерпевали раннее старение (Muglia *et al.*, 2008).

Таким образом, к настоящему времени была выявлена важная роль GSH и hGSH в формировании и функционировании симбиотических клубеньков как для микро-, так и для макросимбионта. Тем не менее, остается недостаточно изученной специфичность действия GSH и hGSH, их координация на различных стадиях развития клубеньков, а также в случаях, когда симбиотические взаимодействия оказываются неэффективными.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Объекты исследования и условия выращивания

В работе были использованы линия дикого типа гороха посевного (*Pisum sativum* L.) SGE (Kosterin, Rozov, 1993), а также полученные на ее основе неэффективные симбиотические мутанты по генам *Sym40* и *Sym33* из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ.

На растениях дикого типа SGE формируются розовые азотфиксирующие клубеньки, характеризующиеся типичной для *P. sativum* гистологической организацией (Tsyganov *et al.*, 1998).

Клубеньки мутантной линии *sym40-1* (SGEFix⁻¹) характеризуются образованием гипертрофированных инфекционных капель и аномальной морфологической дифференцировкой бактериоидов (Tsyganov *et al.*, 1998; Voroshilova *et al.*, 2009). Кроме того, в клубеньках отмечается повышенное накопление пероксида водорода, в особенности, вокруг ювенильных бактериоидов и преждевременная деградация симбиотических структур (Цыганова *и др.*, 2009; Serova *et al.*, 2018). Ген *Sym40* является ортологом гена *EFD M. truncatula* (Tsyganov, Tsyganova, 2020).

Ген *Sym33* является ортологом гена *IPD3 M. truncatula* (Tsyganov, Tsyganova, 2020). Исследования проводились с использованием двух аллельных мутантов – *sym33-2* и *sym33-3*. Мутантная аллель *sym33-2* (линия SGEFix⁻⁵) описана как строгая. Большинство клубеньков мутантной линии *sym33-2* характеризуется остановкой развития на ранних стадиях. В центре клубенька наблюдается разветвленная инфекционная нить, которая блокируется в клетках наружной коры корня, не проникая вглубь клубенька. Инфекционные нити окружены аномально утолщенными стенками, в некоторых из них наблюдается деградация бактерий. В этих клубеньках не происходит выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки. (Ovchinnikova *et al.*, 2011; Цыганов *и др.*, 2012; Цыганова *и др.*, 2019).

На растениях мутантной линии *sym33-3* (SGEFix⁻²) формируются клубеньки, характеризующиеся блоком развития инфекционных нитей,

которые окружены аномально утолщенными стенками. В этих клубеньках не происходит выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки. Однако, аллель *sym33-3* характеризуются «leaky»-фенотипом, поэтому в некоторых случаях в единичных клетках наблюдается формирование инфекционных капель и выход бактерий (Tsyganov *et al.*, 1998; Voroshilova *et al.*, 2001).

Семена стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего десятикратно промывали стерильной водой. Семена проращивали на вермикулите в течение 3-х суток в стерильных влажных условиях в чашках Петри при температуре 28 °С в темноте. Перед посадкой в пластиковые горшки, вмещающие 100 г стерильного вермикулита и 200 мл безазотного минерального питательного раствора FP (Fåhræus, 1957), семена инокулировали 1 мл водной суспензии бактерий (разведение 10^8 - 10^9 кл/мл). Для инокуляции был использован штамм клубеньковых бактерий из коллекции непатогенных микроорганизмов ФГБНУ ВНИИСХМ (любезно предоставленный Центром Джона Иннеса (Великобритания)) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 3841 – нативный стрептомицин-устойчивый мутант (Glenn *et al.*, 1980). Культивирование штамма в течение 48 ч при 28 °С проводили на жидкой и агаризованной среде ТУ (Beringer, 1974), содержащей 0,6 мг/мл стрептомицина.

Растения выращивались в климатической камере MLR-352H (Sanyo Electric Co., Япония) в режиме день/ночь 16/8 ч, при температуре 21 °С, относительной влажности воздуха 75%, освещенности 280 мкМ фотонов $m^{-2} c^{-1}$.

Сбор клубеньков проводился через одну, две, три, четыре или шесть недель после инокуляции (НПИ) в зависимости от анализа. При анализе относительного уровня экспрессии генов, ассоциированных с защитными реакциями, были использованы клубеньки в возрасте 2, 4 и 6 НПИ. При анализе относительного уровня экспрессии генов биосинтеза GSH и hGSH, а также относительного количества тиолов в тканях *P. sativum* также использовались неинокулированные корни растений дикого типа и мутантных

линий в возрасте 1, 2, и 3 НПИ. В экспериментах с обработками растений L-бутионин-S,R-сульфоксимином и экзогенным GSH анализировались корни с клубеньками растений дикого типа и мутантных линий в возрасте 2 НПИ. Для методов световой микроскопии использовались клубеньки в возрасте 3 и 6 НПИ, для лазерной сканирующей – 3 НПИ. Для проведения анализов клубеньки / корни собирались с 6 – 20 растений на вариант. Для каждого эксперимента было поставлено минимум 3 биологические повторности.

2.2. Обработка L-бутионин-S,R-сульфоксимином и экзогенным глутатионом

Для оценки влияния GSH и hGSH на клубенькообразование были использованы и L-бутионин-S,R-сульфоксимин (BSO; Sigma-Aldrich, USA) – ингибитор γ -глутамилцистеин синтетазы (Griffith & Meister 1979) и восстановленная форма GSH (Вектон, Россия). Растения выращивались в условиях, описанных в п. 2.1.

2.2.1. Обработка L-бутионин- S,R-сульфоксимином

У трехдневных проростков каждого генотипа удаляли семядоли, в которых в большом количестве содержится GSH. Проростки были разделены на 2 группы, одна из которых оставалась необработанной и выращивалась в горшках с вермикулитом, содержащих только питательный раствор, а другая – с питательным раствором, содержащим BSO в концентрации 0,1 мМ. Через неделю растения, выращенные в присутствии BSO, были снова разделены на 2 группы, как минимум по 12 растений в каждой. Растения переносили в новые горшки с вермикулитом и питательным раствором, содержащим 0,1 мМ BSO или 0,1 мМ BSO + 0,5 мМ GSH, а затем инокулировали бактериями. Группу необработанных растений также пересаживали в новые горшки, содержащие стандартный питательный раствор и инокулировали. В дальнейшем растения поливали по весу растворами с теми же концентрациями химических веществ каждые три дня. Необработанные растения поливали стерильной водой.

Клубеньки для микроскопического анализа, а также корни с клубеньками для анализа экспрессии генов и определения количества тиолов были собраны через 2 НПИ. Во время съема эксперимента было также проанализировано общее число клубеньков. Статистическая достоверность различий в количестве клубеньков была оценена с помощью однофакторного дисперсионного анализа при $P \leq 0,05$.

2.2.2. Обработка экзогенным глутатионом

Трехдневные проростки каждого генотипа были разделены на 3 группы и инокулированы бактериями. Одна группа растений оставалась необработанной, тогда как к двум другим группам через 64 ч после инокуляции в субстрат были добавлены 100 мл приготовленного непосредственно перед процедурой водного раствора GSH концентрацией 1 или 0,1 мМ, соответственно. В дальнейшем все растения поливали по весу растворами той же концентрации каждые три дня. Группу необработанных растений поливали стерильной водой. Клубеньки для микроскопического анализа, а также корни с клубеньками для анализа экспрессии генов и определения количества тиолов были собраны через 2 НПИ.

2.3. Молекулярные методы

2.3.1. Выделение тотальной РНК

- 1) Материал (100 мг) для выделения тотальной РНК гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках с жидким азотом.
- 2) К растертым пробам добавляли по 1 мл PureZol Isolation Reagent (Bio-Rad, США) и тщательно перемешивали на вибрационном встряхивателе типа «Vortex» (Scientific Industries, USA), затем инкубировали при комнатной температуре 5 мин. В процессе выделения тотальной РНК температуру проб поддерживали на уровне 4 °С, если не указано другое.

- 3) Пробы центрифугировали 10 мин 12000g и переносили супернатант в новые пробирки, а затем снова инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин.
- 4) К супернатанту добавляли по 200 мкл хлороформа, перемешивали на встряхивателе в течение 15 с и инкубировали 5 мин при комнатной температуре.
- 5) Пробы центрифугировали в течение 15 мин при 12000g.
- 6) 600 мкл верхней водной фазы переносили в новые пробирки, добавляли к ним по 500 мкл изопропилового спирта и перемешивали на встряхивателе.
- 7) Инкубировали пробы в течение 10 мин при комнатной температуре.
- 8) Затем пробы центрифугировали 10 мин при 12000g и удаляли супернатант, к осадку добавляли по 1 мл 70%-го этанола.
- 9) Пробы центрифугировали в течение 5 мин при 7500g.
- 10) Удаляли спирт и сушили осадок, содержащий тотальную РНК, в течение 7 мин при комнатной температуре для последующей ДНКазной обработки.
- 11) Осадок растворяли в 44 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом (Thermo Fisher Scientific, США), и добавляли по 6 мкл реакционной смеси, содержащей ДНКазу I (1 ед/мкл) и 10х реакционный буфер с $MgCl_2$ (MBI Fermentas, Литва) в соотношении 1:5.
- 12) Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37 °С и затем добавляли 150 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом и 200 мкл хлороформа, перемешивали на встряхивателе.
- 13) Пробы центрифугировали в течение 10 мин при 16000g, и переносили 150 мкл образовавшегося супернатанта в новые пробирки.
- 14) К супернатанту добавляли 15 мкл 3М ацетата натрия (рН 5,2) и 375 мкл 96%-го этанола.
- 15) Пробы оставляли на ночь при -20 °С, после чего центрифугировали в течение 20 мин при 16000g и удаляли супернатант.

- 16) К осадку добавляли 400 мкл 70%-го этанола.
- 17) Пробы центрифугировали 10 мин при 16000g, удаляли супернатант, а осадок высушивали 7 мин.
- 18) Осадок, содержащий тотальную РНК, растворяли в 20 мкл воды, обработанной диэтилпиروкарбонатом и хранили при -80 °С.

Концентрация и качество тотальной РНК, 18S и 28S РНК были определены с использованием системы электрофореза на микрочипах для исследования нуклеиновых кислот MultiNA (Shimadzu Corporation, Япония).

2.3.2. Реакция обратной транскрипции

Синтез кДНК для каждой пробы производили из 1,5 мкг тотальной РНК. В реакционную смесь для обратной транскрипции входили: 200 ед./мкл обратной транскриптазы RevertAid Reverse Transcriptase, 1мМ dNTP Set, 0,5 мкг праймеров Oligo(dT)₁₈, 20 ед./мкл ингибитора РНКаз RiboLock RNase Inhibitor (МВІ Fermentas, Литва) и вода, обработанная диэтилпирокарбонатом, до 20 мкл. Синтез кДНК на матрице мРНК проводили при 40 °С в течение 60 мин, затем инактивировали фермент нагреванием смеси до 70 °С в течение 10 мин. Реакцию проводили в автоматическом амплификаторе С1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Полученные препараты кДНК разбавляли в соотношении 1:5 и хранили при -20 °С.

2.3.3. Дизайн праймеров и стандартный ПЦР-анализ

Программное обеспечение VectorNTI Advanced 10 (Invitrogen, США) было использовано для дизайна праймеров, которые затем были синтезированы компанией Евроген (<http://eurogen.ru>). Температура отжига для всех праймеров составила 56 °С. Последовательности праймеров представлены в Таблице 1.

20 мкл реакционной смеси для ПЦР-анализа содержали 2,5 ед/мкл Taq полимеразы (Силекс, Россия), 0,1 мМ dNTP Set, 0,1 мкМ каждого геноспецифичного праймера и 2 мкл кДНК в качестве матрицы. Температурный режим реакции: 94 °С 5 мин (начальная денатурация ДНК), 30 циклов амплификации: 94 °С 30 сек (денатурация ДНК), 56 °С 30 сек (отжиг

праймеров), 72 °C 40 сек (синтез ДНК), 72 °C 10 мин (окончание синтеза ДНК). Реакцию проводили в автоматическом амплификаторе C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Детекцию результатов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в 0,5% трис-ацетатном буфере при окрашивании SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, США). Систему документации гелей Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad, США) и программное обеспечение Image Lab (Bio-Rad, США) использовали для визуализации электрофореграммы.

2.3.4. Относительный ПЦР-анализ в режиме реального времени

Относительный ПЦР-анализ в режиме реального времени проводился в 10 мкл реакционной смеси iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя, с добавлением 0,04 мкМ каждого геноспецифичного праймера и 0,8 мкл кДНК. Температурный режим реакции: горячий старт 3 мин 95 °C, денатурация 30 с 95 °C, отжиг праймеров 30 с 56 °C, элонгация 30 с 72 °C, 40 циклов амплификации. Флуоресценция интеркалирующего красителя SYBR Green I считывалась при 72 °C в конце каждого цикла. Реакцию осуществляли в автоматическом амплификаторе C1000™ Thermal Cycler, совмещенном с оптическим модулем CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, США). Результаты были обработаны с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, США), GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США) и среды программирования R. Расчет уровня экспрессии проводили методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ с использованием *GapC1* в качестве референсного гена (Таблица 1). В качестве калибратора использовали неинокулированные корни растений дикого типа в возрасте трех или одной недели (в зависимости от эксперимента), принимая относительный уровень экспрессии целевого гена в таком образце за единицу. В экспериментах с обработками за калибратор принимался образец необработанных корней с клубеньками растений дикого типа. Статистически достоверные различия

определяли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ($P \leq 0,05$). Эксперименты были проведены минимум в трех повторностях, 7 – 10 растений на вариант.

Таблица 1. Последовательности праймеров для анализа экспрессии выбранных генов *P. sativum*

Ген	Кодируемый продукт	Источник последовательности	Праймеры (прямой и обратный) 5' - 3'
¹ <i>GapC1</i>	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	L07500.1	AAGAACGACGAACTCACCG TTGGCACCACCCTTCAAATG
² <i>7RA84</i>	Пероксидаза 7RA84	AF396465	TGTTTGAATCAGATGCTGCATTG CATTTGATTGAAGATGTTGTGCAA
² <i>Hsr203J</i>	Белок-маркер реакции гиперчувствительности	AB026296.1	TGTTTGAATCAGATGCTGCATTG CATTTGATTGAAGATGTTGTGCAA
<i>ABR17</i>	Белок, чувствительный к абсцизовой кислоте, PR10.4	Z15128.1	TGGGTGTCTTTGTTTTTGATGATGA TATGGCCTTGATAAGTCCAGTTCCT
<i>GSH1</i>	γ-Глутамилцистеин синтетаза	AF128455.1	CTCCTCCGCCGATAACTTC GGCGAGATAATCGATGAGATCCTG
<i>GSHS</i>	Глутатион синтетаза	AF231137.1	GCCGCTGATTTTCGTTCCACTA CGACGTCGACGGTTTGTTTACC
<i>hGSHS</i>	Гомоглутатион синтетаза	AF258319.1	GTTGTTGATTGATGGCTTGCATG GCGCCAAAATCCATTGTGAA
³ <i>EFD</i>	Этилен-зависимый транскрипционный фактор	GDTM01003917.1	ATTGGGGTTCTTGGGTCTCCGA GATTGTGGTCCATTTGGATTGTAT

⁴ <i>NF-YA1</i>	Транскрипционный фактор связывающийся с ССААТ- боксом	GDTM01036748.1	CTGACGACGGACCAACTTAC GCTTTTCCCGTTCCCATTG
<i>PR1</i>	Белок устойчивости к болезням PR1	AJ586324.1	GGGGTCCATATGGTGAGAAC TAATAACCAGGTGGATCATAGTTACA
<i>PR10</i>	Белок устойчивости к болезням PR10.3	U31669.1	GCCGGAACCATCAAGAAACT GCCTTGAAAAGACCATCACCC
³ <i>Cyp15a</i>	Цистеиновая протеаза 15а	X54358.1	GTAGCTGCAGCTCAATCCAACC CATCACCACAGTAACAGCAAGACA
⁴ <i>TPP</i>	Тиоловая протеаза	X66061.1	TGAATCCCCCTAAGCCTGCT GCCGGAGTTCGTTTGAATGAC

¹ – последовательность праймеров подобрана Кузнецовой Е. В. (Kuznetsova *et al.*, 2010)

² – использованны праймеры, описанные ранее в литературе (Die *et al.*, 2009)

³ – последовательность транскрипта, специфичного для клубеньков *P. sativum* (Zhukov *et al.*, 2015)

⁴ – последовательность праймеров подобрана Серовой Т. А. (Serova *et al.*, 2017)

2.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с масс-спектрометрическим детектированием

2.4.1. Экстракция

Выделение тиолов осуществляли на основе методики, описанной ранее (Bardarov *et al.*, 2015) с некоторыми изменениями. Каждый образец гомогенизировали в ступке с пестиком в жидком азоте. 200 мМ дитиотреитола (Fluka Chemika, Швейцария) добавляли к 100 мг растительной ткани. Образцы ресуспендировали и обрабатывали ультразвуком с использованием ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 Plus (MSE, Франция) в течение 2 мин на льду, а затем инкубировали в течение 1,5 ч при 4 °С. Каждые 20 мин пробы перемешивали с использованием встряхивателя типа «Vortex» (Scientific Industries, США). Затем супернатант отделяли с использованием центрифуги Centrifuge 5430R (Eppendorf, Германия) в течение 8 мин при 2500g и 4 °С. Супернатант переносили в новую пробирку с нейлоновым микроцентрифужным фильтром с диаметром пор 0,22 мкм (Costar, США) и повторно центрифугировали в течение 2 мин при 10000g и 4 °С. Образцы хранили при температуре –80 °С.

2.4.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с масс-спектрометрическим детектированием

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения использовался для определения профиля тиолов и их относительного количества и проводился в НИЦЭБ РАН (Санкт-Петербург, Россия) Е. Н. Черновой и Я. В. Русских. Анализ экстрактов выполняли с использованием системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии поколения LC-20 Prominence (Shimadzu Corporation, Япония) в сочетании с гибридным масс-спектрометром с тандемом орбитальной и линейной ионных ловушек LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, США) согласно методике, описанной ранее (Чернова *и др.*, 2018) с небольшими изменениями. Разделение тиолов

проводилось на колонке SupelcoSil 15 см x 3,0 мм, 3 мкм (Supelco, США). Подвижная фаза: элюэнт А: вода + 0.1% муравьиной кислоты, элюэнт В: ацетонитрил + 0.1% муравьиной кислоты. Градиентное элюирование: 2-25% элюэнта В. Скорость потока 0,4 мл/мин. Разделение проводили при концентрациях ацетонитрила (hypergrade для LC-MS LiChrosolv[®], Merck, Германия) от 2% до 5% в водном элюенте от 0 до 5 мин. На 5-ой минуте до 7-ой концентрацию ацетонитрила увеличивали до 90% для промывки колонки, затем градиент возвращали к 2% ацетонитрила до конца анализа (10 мин).

Масс-спектрометрическое детектирование выполняли в режиме электрораспылительной ионизации с регистрацией положительных ионов. Для детектирования соединений проводили сканирование в широком диапазоне значений m/z (от 100 до 2000). Идентификацию и количественное определение тиолов проводили согласно установленным временам удерживания (с ошибкой не более 0,3 мин), точным значениям m/z (точность определения масс не менее 5 ppm) и данным полных фрагментных спектров. Фрагментные спектры получали с использованием режима диссоциация, активируемая соударениями (cid, ДАС). Параметры масс-спектрометрического анализа: температура нагревателя 300 °С; температура капилляра 300 °С, газ-носитель 45 Arb; распыляющий газ 10 Arb; напряжение на ионном источнике 3,5 kV, частота модуляции S-линз 69 %. Количественный анализ проводили с использованием метода внешнего стандарта. Концентрации обнаруженных тиолов рассчитывали по площади пиков стандартов GSH и hGSH (НПФ Верта, Россия). Стоковые растворы стандартов (5 мМ/л⁻¹) готовили растворением в 250 мМ дитиотреитоле (Fluka Chemika, Швейцария) и хранили при -80 °С.

Количество тиолов в каждой пробе было пересчитано относительно количества GSH в клубеньках дикого типа, принятого за единицу, через 3 НПИ или 1 НПИ (в зависимости от эксперимента). Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Статистически достоверные различия определяли с

использованием t-критерия ($P \leq 0,05$). Эксперименты были проведены минимум в четырех повторностях, 7 – 10 растений на вариант.

2.5. Методики пробоподготовки и микроскопии

2.5.1. Фиксация материала

Фиксацию проводили по методике, разработанной в лаборатории ранее (Kitaeva *et al.*, 2018). Клубеньки фиксировали в свежеприготовленном растворе 3 % параформальдегида в 1/3 концентрации буфера MTSB (50 мМ пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота), 5 мМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 мМ этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота, pH 6.9) с добавлением 0,25% глутаральдегида, 0,3% Tween-20, 0.3% Triton-X-100. Для оптимального проникновения фиксатора воздух из ткани откачивали трижды по 7 мин с 15 мин интервалом при 0,9 бар, используя вакуумный насос ME 1C (Vacuubrand, Германия) и оставляли на ночь при 4 °С.

2.5.2. Гистохимический анализ и световая микроскопия

2.5.2.1. Заключение материала в воск Стивмана

Заключение в воск Стивмана проводили по методике, разработанной в лаборатории ранее (Kitaeva *et al.*, 2018). После фиксации клубеньки промывали буфером TBS (50 мМ TrisHCl, 150 мМ NaCl, pH 7,5) три раза по 15 мин. Клубеньки были дегидратированы в серии возрастающих концентраций этанола (10% – 10 мин, 20 – 20 мин, 30 – 30 мин, 40% – 40 мин; по 50 мин для 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, и в 96% – 2 раза по 30 мин) при комнатной температуре. Затем клубеньки окрашивали 0,1% толуидиновым синим в 96% этаноле в течение ночи. После отмывки 96%-ным этанолом (2 раза по 30 мин) клубеньки заключали в серию смеси этанола и воска Стивмана (Kitaeva *et al.*, 2018) при 40 °С (10, 20, 35, 50, 80% – по 2 часа и ночь в 100% воске). Далее материал был перенесен в новый 100% воск Стивмана на 2 ч, после чего клубеньки были разложены в специальных резиновых формочках, залиты 100% воском Стивмана и в течение 30 мин держались при 4 °С. Затем блоки с

клубеньками были оставлены для полимеризации на сутки при комнатной температуре.

2.5.2.2. Подготовка срезов после заключения материала в воск Стилдмана

Серийные срезы клубеньков (14 мкм) были получены с использованием ротационного микротомы HM360 (Micom International GmbH, Германия). Срезы были помещены на покрытые 3-аминопропилтриэтоксисиланом стекла, на которые, в свою очередь, был нанесен яичный белок, и расправлены добавлением дистиллированной воды. Удаление заливочной среды со стекол проводили путем промывки дважды в 96% этаноле в течение 30 и 10 мин, затем – в 70% и 40% этаноле по 20 мин.

2.5.2.3. Окрашивание препаратов для выявления суберина

Препараты окрашивали по модифицированной методике Лулая и Моргана с помощью диазинового красителя нейтрального красного, специфично выявляющего гидрофобные липидные домены суберина (Lulai, Morgan, 1992). Стекла промывали буфером TBS 2 раза по 10 мин и окрашивали 0,5% толуидиновым синим в TBS в течение 45 мин и снова трижды промывали буфером по 10 мин. Промытые срезы окрашивали 0,1% раствором нейтрального красного в 0,1 М K_2PO_4 (pH 6,5) в течение 1 мин и снова промывали TBS 3 раза по 10 мин. Затем срезы заключали в среду ProLong Gold® antifade reagent (Thermo Fisher Scientific, США) под покровное стекло.

2.5.2.4. Световая микроскопия

Исследования проводили с помощью микроскопа AxioImagerZ1 (Carl Zeiss, Германия), цифровых камер ColorViewII (Olympus, Германия) и AxioCam506 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2 core SP1 (Carl Zeiss, Германия). Были использованы методы дифференциально-

интерференционного контраста и флуоресцентной микроскопии (фильтр DAPI).

2.5.3. Иммулокализация и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

2.5.3.1. Приготовление срезов без заключения материала в заливочную среду для лазерной сканирующей конфокальной микроскопии

После фиксации клубеньки промывали буфером TBS три раза по 15 мин и заключали в 3% агарозный гель. Срезы толщиной 50 мкм получали с использованием микротомы с вибрирующим лезвием HM650V (Microm, Германия).

В экспериментах с обработками экзогенными BSO и GSH для анализа структурной организации клубеньков, полученные срезы промывали в TBS в течение 10 мин и окрашивали йодидом пропидия (0,5 мг/мл) в течение 7 мин для визуализации ядер и бактерий. Срезы промывали в TBS 3 раза по 10 мин и помещали в заключающую среду ProLong Gold® antifade reagent (Thermo Fisher Scientific, США) под покрывное стекло.

2.5.3.2. Иммулокализации восстановленной формы GSH

Для анализа локализации восстановленной формы GSH в клубеньках линии дикого типа и мутантных линий, полученные на микротоме с вибрирующим лезвием срезы инкубировали сначала в блокирующем растворе на основе буфера TBS (5% бычий сывороточный альбумин (БСА; $\geq 96\%$, Sigma-Aldrich, США), 0,5% сыворотка козы (Sigma-Aldrich, США), 0,2% желатин холодноводных рыб (Sigma-Aldrich, США)), а затем в растворе ацетилованного БСА (2мг/мл, Sigma-Aldrich, США) в TBS для блокирования неспецифического связывания, по 30 мин при 28 °C в каждом растворе. Далее срезы инкубировали в растворе первичных кроличьих антител к восстановленной форме GSH (1:100, Agrisera, Швеция) в TBS с добавлением 2 мг/мл БСА (фракция V) (Merck, США) и 0,4 мг/мл ацетилованного БСА в

течение ночи при 4 °С. После промывания срезов 5 раз по 10 мин в TBS, их снова инкубировали в блокирующем растворе 5% БСА в TBS при 28 °С в течение 30 мин. Инкубацию со вторичными козьими антителами к кроличьему гамма-глобулину, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 (1:500, Thermo Fisher Scientific, США) проводили при 28 °С в течение 1,5 ч. Затем срезы промывали в TBS 5 раза по 10 мин и окрашивали йодидом пропидия (0,5 мг/мл) в течение 7 мин для визуализации ядер и бактерий. Срезы промывали в TBS 3 раза по 10 мин и помещали в заключающую среду ProLong Gold® antifade reagent (Thermo Fisher Scientific, США) под покрывное стекло.

2.5.3.3. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Исследования проводили с помощью лазерных сканирующих конфокальных микроскопов LSM510 META и LSM780 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN2009 и ZEN2012 (Carl Zeiss, Германия).

Исследования были выполнены с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ и ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» ФГБУН БИН РАН.

Глава 3. Результаты исследований

3.1. Изучение проявления защитных реакций в клубеньках *P. sativum*, индуцируемых мутациями *sym40-1* и *sym33-3*

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

(Результаты исследований, представленные в разделах 3.1.1 и 3.1.2 были включены в докторскую диссертацию Цыганова Виктора Евгеньевича, которым осуществлено руководство данной кандидатской диссертации)

В клубеньках *P. sativum* дикого типа через 3 НПИ отложения суберина были выявлены в эндодерме, отделяющей слои внутренней и наружной коры клубенька в постмеристематических тканях (Рисунок 10А–Б). В клубеньках мутантной линии *sym40-1* через 3 НПИ также происходила суберинизация клеточных стенок клубеньковой эндодермы (Рисунок 11А–Г). Однако, в отличие от клубеньков дикого типа, дистальная часть клубенька, где обычно располагается меристема, также была окружена суберинизированными клетками эндодермы. В клеточных стенках эндодермы, окружающей проводящие пучки клубенька, также были выявлены отложения суберина (Рисунок 11В–Г). Таким образом, мутантный клубенек оказывался изолированным от остального растения. В клубеньках мутантной линии *sym33-3* отложения суберина были выявлены в стенках клеток, через которые проходили инфекционные нити (Рисунок 11Д–Е). Суберин также откладывался в утолщенных стенках инфекционных нитей (Рисунок 11Ж–З).

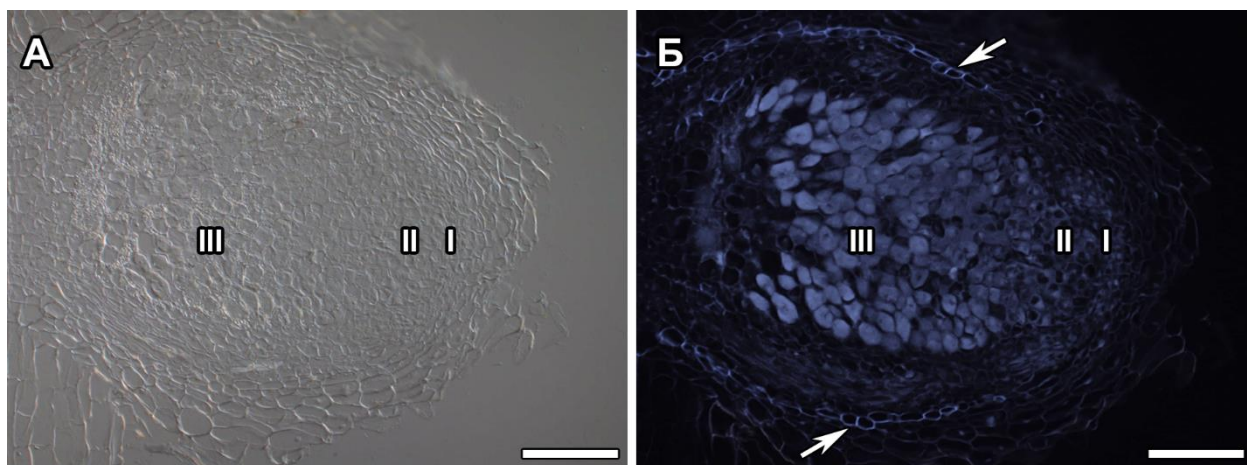


Рисунок 10. — Гистохимическая локализация отложений суберина в клубеньках *P. sativum* дикого типа через 3 недели после инокуляции

I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации, стрелки указывают на клубеньковую эндодерму. Срезы окрашены нейтральным красным. (А) дифференциально-интерференционный контраст, (Б) флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка = 200 мкм.

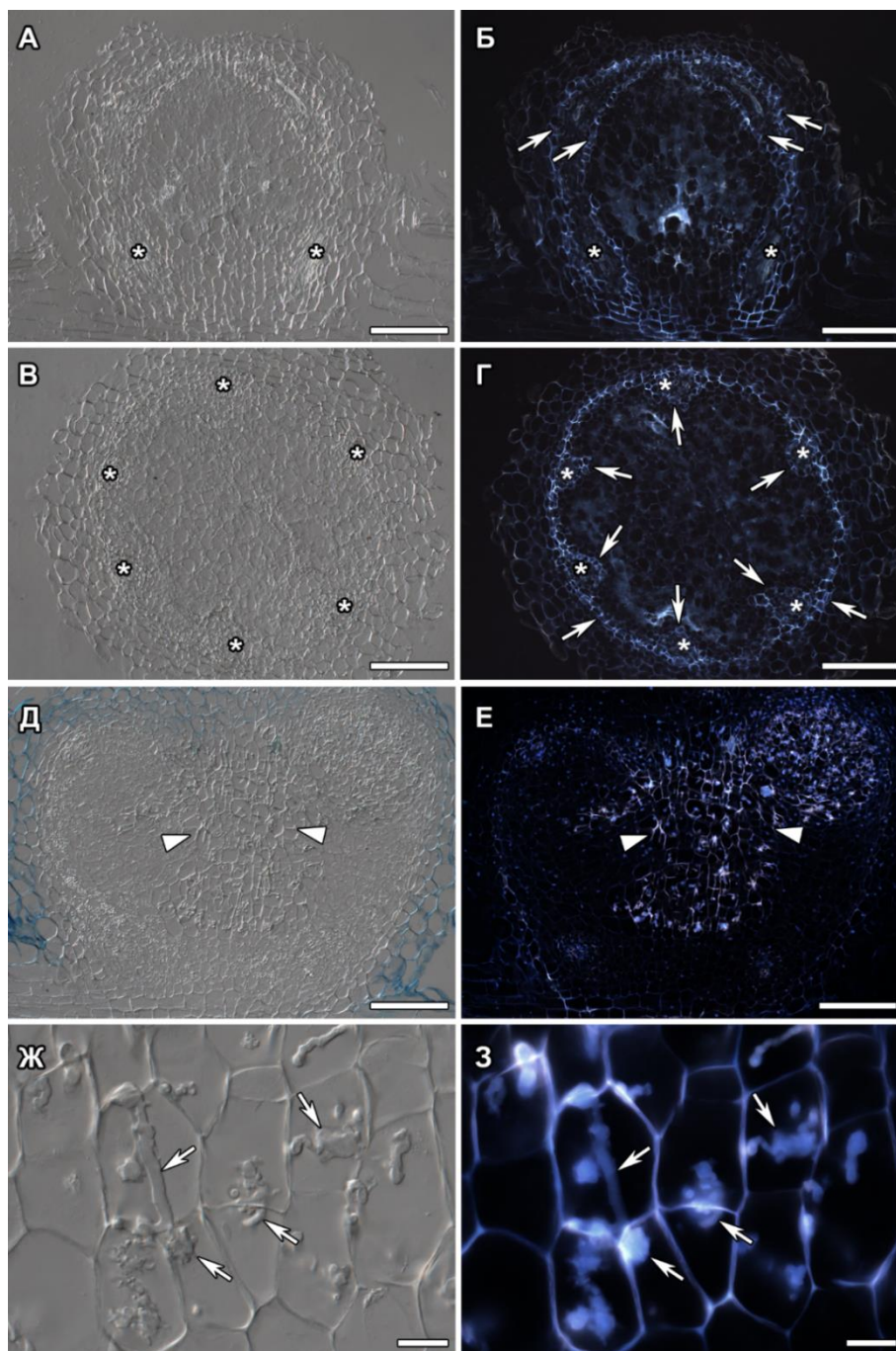


Рисунок 11. — Гистохимическая локализация отложений суберина в клубеньках *P. sativum* мутантных линий *sym40-1* (А–Г) и *sym33-3* (Д– З) через 3 недели после инокуляции

(А–Г) стрелки указывают на клубеньковую эндодерму и эндодерму, окружающую проводящие пучки, * — проводящие пучки. (Д– Е) наконечники стрелок указывают на инфекционные нити. (Ж–З) 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.

3.1.2. Анализ относительной экспрессии генов *7RA84* (пероксидаза), *HSR203J* (маркер реакции гиперчувствительности), и *ABR17* (белок из семейства PR10.4) в клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3*

Для дальнейшего анализа защитных реакций, протекающих в мутантных клубеньках *P. sativum* линий *sym40-1* и *sym33-3*, были проанализированы относительные уровни транскриптов трех генов: *7RA84* (пероксидаза), *HSR203J* (маркер реакции гиперчувствительности), и *ABR17* (белок из семейства PR10). Для гена *7RA84* максимальный уровень транскриптов наблюдался через 2 НПИ как в клубеньках дикого типа, так и в мутантных клубеньках (Рисунок 12А). 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 (Рисунок 12А). Уровень транскриптов гена *HSR203J* в клубеньках мутантной линии *sym40-1* был значительно выше, чем в клубеньках линии дикого типа на всех стадиях анализа (Рисунок 12Б). У мутантной линии *sym33-3* уровень транскриптов значительно повышался через 4 и 6 НПИ по сравнению с линией дикого типа (Рисунок 12Б).

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 (Рисунок 12В). 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 (Рисунок 12В).

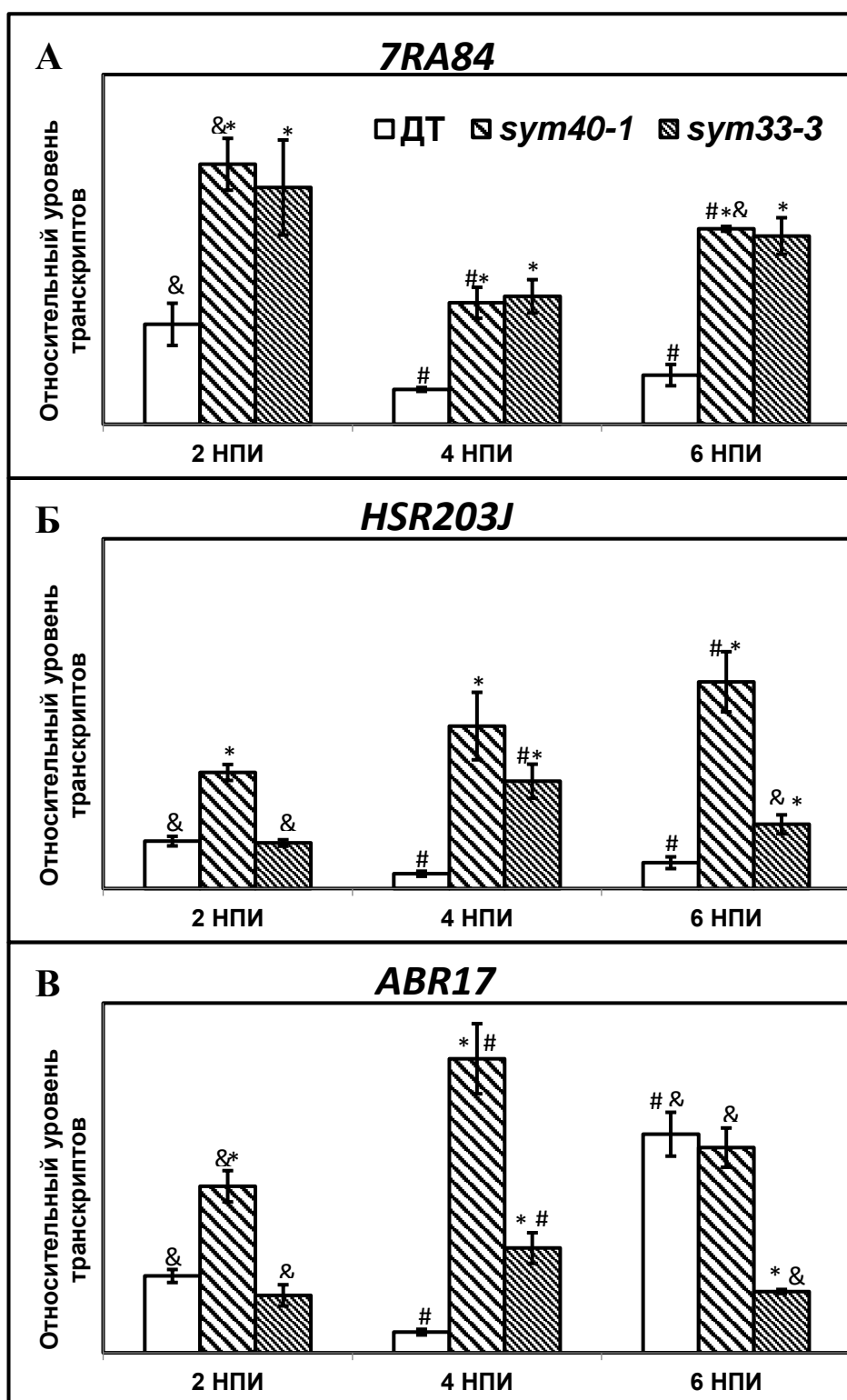


Рисунок 12. — Динамика экспрессии генов: *7RA84* (пероксидаза), *HSR203J* (маркер реакции гиперчувствительности), *ABR17* (белок из семейства PR10.4) в клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3*

* — статистически значимые различия дикого типа и соответствующих мутантных линий внутри одной временной точки (t-тест, $p < 0,05$), # — внутри генотипа, в сравнении с 2 НПИ (критерий Даннетта, $p < 0,05$), & — внутри генотипа, в сравнении с 4 НПИ (критерий Даннетта, $p < 0,05$).

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

Была проанализирована экспрессия генов *GSH1*, *GSHS* и *hGSHS* в 3-недельных неинокулированных (контрольных) корнях и клубеньках всех генотипов. Уровень мРНК гена *GSH1* в клубеньках дикого типа не изменялся по сравнению с контрольными корнями (Рисунок 13А). В клубеньках мутантных линий *sym40-1*, *sym33-2* и *sym33-3* наблюдалось достоверное увеличение экспрессии *GSH1* по сравнению с контрольными корнями и клубеньками дикого типа (Рисунок 13А).

Уровень экспрессии гена *GSHS* достоверно увеличивался в клубеньках по сравнению с контрольными корнями у всех генотипов (Рисунок 13А). Уровни мРНК *GSHS* в клубеньках *sym40-1* и *sym33-3* были достоверно выше, чем в клубеньках дикого типа. Тогда как в мутантных 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 мутантной линии *sym40-1* (Рисунок 13А).

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 (Рисунок 13А).

Был проведен анализ уровней экспрессии генов в одно- и двухнедельных корнях и клубеньках растений дикого типа (Рисунок 13Б). 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.

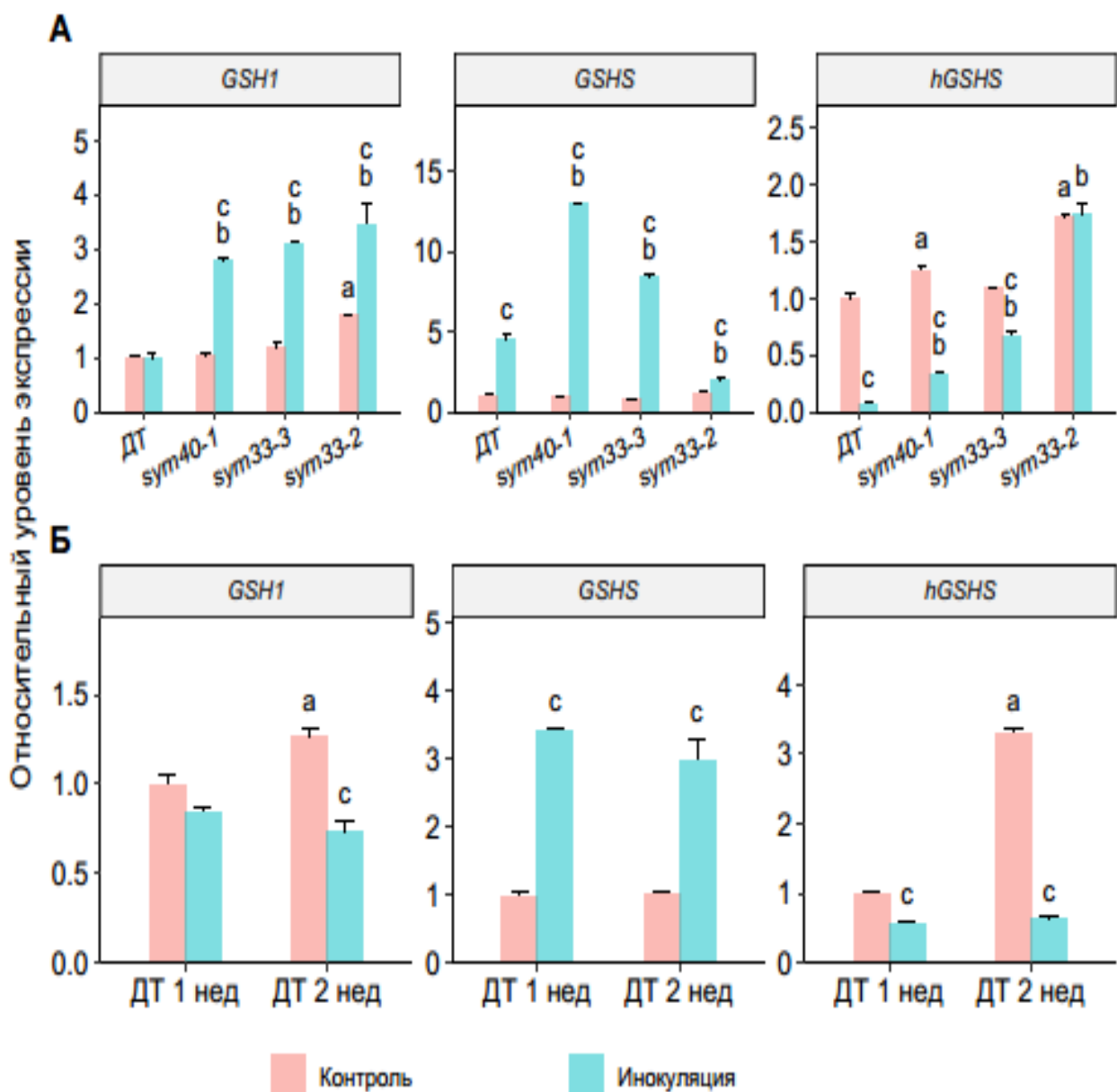


Рисунок 13. — Относительный уровень экспрессии генов биосинтеза GSH и hGSH в клубеньках и неинокулированных корнях *P. sativum* дикого типа (ДТ) и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-3* и *sym33-2*.

А – трехнедельные неинокулированные корни (контроль) и клубеньки (инокуляция). Б – однонедельные (1 нед) и двухнедельные (2 нед) неинокулированные корни (контроль) и клубеньки (инокуляция). 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.

3.3. Анализ содержания тиолов в трехнедельных 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 (Рисунок 14А–Б).

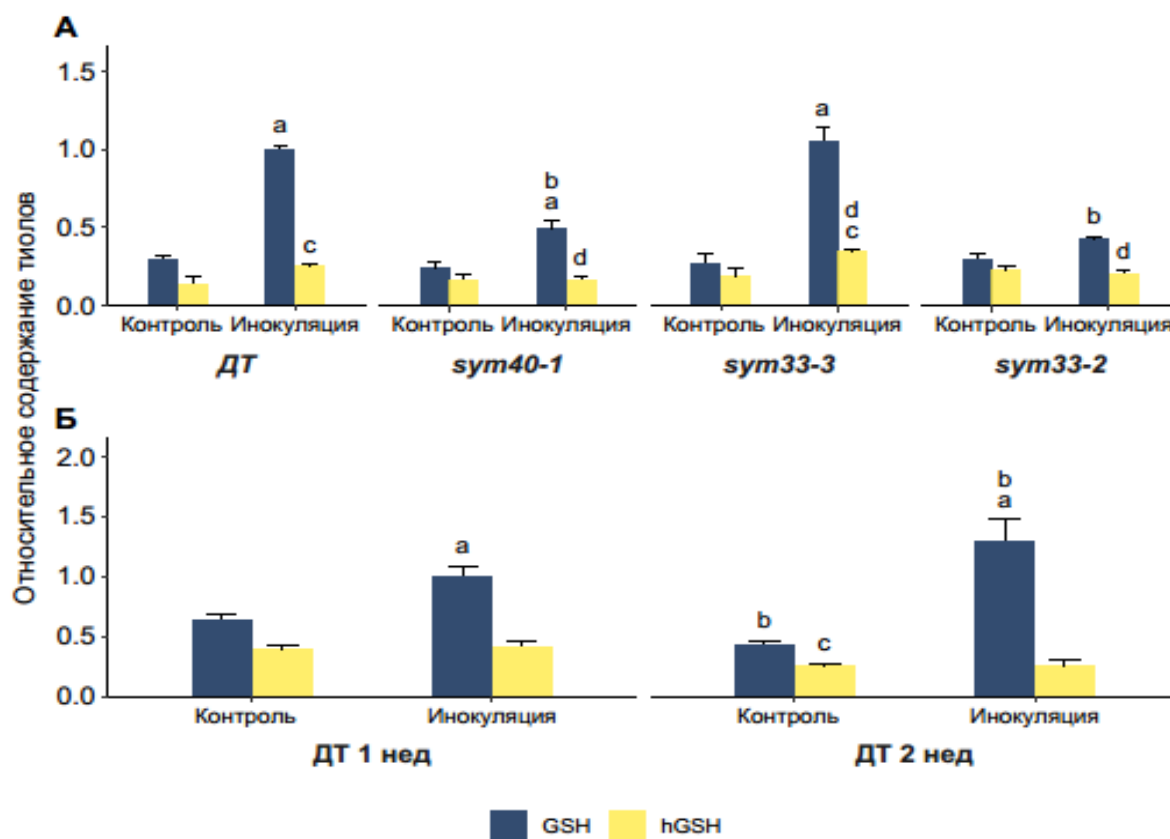


Рисунок 14. — Относительный уровень содержания тиолов в клубеньках и неинокулированных корнях *P. sativum* дикого типа (ДТ) и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-3* и *sym33-2*.

А – трехнедельные неинокулированные корни (контроль) и клубеньки (инокуляция). Б – однонедельные (1 нед) и двухнедельные (2 нед) неинокулированные корни (контроль) и клубеньки (инокуляция). Значения нормализованы А – относительно количества GSH в клубеньках дикого типа через 3 НПИ Б – количества GSH в клубеньках дикого типа через 1 НПИ. Графики демонстрируют результаты четырех независимых экспериментов. А – буквы указывают на достоверные различия ($P \leq 0,05$) **a**, в количестве GSH в клубеньках в сравнении с контрольными корнями; **b**, в количестве GSH в мутантных клубеньках в сравнении с клубеньками дикого типа; **c**, в количестве hGSH в клубеньках в сравнении с контрольными корнями; **d**, в количестве hGSH в мутантных клубеньках клубеньках в сравнении с клубеньками дикого типа. Б – **a**, в количестве GSH в клубеньках в сравнении

с контрольными корнями; **b**, в количестве GSH в двухнедельных клубеньках / корнях в сравнении с однонедельными; **c**, в количестве hGSH в двухнедельных клубеньках / корнях в сравнении с однонедельными.

Концентрация GSH и соотношение GSH : hGSH в клубеньках всех генотипов были значительно выше, чем в контрольных корнях (Рисунок 14А, Таблица 2). Однако, у мутантной линии *sum33-2* соотношение GSH : hGSH было самым низким среди клубеньков. В клубеньках *sum33-3* 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 мутантной линии *sum40-1*, количество GSH, как и hGSH, в них были ниже, чем в клубеньках дикого типа и мутантной линии *sum33-3*. Тем не менее, соотношение GSH : hGSH было таким же, как в клубеньках мутантной линии *sum33-3*, и выше, чем в клубеньках *sum33-2*. 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 мутантной линии *sum33-3* по сравнению с контрольными корнями и не изменялся в клубеньках мутантных линий *sum40-1* и *sum33-2*.

Соотношение GSH : hGSH было максимальным в клубеньках дикого типа и снижалось в мутантных клубеньках в зависимости от стадии их развития (Таблица 2). Однако каждый из изученных генотипов показал свой композиционный состав тиолов в клубеньках. Наибольшая концентрация GSH среди всех генотипов наблюдалась в клубеньках дикого типа и мутантной линии *sum33-3*, hGSH – в клубеньках *sum33-3*.

Чтобы понять, связаны ли выявленные различия в содержании тиолов со стадией развития клубенька, на которой блокированы мутанты, или с метаболическими изменениями в неэффективных клубеньках, мы также проанализировали неинокулированные корни и клубеньки растений одно- и двухнедельного возраста (Рисунок 14Б). В контрольных корнях соотношение

GSH : hGSH было сравнимо с таковым в трехнедельных контрольных корнях (Таблица 2). 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 (Таблица 2). GSH присутствовал в качестве основного тиола во всех проанализированных образцах.

Таблица 2. 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>sum40-1</i> корни 3 нед.	0,24 ± 0,03	0,16 ± 0,04	1,5
<i>sum40-1</i> клуб. 3 нед.	0,49 ± 0,05	0,17 ± 0,01	2,9
<i>sum33-3</i> корни 3 нед.	0,27 ± 0,05	0,18 ± 0,05	1,5
<i>sum33-3</i> клуб. 3 нед.	1,05 ± 0,09	0,35 ± 0,01	3,0
<i>sum33-2</i> корни 3 нед.	0,30 ± 0,04	0,22 ± 0,03	1,4
<i>sum33-2</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 в клубеньках дикого типа через 1 или 3 недели после инокуляции.

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

В клубеньках *P. sativum* дикого типа сигнал, ассоциированный с GSH, был обнаружен в цитоплазме меристематических клеток (Рисунок 15Г–Е), в цитоплазме и ядрах инфицированных клеток в зоне инфекции (Рисунок 15Ж–И), в цитоплазме и симбиосомах в клетках зоны азотфиксации (Рисунок 15К–М), в клетках паренхимы клубенька и проводящих пучках Рисунок 15А–В). Сигнал отсутствовал или был едва заметен в матриксе инфекционных нитей и капель (Рисунок 15Ж–И).

Локализация GSH была также проанализирована в симбиотических клубеньках мутантных линий *sym40-1* (Рисунок 16), *sym33-2* (Рисунок 17) и *sym33-3* (Рисунок 18). В клубеньках этих мутантов нарушено развитие инфекционных нитей (*sym33-2* и *sym33-3*), инфекционных капель и симбиосом (*sym40-1*). У мутантной линии *sym40-1* метка в основном ассоциировалась с инфицированными клетками (Рисунок 16А–В), максимум сигнала наблюдался в бактериях, вышедших из инфекционных капель (Рисунок 16Г–Е). Как и в клубеньках дикого типа, в матриксе инфекционных нитей и в гипертрофированных инфекционных каплях сигнала не наблюдалось (Рисунок 16Г–Е).

Клубеньки мутантной линии *sym33-2* демонстрируют строгий фенотип и характеризуются остановкой развития на ранних стадиях. Инфекционная нить, блокируется в клетках наружной коры корня, не проникая вглубь формирующегося клубенька. Выход бактерий из инфекционной нити не происходит (Рисунок 17А–В). Уровень сигнала, ассоциированного с GSH, был невысоким и локализовался в цитоплазме (Рисунок 17Г–Е).

На мутантных растениях *sym33-3* образуются белые клубеньки с «запертыми» инфекционными нитями без выхода бактерий (Рисунок 18А–В). В некоторых из этих инфекционных нитей, которые, вероятно, первыми колонизировали клубеньковый примордий, интенсивный сигнал был

ассоциирован с бактериями (Рисунок 18Г–Е). Так как аллель *sym33-3* характеризуются «leaky»-фенотипом, не все нити оказываются заблокированными и в некоторых клубеньках в определенных клетках происходит выход бактерий. Сигнал не был обнаружен в таких инфекционных нитях, как и у дикого типа, но наблюдался в цитоплазме и ядрах инфицированных клеток (Рисунок 18Ж–И). Интенсивный сигнал был ассоциирован с вышедшими бактериями (Рисунок 18К–М).

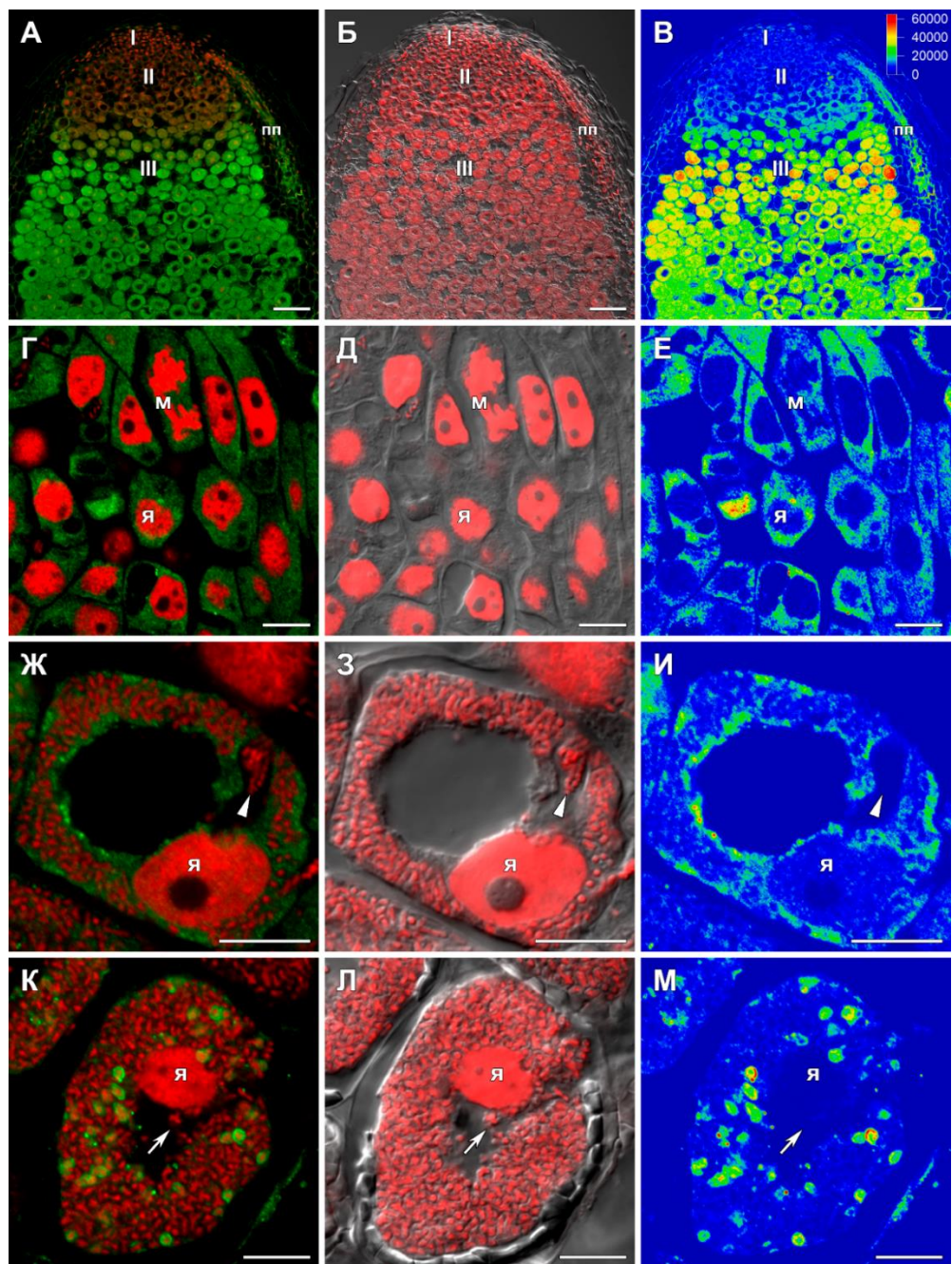


Рисунок 15. — Иммунолокализация GSH в клубеньках дикого типа через 3 недели после инокуляции

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 – иммунолокализация GSH, красный канал – ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 100 мкм (А–В), 10 мкм (Г–М).

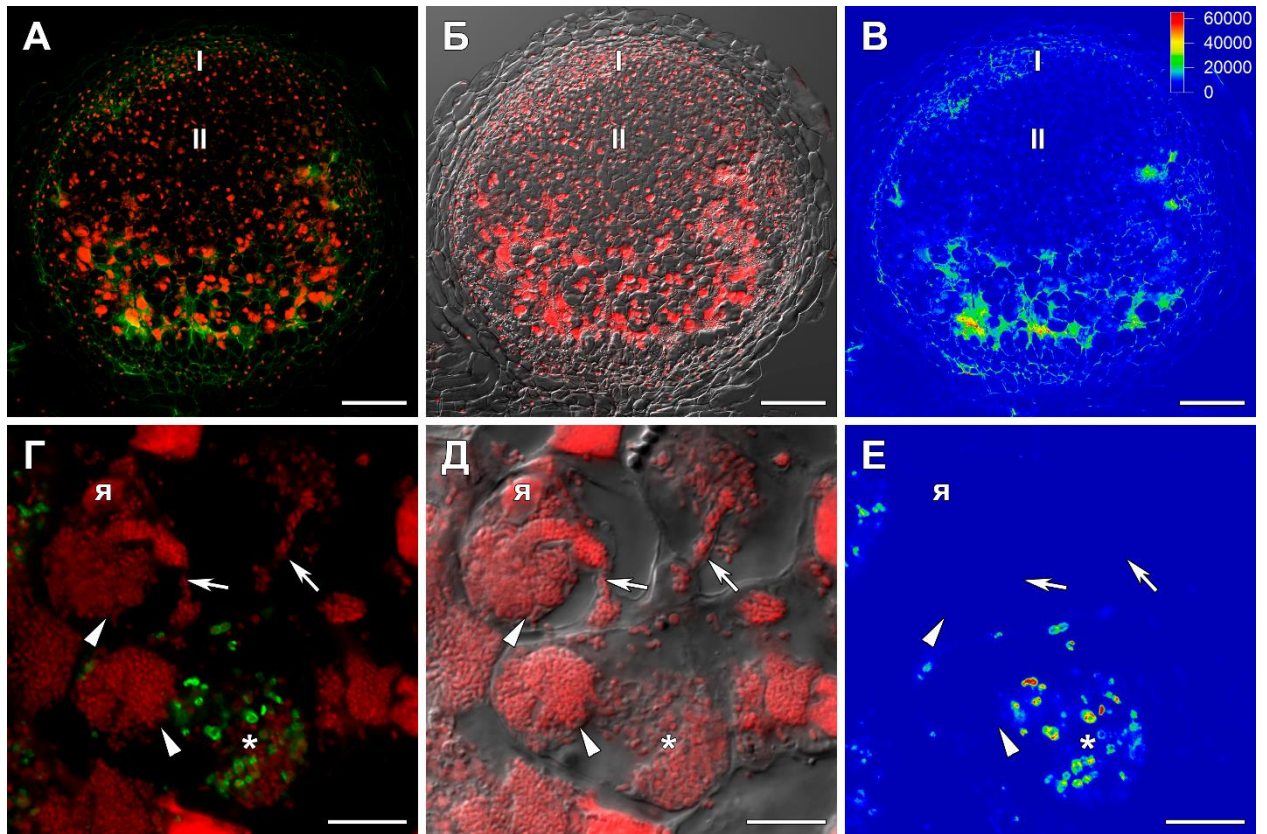


Рисунок 16. — Иммунолокализация GSH в клубеньках мутантной линии *sym40-1* через 3 недели после инокуляции

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 – иммунолокализация GSH, красный канал – ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 100 мкм (А–В), 10 мкм (Г–Е).

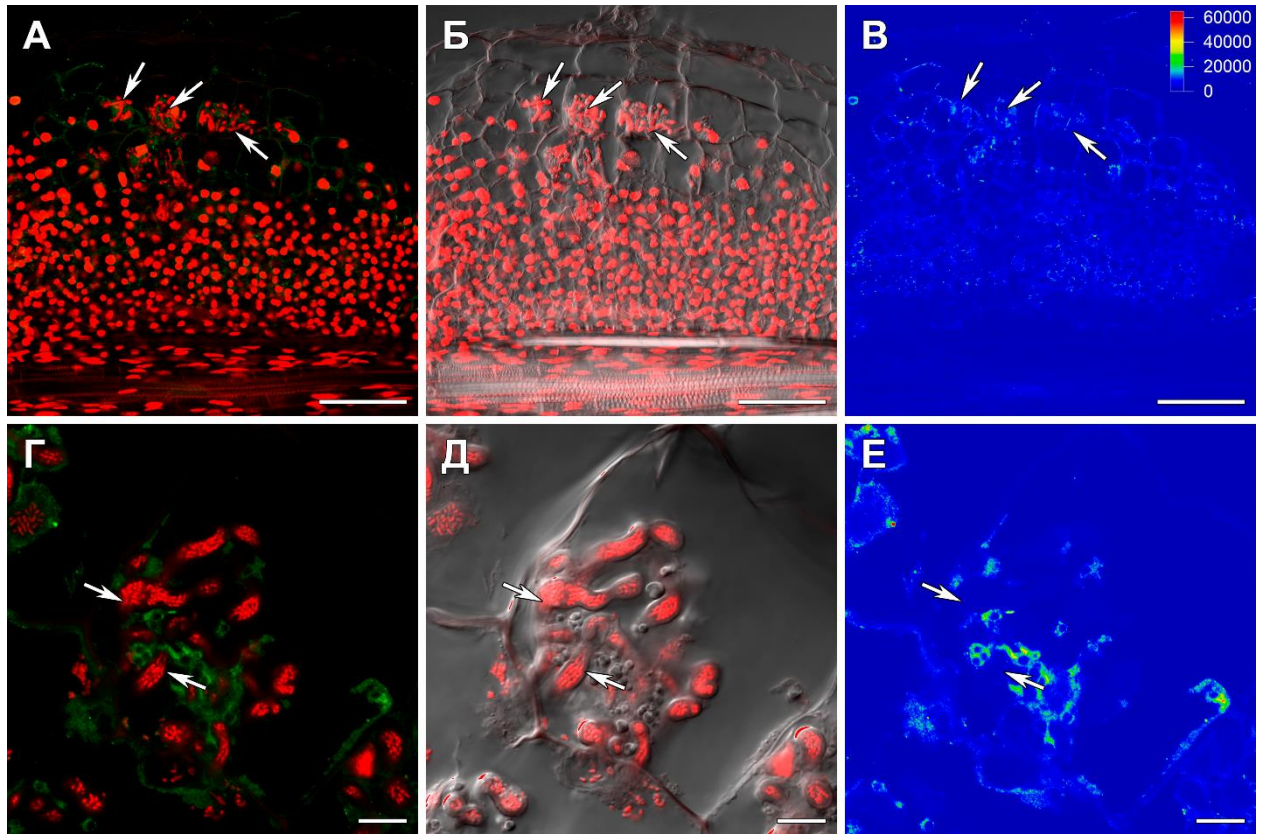


Рисунок 17. — Иммунолокализация GSH в клубеньках мутантной линии *sym33-2* через 3 недели после инокуляции

Общий вид клубенька (А–В); клетка с «запертой» инфекционной нитью (Г–Е). Стрелки указывают на инфекционные нити. 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 – иммунолокализация GSH, красный канал – ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 100 мкм (А–В), 10 мкм (Г–Е).

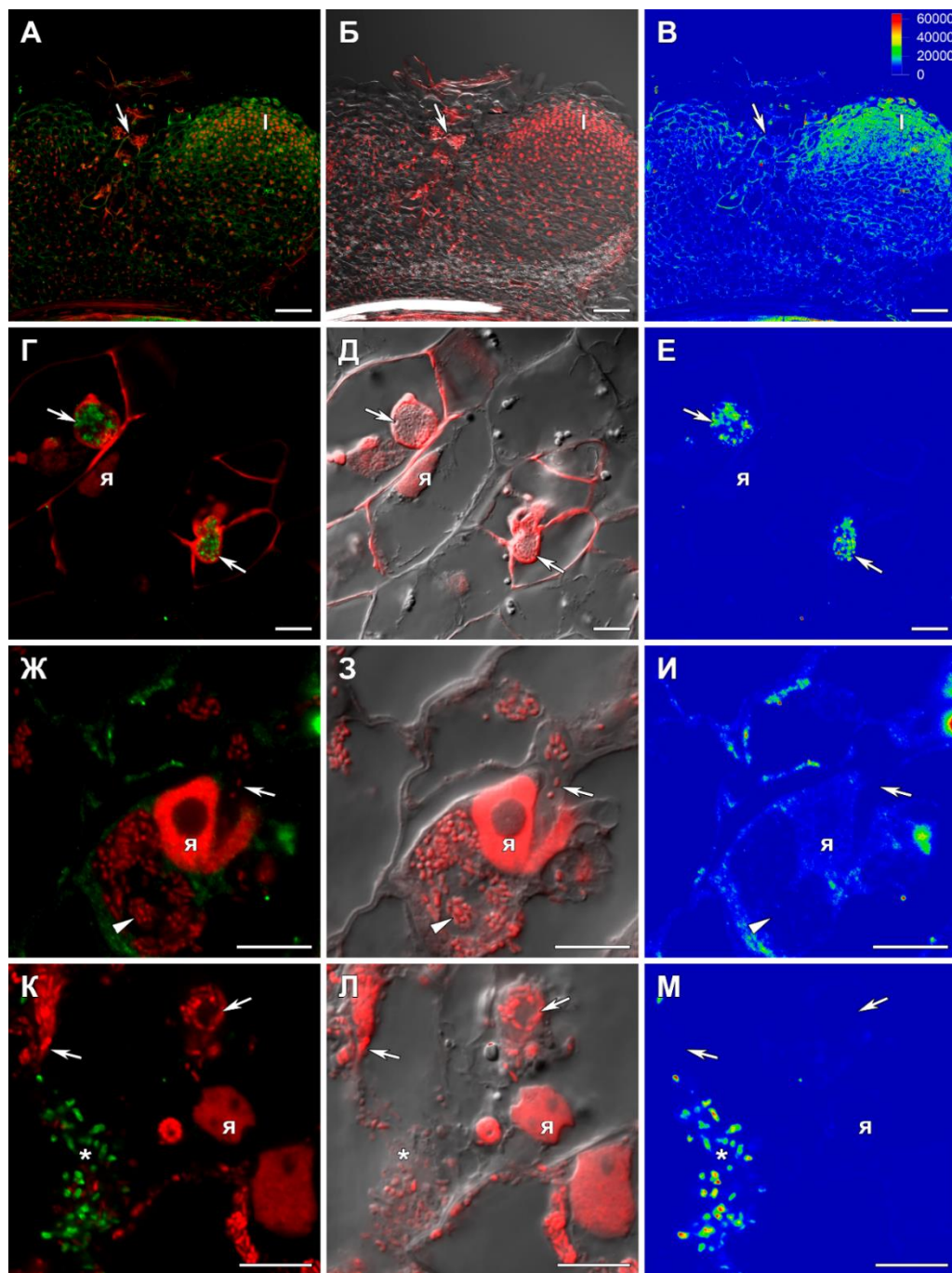


Рисунок 18. — Иммулокализация GSH в клубеньках мутантной линии *sum33-3* через 3 недели после инокуляции

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 – иммулокализация GSH, красный канал – ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 100 мкм (А–В), 10 мкм (Г–М).

3.5. Анализ влияния обработки L-бутионин-S,R-сульфоксимином на морфологию клубеньков и экспрессию генов в корнях растений дикого типа и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-2* и *sym33-3*

Для того, чтобы выявить различные роли GSH и hGSH в развитии симбиотических клубеньков и протекании защитных реакций при неэффективном симбиозе, корни растений обрабатывали 0,1 мМ раствором BSO, вызывающим дефицит GSH и hGSH. Анализ с помощью ВЭЖХ показал, что обработка BSO привела к 94% и 96% снижению количества GSH и hGSH, соответственно, в корнях с клубеньками у растений дикого типа (Таблица 3). Клубеньки на необработанных растениях дикого типа, выращенных без семян, были розовыми и имели типичную для недетерминированных клубеньков гистологическую организацию (Рисунок 19А–Б). У растений дикого типа, обработанных раствором BSO, наблюдалось снижение числа клубеньков на 46% (Таблица 3). Микроскопический анализ клубеньков, обработанных раствором BSO, выявил преждевременную деградацию симбиотических структур в основании и центральной части клубеньков, что указывает на индукцию раннего старения (Рисунок 19В–Г). Растения, обработанные растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH, имели такое же число клубеньков, что и необработанные растения, а уровни GSH и hGSH в корнях с клубеньками достигали 237% и 88% (от уровня необработанных растений), соответственно (Таблица 3). В целом в этих клубеньках не индуцировалась преждевременная деградация клеток зоны азотфиксации (Рисунок 19Д–Е), однако, в некоторых клетках были видны следы деградации (Рисунок 19Е).

Таблица 3. Количество клубеньков и относительное количество тиолов в двухнедельных корнях с клубеньками *P. sativum* дикого типа и мутантных линий, обработанных растворами 0,1 мМ L-бутионин-S,R-сульфоксими́на (BSO) и 0,5 мМ глутатиона (GSH)

	Число клубеньков*	Снижение количества клубеньков (%)	Количество GSH (%)**	Количество hGSH (%)**
ДТ	34 ± 7		100	100
ДТ +BSO	18,5 ± 3,8	46	6	4
ДТ +BSO+GSH	37 ± 5,4		237	88
<i>sym40-1</i>	25 ± 1		100	100
<i>sym40-1</i> +BSO	18,5 ± 3,5		6	1
<i>sym40-1</i> +BSO+GSH	31 ± 2,6	26	103	113
<i>sym33-3</i>	13,7± 8,5		100	100
<i>sym33-3</i> +BSO	0,3 ± 0,3	98	3	1
<i>sym33-3</i> +BSO+GSH	4,5 ± 2,5	50	37	18
<i>sym33-2</i>	2,5 ± 1,5		100	100
<i>sym33-2</i> +BSO	1,3 ± 0,7	50	4	2
<i>sym33-2</i> +BSO+GSH	2,8 ± 0,9		290	49

* – Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднего для трех повторностей.

** – Для каждого генотипа количество GSH или hGSH (нМ/мг сырого веса) в необработанных корнях с клубеньками было принято за 100%.

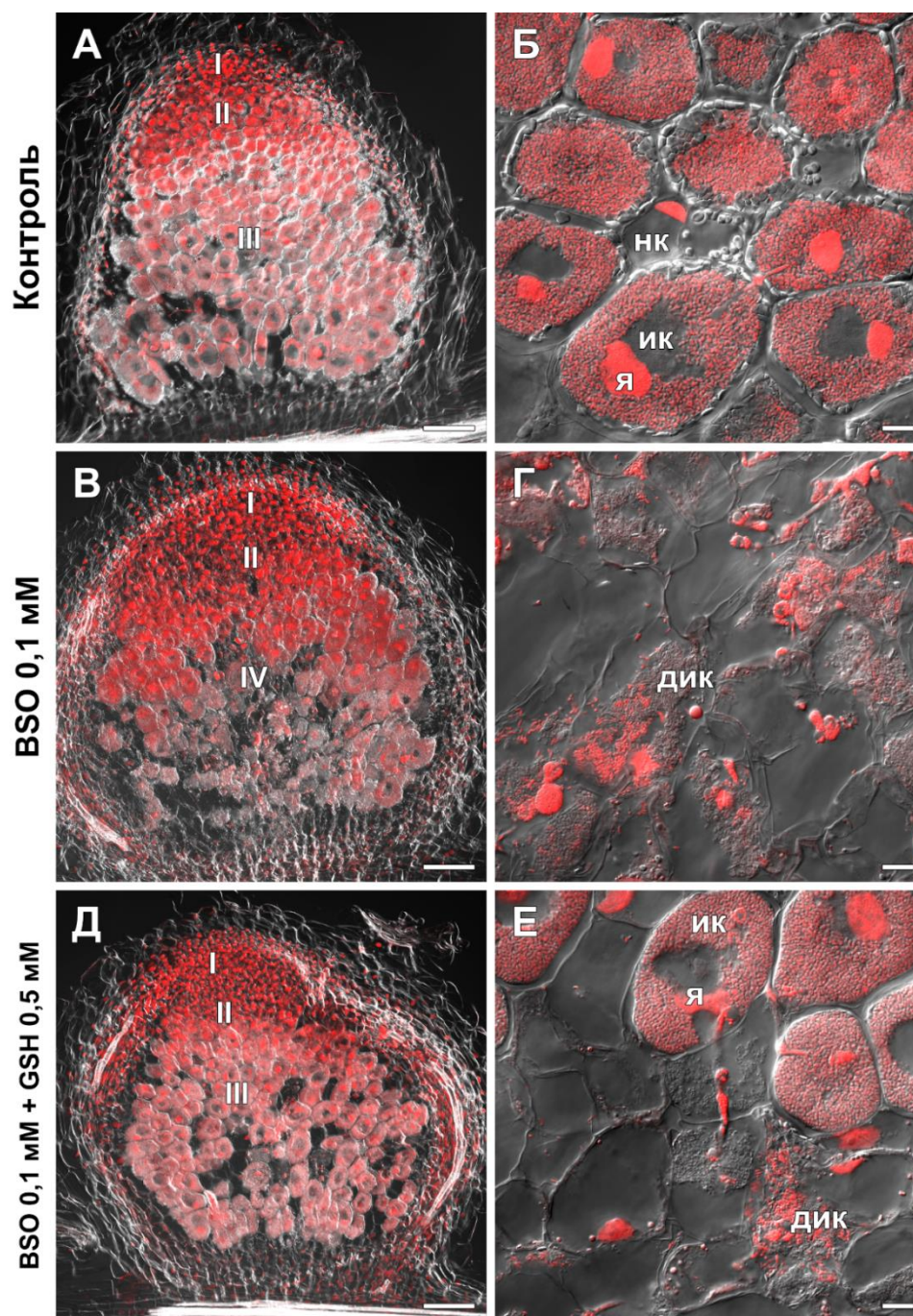


Рисунок 19. — Гистологическая организация клубеньков *P. sativum* дикого типа, обработанные растворами L-бутионин-S,R-сульфоксими́на (BSO) и глутатиона (GSH) через 2 недели после инокуляции.

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).

Снижение количества GSH и hGSH в обработанных BSO корнях с клубеньками мутантной линии по гену *sum40-1* составило 94% и 99% соответственно (Таблица 3). У растений, обработанных BSO, количество клубеньков уменьшилось только на 26%, и было таким же, как и у необработанных растений, после обработки растворами BSO и GSH (Таблица 3). В обработанных BSO клубеньках мутантной линии *sum40-1* микроскопический анализ выявил многочисленные симбиосомы, содержащие несколько бактериоидов (Рисунок 20Б), что не наблюдалось в необработанных (Рисунок 20А) или обработанных растворами BSO и GSH клубеньках (Рисунок 20В). В обработанных растворами BSO и GSH корнях с клубеньками мутантной линии *sum40-1* уровни GSH и hGSH составляли 103% и 113%, соответственно.

В корнях с клубеньками мутантной линии *sum33-3* обработка BSO приводила к снижению содержания GSH и hGSH на 97% и 99%, соответственно (Таблица 3). Снижение количества клубеньков на 98% наблюдалось на обработанных раствором BSO растениях и на 50% – на обработанных растворами BSO и GSH, по сравнению с необработанными растениями. Развитие мутантных клубеньков *sum33-3*, обработанных раствором BSO, было нарушено на ранней стадии, вероятно, из-за остановки развития меристемы, кроме того, инфекционные нити проявляли признаки частой блокировки и беспорядочной ориентации, образуя вздутия (Рисунок 20Д). Такой же эффект на развитие инфекционных нитей наблюдался в клубеньках мутантной линии *sum33-2* (данные не представлены). В корнях с клубеньками, обработанных растворами BSO и GSH, количество GSH и hGSH составляло только 38% и 18%, соответственно, от количества тиолов в необработанных растениях (Таблица 3). Однако не было выявлено отличий таких клубеньков от клубеньков на необработанных растениях (Рисунок 20Г, Е).

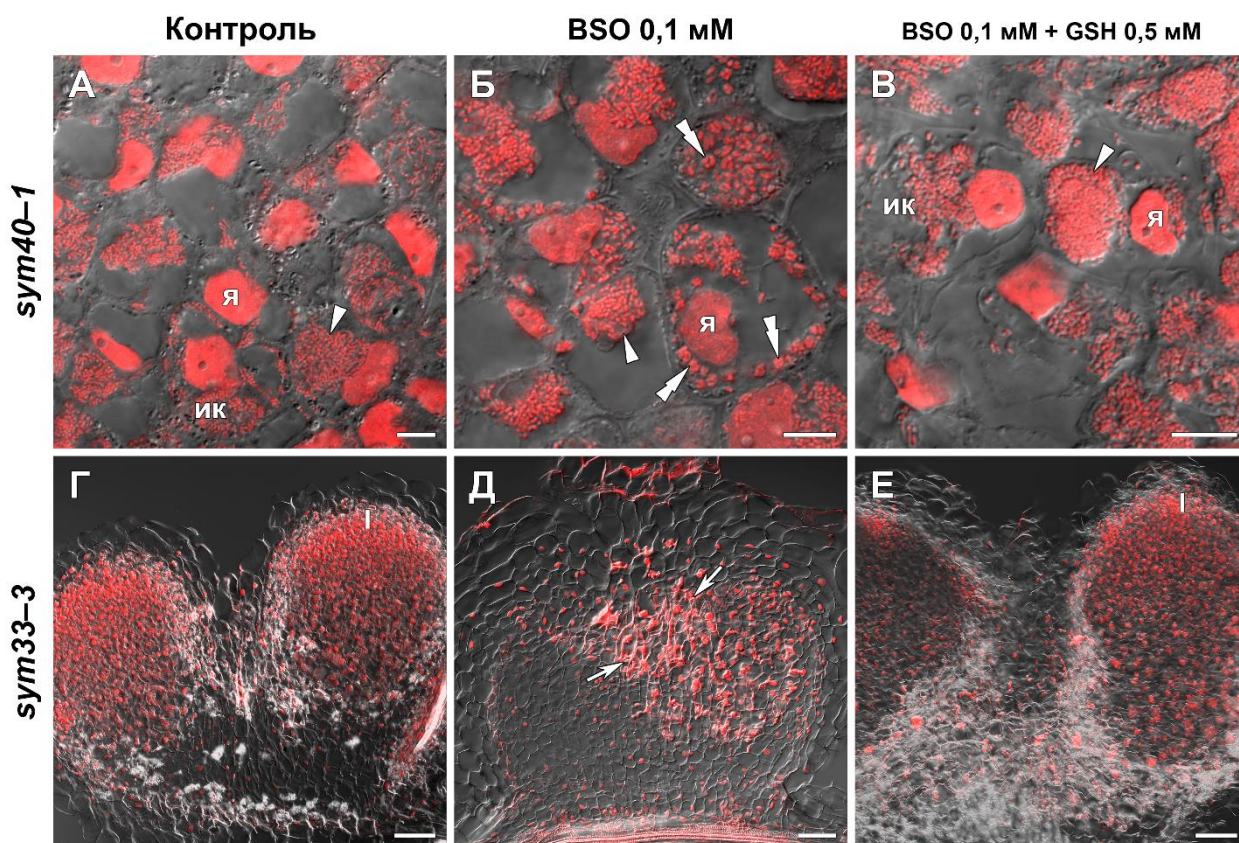


Рисунок 20. — Гистологическая организация клубеньков *P. sativum* мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3*, обработанные растворами L-бутионин-S,R-сульфоксимида (BSO) и глутатиона (GSH) через 2 недели после инокуляции.

я – ядро; ик – инфицированная клетка; наконечник стрелки указывает на инфекционные капли; двойной наконечник – на аномальные симбиосомы, содержащие несколько бактериоидов; I – меристема; стрелками обозначена зона распространения заблокированных инфекционных нитей. (А–В) клетки клубеньков мутантной линии *sym40-1*. (Г–Е) общий вид клубеньков мутантной линии *sym33-3*. (А, Г) необработанные клубеньки. (Б, Д) клубеньки на растениях, обработанных 0,1 мМ раствором BSO. (В, 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/бактериоидов. Масштабная линейка = 10 мкм (А–В), 100 мкм (Г–Е).

Было изучено влияние концентрации тиолов на экспрессию некоторых генов в корнях с клубеньками растений, необработанных, обработанных 0,1 мМ раствором BSO, или растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH. 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)* (Serova *et al.*, 2017)) (Рисунок 21).

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 *sym33-3*. Экспрессия гена *hGSHS* у этих генотипов не изменялась. В необработанных корнях с клубеньками мутантной линии *sym33-3* 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 *sym33-3* (Рисунок 21).

В корнях с клубеньками мутантной линии *sym40-1* изменения в экспрессии генов *Cyp15a*, *TPP*, *PR1*, *PR10*, *NF-YA1* были не достоверны, тогда как уровень экспрессии гена *hGSHS* увеличивался в растениях, обработанных растворами BSO и GSH. Ген *Sym40-1* кодирует фактор транскрипции *EFD*, и уровень его экспрессии был самым высоким у мутантной линии *sym40-1* по сравнению с другими генотипами, обработка растворами BSO и GSH приводила к снижению уровня экспрессии гена *EFD* (Рисунок 21).

Уровень транскриптов генов *Cyp15a* и *TPP* в обработанных раствором BSO корнях с клубеньками мутантной линии *sym33-2* по сравнению с необработанными растениями был выше, а гена *hGSHS* – ниже. Низкий уровень экспрессии генов *NF-YA1* и *EFD* не изменялся. В корнях с клубеньками мутантной линии *sym33-2*, обработанных растворами BSO и GSH, уровень экспрессии гена *PR10* был выше, чем в обработанных только раствором BSO и необработанных растениях (Рисунок 21).

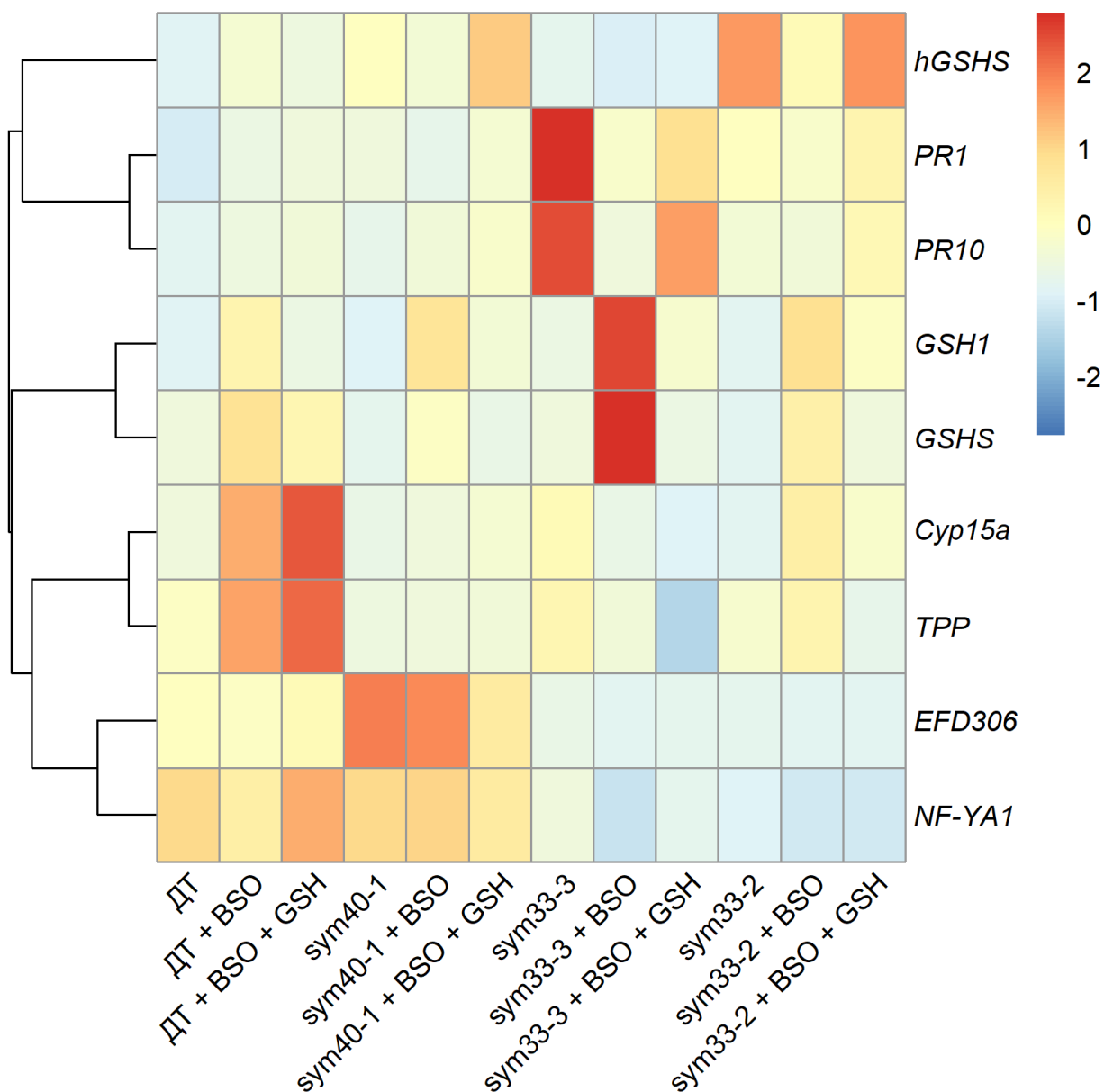


Рисунок 21. — Тепловая карта относительного уровня экспрессии генов в корнях с клубеньками *P. sativum* дикого типа (ДТ) и мутантных линий *sym40-1*, *sym33-3* и *sym33-2*, обработанных растворами L-бутионин-S,R-сульфоксимида (BSO) и глутатиона (GSH) через 2 недели после инокуляции.

Цветовая шкала отражает значения относительной экспрессии генов, преобразованные по Z для каждого гена. Тепловая карта основана на данных из Таблицы 1 Приложения. Уровни экспрессии генов сравнивали с использованием двустороннего дисперсионного анализа ($P \leq 0,05$).

3.5. Анализ влияния обработки экзогенным глутатионом на морфологию клубеньков и экспрессию генов в корнях растений 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 (Таблица 4). В то же время обработка 1 мМ раствором 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 (Таблица 4). Обработка 1 мМ раствором 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 (Таблица 4).

Таблица 4. Относительное количество тиолов в двухнедельных корнях с клубеньками *P. sativum* дикого типа и мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3*, обработанных 0,1 мМ или 1 мМ раствором глутатиона (GSH)

	GSH (%)	hGSH (%)
ДТ	100	100
ДТ + 0,1 мМ GSH	205	97
ДТ + 1 мМ GSH	322	300
<i>sym40-1</i>	100	100

<i>sym40-1</i> + 0,1 мМ GSH	92	126
<i>sym40-1</i> + 1 мМ GSH	284	260
<i>sym33-3</i>	100	100
<i>sym33-3</i> + 0,1 мМ GSH	128	66
<i>sym33-3</i> + 1 мМ GSH	157	206

Для каждого генотипа количество GSH или hGSH (нМ/мг сырого веса) в необработанных корнях с клубеньками было принято за 100%

Микроскопический анализ клубеньков дикого типа после обработки растворами GSH различных концентраций не выявил каких-либо хорошо заметных отличий от необработанных клубеньков (данные не представлены). 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 (Рисунок 22А), в отдельных клетках происходил выход бактерий (Рисунок 22Б). Однако эти клетки с хаотично расположенными бактериоидами отличались по структурной организации от инфицированных клеток дикого типа (Рисунок 22Б). Обработка корней мутантной линии *sym33-2* раствором 1 мМ GSH не изменяла степень инфекции клубенькового примордия, но приводила к чрезмерному росту и набуханию инфекционных нитей, которые проявляли признаки частой остановки и беспорядочной ориентации и формировали вздутия в наружной коре клубенька (Рисунок 22В–Г). Вздутия, образующиеся на инфекционных нитях, имели многочисленные выросты (Рисунок 22Г). Никаких видимых изменений в гистологической структуре клубеньков мутантной линии *sym33-2* после обработки корней раствором 0,1 мМ GSH по сравнению с необработанными растениями не наблюдалось.

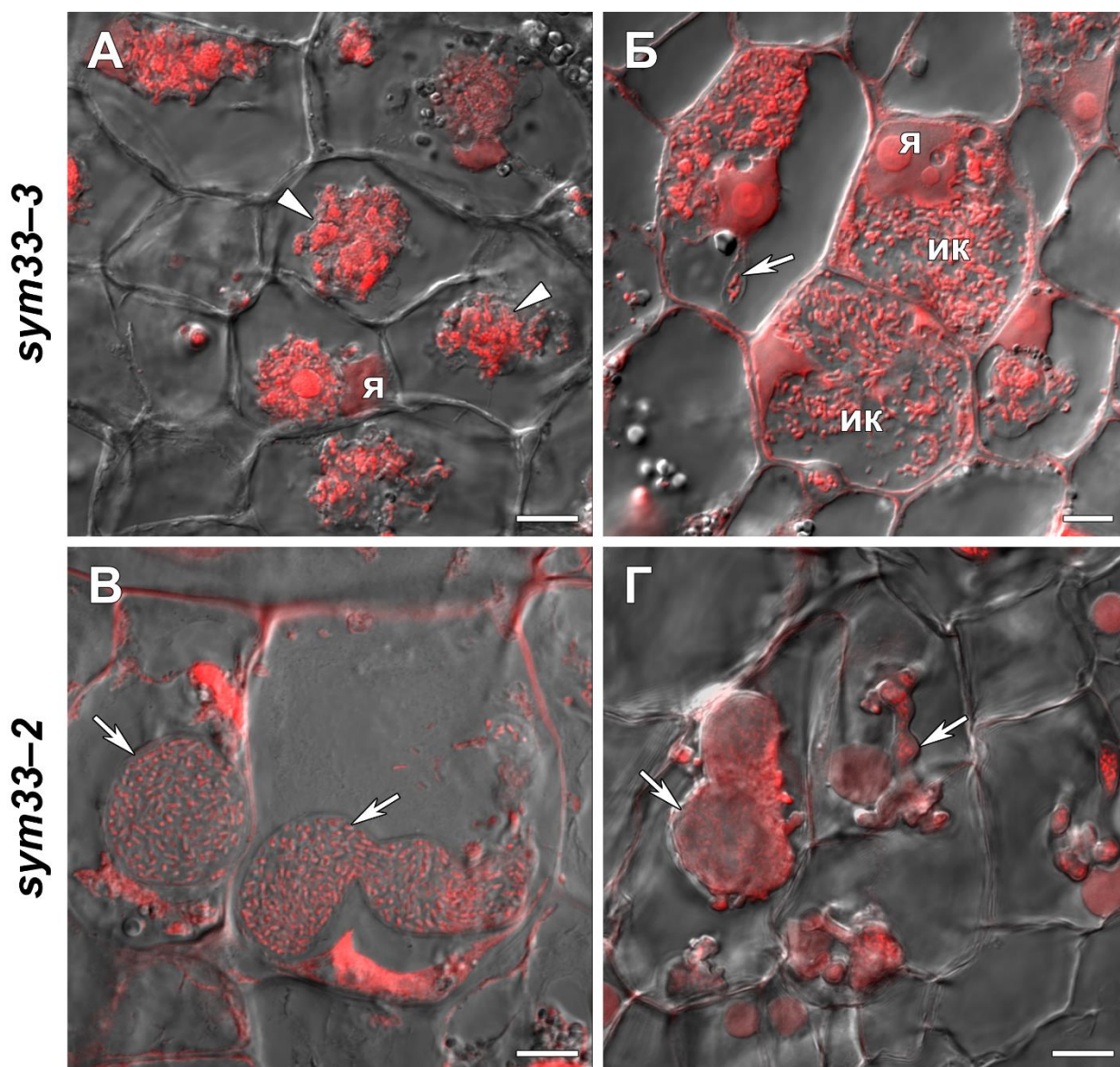


Рисунок 22. — Гистологическая организация клубеньков мутантных линий *P. sativum* *sym33-3* и *sym33-2*, обработанных 1 мМ раствором глутатиона через 2 недели после инокуляции.

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

Уровень экспрессии генов *GSH1*, *GSHS*, *hGSHS*, *EFD*, *NF-YA1*, *PR1*, *PR10*, *Sup15a* был проанализирован в корнях с клубеньками, необработанных и обработанных раствором разных концентраций GSH, через 2 недели после инокуляции (Рисунок 23).

Уровень экспрессии генов биосинтеза (h)GSH 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 (Рисунок 23).

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 (Рисунок 23). Эти данные также подтверждают двойную роль (h)GSH в регуляции развития клубеньков и защитных реакций у растений *P. sativum*.

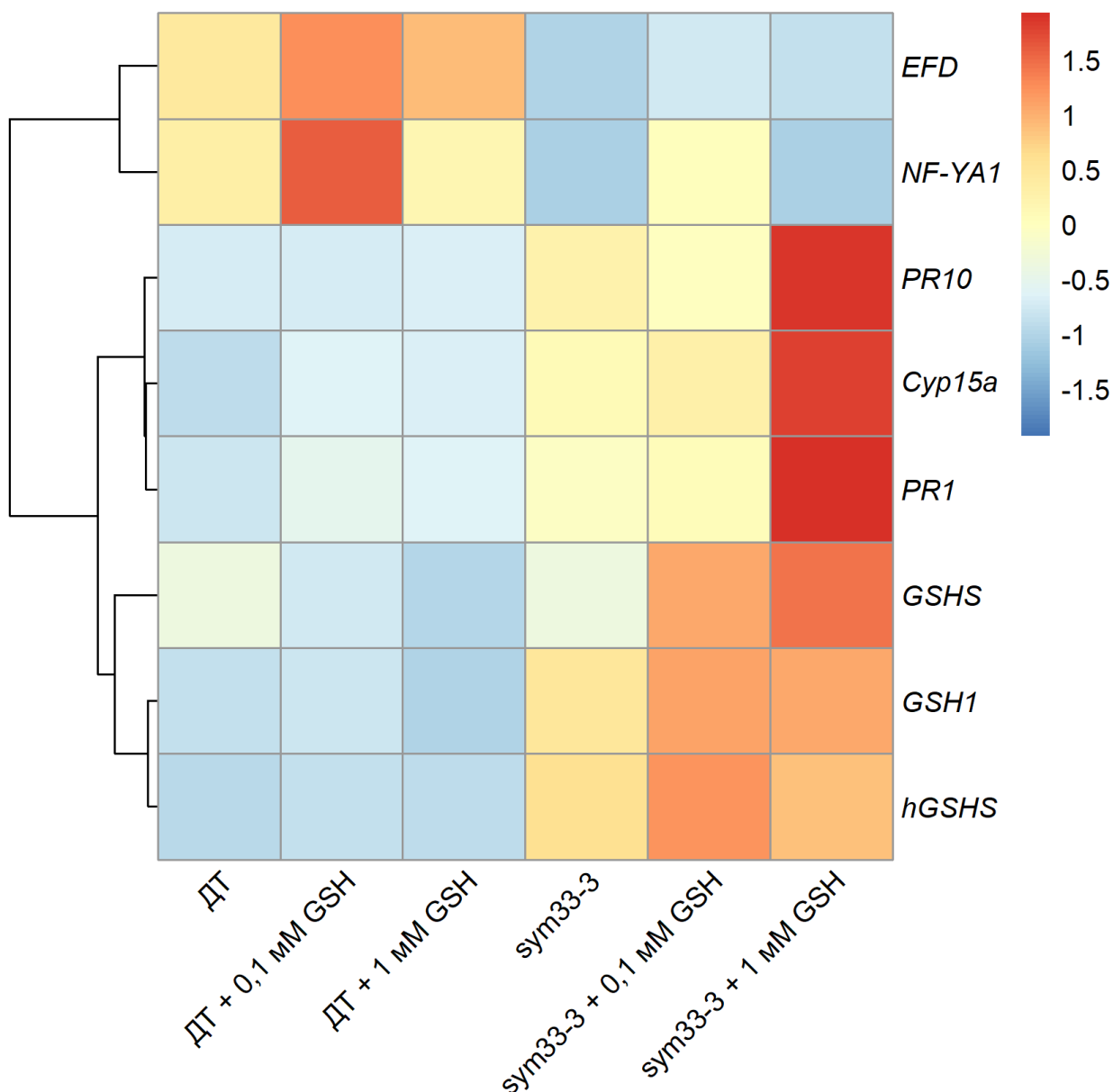


Рисунок 23. — Тепловая карта относительного уровня экспрессии генов в корнях с клубеньками *P. sativum* дикого типа и мутантной линии *sym33-3*, обработанных обработанных 0,1 мМ или 1 мМ раствором глутатиона (GSH) через 2 недели после инокуляции.

Цветовая шкала отражает значения относительной экспрессии генов, преобразованные по Z для каждого гена. Тепловая карта основана на данных из Таблицы 2 Приложения. Уровни экспрессии генов сравнивали с использованием двустороннего дисперсионного анализа ($P \leq 0,05$).

Обсуждение

В данной работе была изучена роль низкомолекулярных тиолов GSH и hGSH в процессах развития и функционирования симбиотических клубеньков *P. sativum*. Для серии растительных мутантов были показаны проявления защитных реакций, индуцированных мутациями в симбиотических генах, и участие в них GSH и hGSH. Был проанализирован биосинтез, содержание и локализация тиолов, изучено влияние ингибитора биосинтеза GSH и hGSH и экзогенного GSH на уровень экспрессии генов, вовлеченных в развитие клубеньков и в растительные защитные реакции, на гистологическую организацию и количество клубеньков.

1. Проявление защитных реакций в неэффективных симбиотических клубеньках мутантных линий, блокированных на различных стадиях развития симбиоза

Выявленные отложения суберина в эндодерме клубеньков дикого типа (Рисунок 10Б), в первую очередь необходимы растению, 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 гликопротеинов, богатых гидроксипролином (экстензинов), суберина и лигнина в клеточные стенки также является нормальной реакцией растений на инфекцию. В результате повышается механическая прочность клеточных стенок, ограничивается проникновение и распространение патогена, приток к нему питательных веществ. Компоненты стенки защищены от атаки ферментами патогена. Интенсивный уровень суберинизации в клубеньках мутантной линии *sym33-3* (Рисунок 11Е, З), очевидно, является примером защитной реакции растения, которое, таким образом, препятствует выходу бактерий в растительную цитоплазму.

Ранее было показано, что отложение полифенольных веществ характерно для мутанта *M. truncatula* TE7 в гене *MtSym1* (Benaben *et al.*, 1995). Ген *P. sativum Sym33* является ортологом гена *MtSym1* и кодирует белок IPD3, взаимодействующий с DMI3/CCaMK кальций- и кальмодулин-зависимой протиекиназой (Ovchinnikova *et al.*, 2011), что приводит к активации органогенеза клубенька (Singh *et al.*, 2014). Таким образом, мутация в гене *Sym33*, являющемся мастер-регуляторным геном клубенькообразования, приводит к восприятию растением клубеньковых бактерий не как микросимбионта, а как патогена.

Блок развития симбиотического клубенька уже на этапе дифференцировки бактериоидов, происходящий у мутанта *sym40-1*, приводит к изоляции от остального растения сразу всего клубенька путем суберинизации клубеньковой эндодермы и эндодермы, окружающей сосудистые пучки (Рисунок 11Б, Г). Отложение суберина вокруг проводящих пучков, видимо, ограничивает доступ к клубеньку воды и питательных веществ, блокируя его дальнейший рост (Tirichine *et al.*, 2000). Ранее сходный фенотип был описан для мутанта *M. truncatula Mtsymb* (Tirichine *et al.*, 2000) и растений с подавленной экспрессией гена *MtNAP2-1* (Combier *et al.*, 2006). 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). Мутации в гене *Sym40* ведут к многочисленным аномалиям в развитии клубенька, включая ранний арест меристемы (Voroshilova *et al.*, 2009), формирование гипертрофированных инфекционных капель, и преждевременную деградацию симбиотических структур (Tsyganov *et al.*, 1998; Serova *et al.*, 2018) и ярко выраженные защитные реакции (данная работа).

В исследование был включен анализ уровня транскрипции трех молекулярных маркеров защитного ответа, экспрессия которых активируется

у *P. sativum* при взаимодействии с патогенами (Die *et al.*, 2009; Reguera *et al.*, 2010): *7RA84* (пероксидаза), *HSR203J* (маркер реакции гиперчувствительности) и *ABR17* (белок из семейства PR10.4) (Рисунок 12).

Уровень экспрессии гена *7RA84*, вероятно, коррелирует с накоплением пероксида водорода в симбиотических клубеньках. Так, максимальный уровень его экспрессии в клубеньках дикого типа приходился на срок 2 НПИ. В клубеньках дикого типа в это время идет рост и ветвление инфекционных нитей, процессы инфицирования клеток и образования симбиосом. При этом пероксид водорода в инфекционных нитях недетерминированных клубеньков участвует в перекрестном связывании гликопротеинов матрикса и в его отвердевании, которое, вероятно, необходимо для дальнейшего роста нитей (Wisniewski *et al.*, 2000; Brewin, 2004). Тем не менее, пероксид водорода также является АФК 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 *sum33-3* 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 *sum40-1* 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 по сравнению с линией дикого типа. Бактероиды *R. leguminosarum* bv. *viceae* в клубеньках мутантной линии *sym40-1*, вероятно, становятся неспособны преодолеть стресс, и процесс дифференцировки идет неправильно, на что указывает наличие аномальных бактериоидов в цитоплазме инфицированных клеток клубеньков и их раннее старение (Tsyganov *et al.*, 1998).

Таким образом, симбиотические мутанты *P. sativum* демонстрируют повышенные уровни экспрессии гена *7RA84* в неэффективных клубеньках по сравнению с линией дикого типа (Риснок 12).

Растения способны прерывать распространение патогенов в результате генерирования свободных радикалов кислорода, азота, синтеза фенольных соединений и защитных белков, изменения состава клеточной стенки и программируемой клеточной смерти (Lamb, Dixon, 1997; Hérouart *et al.*, 2002; Lattanzio *et al.*, 2006). Этот набор защитных реакций называется реакцией гиперчувствительности и вовлечен также и в контроль со стороны растения за ходом инфекции и клубенькообразованием, определяющий число успешных инфекций (Vasse *et al.*, 1993; Perotto *et al.*, 1994; Gage, 2004). То есть, в отличие от патогенеза, в эффективных азотфиксирующих клубеньках уровень синтеза защитных компонентов относительно невисок, и не приводит к инактивации микроорганизмов, а лишь ограничивает их размножение и распространение.

Таким образом, относительно низкий уровень активности гена *HSR203J* в эффективных клубеньках линии дикого типа на всех сроках анализа свидетельствует о нормальном развитии и функционировании симбиотического клубенька, тогда как уровень экспрессии данного гена повышался в неэффективных клубеньках мутантных растений. Максимальный уровень экспрессии *HSR203J* наблюдался в клубеньках мутантной линии *sym40-1*, характеризующихся быстрой деградацией симбиотических структур (Рисунок 12).

ABR17, белок чувствительный к абсцизовой кислоте и принадлежащий к семейству PR10.4, синтезируется в тканях *P. sativum* в ответ на атаку патогена (Ameu *et al.*, 2008). Ранее было показано, что ABR17 аккумулируется в инфицированных клетках вокруг деградирующих бактерий в неэффективных клубеньках, развивающихся при дефиците бора (Reguera *et al.*, 2010). 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 (Рисунок 12).

Различные защитные ответы запускались в неэффективных клубеньках *P. sativum*, симбиотическими мутациями *sym40-1* и *sym33-3*, каждая из которых вызывала восприятие полезных ризобий в качестве потенциальных патогенов. Таким образом, растение-хозяин контролирует каждый этап инфекции ризобиями и в случае нарушения программы развития клубенька происходит ее переключение на защитный ответ.

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

Сравнение уровня экспрессии генов и содержания тиолов в контрольных (неинокулированных) корнях и клубеньках 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.

Ранее было показано, что в клубеньках *M. truncatula* уровень мРНК гена *GSH1* не изменялся по сравнению с корнями (Frendo *et al.*, 1999). Аналогичные результаты были получены в этом исследовании для корней и клубеньков дикого типа трехнедельного возраста (Рисунок 13А). 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*, 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 (h)GSH по всей видимости происходят после высвобождения бактерий из инфекционных капель в цитоплазму растительной клетки.

С другой стороны, уровень экспрессии генов *GSH1*, *GSHS* и *hGSHS* в клубеньках мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3* был выше, чем в клубеньках дикого типа (Рисунок 13А), что может указывать на изменение в метаболизме тиолов, связанное с защитными реакциями, проявляющимися у этих мутантов. Обработка *A. 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 в отсутствие стресса у *Atpad2-1* мутанта *A. thaliana* низкое содержание GSH не влияло на уровень экспрессии генов его биосинтеза, однако, количество транскриптов этих генов увеличивалось в ответ на патоген-оомицет *P. 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* (Рисунок 13А,

Рисунок 14А). Таким образом, в клубеньках мутантной линии *sym40-1* изменения в экспрессии гена *GSHS* могут быть вызваны окислительным стрессом и накоплением пероксида водорода, ассоциированными с развитием неэффективного симбиоза (Цыганова и др., 2009).

У *M. sativa*, где основным тиолом является hGSH, 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 неинкулированных корнях. Отношение GSH : hGSH было максимальным в клубеньках дикого типа через 2 НПИ (Таблица 2), что подтверждает важную роль GSH в функционировании меристемы клубенька и азотфиксирующих клеток и, вероятно, в высвобождении бактерий.

Все мутантные клубеньки имели свою собственную «композицию» тиолов, однако, значение GSH : hGSH коррелировало со степенью инфекции (Таблица 2). При этом минимальное содержание обоих тиолов среди клубеньков выявлялось у мутантной линии *sym40-1*, а максимальное – у мутантной линии *sym33-3* (Рисунок 14А). 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 *PR-1*, *PR-10* (Рисунок 21) и *7RA84*, *Hsr203J* и *ABR17* (Рисунок 12) в клубеньках мутантной линии *sym33-3* по сравнению с клубеньками дикого типа, суберинизацией стенок инфекционных нитей (Рисунок 11Д–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 мутантной линии *sym33-3*, был также обнаружен в мутантных клубеньках *Mtnad1 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 мутантной линии *sym40-1* прекращается после высвобождения симбиотических бактерий, неправильно воспринимаемых растением. 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 *G. 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. Локализация GSH указывает на его важную роль в формировании меристемы клубенька, процессах азотфиксации бактериоидов и реакции на стресс у ризобий

Как было показано ранее, GSH присутствует в большом количестве в зоне меристемы и в зоне инфекции в клубеньках *P. sativum* (Matamoros *et al.*, 1999). В клубеньках *M. truncatula* экспрессия гена *GSH1* была выявлена в меристеме, зоне инфекции и в дистальной части зоны азотфиксации, экспрессия гена *GSHS* – в коре и зоне азотфиксации (El Msehli *et al.*, 2011). 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 (Рисунок 15Г–Е), а также присутствовала в ядрах инфицированных клеток из зоны инфекции (Рисунок 15Ж–И), но не из зоны азотфиксации (Рисунок 15К–М). По-видимому, GSH может стимулировать меристематическую активность и повторяющиеся раунды эндоредупликации в симбиотических клубеньках. Одной из мишеней GSH в клетках меристемы и зоны инфекции клубеньков *M. truncatula* является ген *MtPIP2*, кодирующий аквапорин и участвующий в формировании меристемы и росте инфекционных нитей (Pucciariello *et al.*, 2009).

В клубеньках дикого типа наиболее интенсивное мечение было связано со зрелыми бактериоидами в клетках зоны азотфиксации (Рисунок 15К–М), что подтверждает ранее полученные данные (Matamoros *et al.*, 2013). В клубеньках невозможно определить происхождение GSH – растительное или бактериальное. Значение бактериального GSH было продемонстрировано с использованием дефектных по синтезу GSH различных ризобий (Muglia *et al.*, 2008; Taté *et al.*, 2012). Недавно было показано, что дефицит GSH у *S. 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 (Рисунок 15Ж–М). Интенсивное мечение наблюдалось только в инфекционных нитях и высвобожденных в растительную цитоплазму бактериях в клубеньках мутантных линий *sym40-1* и *sym33-3* (Рисунок 16Г–Е; Рисунок 18Г–Е, К–М). Это можно объяснить активизацией сильных защитных реакций, проявляющихся в том числе в суберинизации стенок инфекционных нитей и деградации бактерий внутри некоторых инфекционных нитей в клубеньках мутантов по гену *Sym33* (Ivanova *et al.*, 2015; Цыганова *и др.*, 2019), а также накоплением пероксида водорода вокруг ювенильных бактериоидов в клубеньках мутанта *sym40-1* (Цыганова *и др.*, 2009). Вероятно, ризобии могут использовать GSH для преодоления стресса, вызванного активацией растительных защитных реакций у этих мутантов.

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

Недостаток GSH и hGSH и обработка экзогенным GSH приводили не только к морфологическим изменениям в симбиотических клубеньках, но также к изменениям экспрессии генов.

Гены *GSH1*, *GSHS*, *Cyp15a*, *TPP*, *PR1*, *PR10* активировались в ответ на недостаток тиолов в корнях с клубеньками растений дикого типа (Рисунок 21). В то же время уровень их экспрессии достоверно не изменялся в корнях с клубеньками растений дикого типа, обработанных GSH (Рисунок 23), 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 мутантной линии *sum33-3*. В то же время, для *PR*-генов и *Cyp15a*, было показано снижение уровня экспрессии у этого мутанта в ответ на недостаток тиолов (Рисунок 21), тогда как увеличение уровня их экспрессии происходило только при обработке растений 1 мМ раствором GSH, но не 0,1 мМ раствором GSH (Рисунок 23). Это указывает на то, что концентрация GSH имеет значение и играет роль в ответе, опосредованном салициловой кислотой, по крайней мере, в корнях с клубеньками мутантной линии *sum33-3*. Двойная роль GSH, опосредованная концентрацией, подтверждается тем фактом, что экспрессия гена *NF-YA1* подавляется в ответ на недостаток тиолов в корнях с клубеньками растений дикого типа и мутантной линии *sum33-3* и активируется (вместе с геном *EFD*) в растениях обоих генотипов, обработанных раствором только 0,1 мМ раствором GSH (Рисунок 23). 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 *sum33-3* (Таблица 3, Таблица 4), что может являться косвенным доказательством участия hGSH в регуляции растительных защитных реакций.

5. Недостаток тиолов приводит к уменьшению количества клубеньков, деградации азотфиксирующих клеток, влияет на развитие симбиосом у мутантной линии *sym40-1* и активность меристемы у мутантной линии *sym33-3*

Содержание тиолов снижалось во время естественного и индуцированного старения в клубеньках *G. max* (Evans *et al.*, 1999), *P. sativum* (Groten *et al.*, 2005) и *P. vulgaris* (Loscos *et al.*, 2008). В данной работе обработка растений раствором BSO вызвала индукцию раннего старения в клубеньках, проявляющегося в деградации зоны азотфиксации в клубеньках дикого типа (Рисунок 19В–Г) и увеличением уровня экспрессии генов, связанных со старением *Cyp15a* и *TPP* (Рисунок 21). Таким образом, GSH и hGSH имеют решающее значение для функционирования азотфиксирующих клеток в клубеньках *P. sativum* дикого типа. Повышение уровня экспрессии гена цистеиновой протеазы также наблюдалось в корнях с клубеньками мутантной линии *sym33-3*, обработанных 1 мМ раствором GSH (Рисунок 23). Эти клубеньки были инфицированы в большей степени (Рисунок 22), чем клубеньки на необработанных растениях, однако это сопровождалась усилением экспрессии *PR*-генов и дезорганизацией бактериоидов в инфицированных клетках (Рисунок 23, Рисунок 22Б). Можно сделать вывод, что стимуляция инфекции в этих клубеньках вызывает также усиление защитных реакций, что впоследствии приведет к деградации инфицированных клеток, как это происходит в клубеньках мутантной линии *sym40-1*.

Блок развития меристемы и специфическое прерывание роста инфекционных нитей наблюдались в клубеньках мутантной линии *sym33-3* с недостатком GSH и hGSH (Рисунок 20Д). Эти морфологические изменения могли быть вызваны подавлением экспрессии гена *NF-YA1* (Рисунок 21), так как сходный фенотип наблюдался у мутанта *M. truncatula Mtnf-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 (Combier *et al.*, 2006). Изменение свойств клеточной стенки инфекционной нити может объяснять вздутия и неупорядоченный характер роста инфекционной нити, наблюдаемые у мутанта *Mtnf-ya1-1*, так как инфекционная нить теряет способность сдерживать размножающиеся бактерии должным образом (Laporte *et al.*, 2014). Стоит отметить, что обработка корней с клубеньками мутантов по гену *Sym33* 1 mM раствором GSH приводила к таким же нарушениям в развитии инфекционных нитей (Рисунок 22), однако уровень экспрессии гена *NF-YA1* был таким же, как у необработанных растений *sym33* (Рисунок 23). Возможным объяснением может быть способность самого GSH изменять свойства гликопротеинов типа экстензинов, локализованных в просвете инфекционных нитей (Bradley *et al.*, 1992). Такие экстензины (в настоящее время известные как арабиногалактанпротеин экстензины), окружая бактерии в инфекционных нитях, могут ограничивать их рост, а также регулировать рост самих инфекционных нитей (Wisniewski *et al.*, 2000). Таким образом, можно предположить, что GSH участвует не только в формировании и функционировании меристемы, но также и в контроле роста инфекционных нитей, влияя 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 mM раствором GSH подчеркивает неоднозначную роль этого тиола в азотфиксирующем симбиозе и тонкую настройку клеточного ответа в соответствии с фактическим содержанием GSH.

Снижение синтеза тиолов значительно уменьшало число клубеньков у всех генотипов (Таблица 3). Это совпадает с данными, полученными для *M. truncatula*, где ингибирование синтеза GSH и hGSH уменьшало число формирующихся клубеньков и боковых корней (Frendo *et al.*, 2005). Эти факты указывают на то, что уменьшение числа клубеньков у обработанных

раствором BSO растений всех генотипов могло происходить, по крайней мере, частично, из-за нарушения формирования меристемы в тканях корня. Однако на растениях, обработанных растворами 0,1 мМ BSO и 0,5 мМ GSH, число клубеньков было таким же, как и на необработанных растениях для всех генотипов, за исключением мутантной линии *sym33-3* (Таблица 3). Это означает, что в растениях мутантной линии *sym33-3* могут существовать дополнительные факторы, регулирующие число клубеньков. Клубеньки мутантной линии *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 (Рисунок 21). 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 числа клубеньков у данного мутанта.

Обработанные раствором BSO клубеньки мутантной линии *sym40-1* характеризовались образованием многочисленных симбиосом, содержащих несколько бактериоидов, окруженных общей симбиосомной мембраной (Рисунок 20Б). Ранее такой тип симбиосом был описан для клубеньков *P. sativum* мутантной линии *sym31* и клубеньков *P. sativum*, выращенных в условиях дефицита бора (Borisov *et al.*, 1997; Bolaños *et al.*, 2001). Предполагалось, что этот фенотип может быть связан с лектиноподобным гликопротеином NLEC-1. Было продемонстрировано, что две симбиосомные изоформы NLEC-1 были способны связываться с клеточной поверхностью *R.*

leguminosarum 3841 (Bolaños *et al.*, 2004). В клубеньках мутантной линии *sym31* эти изоформы были модифицированы и локализовались в цитоплазме (Dahiya *et al.*, 1998) и были не способны связываться с поверхностью ризобияльных клеток (Bolaños *et al.*, 2004), что приводило к нарушению деления симбиосом. Таким образом, анализ распределения NLEС-1 в клубеньках мутантной линии *sym40-1*, обработанных раствором BSO, заслуживает дальнейшего изучения.

Таким образом, результаты, полученные с помощью фармакологического подхода, подтвердили некоторые ранее описанные функции GSH и hGSH в развитии и функционировании клубеньков и выявили некоторые новые. 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 образовании инфекционных капель, делении симбиосом.

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 АФК, 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 этапах 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 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, обеспечивающееся

hGSH для бобовых растений, которое позволило сохранить активность гена *hGSHS* в процессе эволюции.

Хорошо известно, что регуляция синтеза GSH зависит от таких факторов, как экспрессия генов и активность ферментов. Одним из ограничивающих факторов биосинтеза является доступность цистеина. Применение экзогенного цистеина значительно увеличивает биосинтез GSH (Noji, Saito, 2002; Wirtz, Hell, 2007). Другим фактором, который может влиять на содержание GSH в определенных условиях, является глицин (Buwalda *et al.*, 1990; Noctor *et al.*, 1997). Ген *hGSHS* возник в результате дупликации гена *GSHS* после расхождения клады Старого Света. Вторая копия *GSHS* накапливала мутации, которые привели к замене двух остатков аланина лейцином и пролином в активном центре фермента, и его способности использовать β -аланин вместо глицина (Skipsey *et al.*, 2005). Было продемонстрировано, что *GSHS* растений способны продуцировать разнообразный диапазон гомологов GSH в зависимости от доступности акцептора ацила. Это предполагает, что природа тиолтрипептидов может определяться доступностью С-концевых аминокислот в определенных компартментах. Таким образом, можно предположить, что регуляция синтеза hGSH в клетках растений также может зависеть от доступности β -аланина. Сигнальные молекулы или факторы стресса, которые прямо или косвенно регулируют накопление β -аланина, также могут индуцировать экспрессию гена *hGSHS* или активность фермента hGSHS. Ген, кодирующий фермент пропионатного пути синтеза β -аланина наиболее активно экспрессируется в корнях *A. thaliana* (Schmid *et al.*, 2005; Parthasarathy *et al.*, 2019). В базальных кладах бобовых синтез hGSH также обычно ограничен корнями растений, что позволяет предположить, что именно в корнях у hGSHS появилась возможность для функционирования и обеспечения селективного преимущества для некоторых видов.

β -аланин, не являющийся протеиногенной кислотой, накапливается в виде молекулы стрессового ответа, участвующей в защите растений от

экстремальных температур, гипоксии, засухи, шока тяжелых металлов и некоторых биотических стрессов. Он участвует в биосинтезе лигнина и производстве этилена у некоторых видов (Broeckling *et al.*, 2004). hGSH также участвует в преодолении растением этих биотических и абиотических стрессов: засухи (Cruz de Carvalho *et al.*, 2010), шока тяжелых металлов (Кулаева, Цыганов, 2014), взаимодействия с паразитическими нематодами (Baldacci-Cresp *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2020). В данном исследовании была показана его роль в симбиотических отношениях с ризобиями.

Таким образом, можно предположить, что появившийся в процессе эволюции бобовых растений гомолог GSH – hGSH, взял на себя часть функций β -аланина в ответе растений на стресс, а также часть функций GSH, создавая возможность для более тонкого контроля процессов.

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 неинокулированных 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.

Список литературы

1. Кулаева О.А., Цыганов В.Е. Анализ изменения экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты детоксикации кадмия в симбиотических клубеньках гороха // Экологическая генетика. — 2014. — Т. 12, № 2. — С. 13-22.
2. Овцына А., Тихонович И. Структура, функции и возможность практического применения сигнальных молекул, инициирующих развитие бобово-ризобияльного симбиоза // Экологическая генетика. — 2004. — Т. 2, № 3.
3. Цыганов В. Е., Ворошилова В. А., Розов С. М., Борисов А. Ю., Тихонович И. А. Новая серия симбиотических мутантов гороха, индуцированных на линии SGE // Экологическая генетика. — Т. 10., № 1. — С. 19-26.
4. Цыганов В.Е., Селиверстова Е.В., Ворошилова В.А., Цыганова А.В., Павлова З.Б., Лебский В.К., Борисов А.Ю., Бревин Н.Д., Тихонович И.А. Анализ двойных мутантных линий для определения последовательности функционирования генов гороха (*Pisum sativum* L.) *Sym13*, *Sym33* и *Sym40* во время развития симбиотического клубенька // Экологическая генетика. — 2010. — Т. 8, № 2. — С. 3-8.
5. Цыганова А.В., Иванова К.А., Цыганов В.Е. Гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков мутанта гороха (*Pisum sativum*) SGEFix⁻⁵ по гену *Sym33*, кодирующему транскрипционный фактор PsCYCLOPS/PsIPD3 // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17, № 1. — С. 65-70.
6. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. II. Салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты (обзор) // Сельскохозяйственная биология. — 2018. — Т. 53, № 1. — С. 3-14.
7. Цыганова А.В., Цыганов В.Е., Борисов А.Ю., Тихонович И.А., Бревин Н. Дж. Сравнительный цитохимический анализ распределения перекиси водорода у неэффективного мутанта гороха SGEFix⁻¹ (*sym40*) и исходной линии SGE // Экологическая генетика. — 2009. — Т. 7, № 3. — С. 3-9.
8. 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.
9. Albus U., Baier R., Holst O., Pühler A., Niehaus K. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides // New Phytologist. — 2001. — V. 151, № 3. — P. 597-606.
10. Alesandrini F., Mathis R., Van de Sype G., Hérouart D., Puppo A. Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule

- development and senescence // *New Phytologist*. — 2003. — V. 158, № 1. — P. 131-138.
11. Amey R.C., Schleicher T., Slinn J., Lewis M., Macdonald H., Neill S.J., Spencer-Phillips P.T.N. Proteomic analysis of a compatible interaction between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae* // *European Journal of Plant Pathology*. — 2008. — V. 122, № 1. — P. 41-55.
 12. Amor B.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E., Maillet F., Penmetsa R.V., Cook D., Long S.R., Dénarié J., Gough C. The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation // *The Plant Journal*. — 2003. — V. 34, № 4. — P. 495-506.
 13. Ané J.-M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R.V., Oldroyd G.E.D., Ayax C., Lévy J., Debelle F., Baek J.-M., Kalo P., Rosenberg C., Roe B.A., Long S.R., Dénarié J., Cook D.R. *Medicago truncatula DM11* required for bacterial and fungal symbioses in legumes // *Science*. — 2004. — V. 303, № 5662. — P. 1364-1367.
 14. Arrighi J.-F., Barre A., Amor B.B., Bersoult A., Soriano L.C., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet E.-P., Ghérardi M., Huguet T., Geurts R., Denarie J., Rouge P., Gough C. The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes // *Plant Physiology*. — 2006. — V. 142, № 1. — P. 265-279.
 15. Azarakhsh M., Kirienko A.N., Zhukov V.A., Lebedeva M.A., Dolgikh E.A., Lutova L.A. Knotted1-like homeobox 3: a new regulator of symbiotic nodule development // *Journal of Experimental Botany*. — 2015. — V. 66, № 22. — P. 7181-7195.
 16. Backer R., Naidoo S., Van den Berg N. The *Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1* (*NPR1*) and related family: mechanistic insights in plant disease resistance // *Frontiers in plant science*. — 2019. — V. 10, — P. 102.
 17. Baldacci-Cresp F., Chang C., Maucourt M., Deborde C., Hopkins J., Lecomte P., Bernillon S., Brouquisse R., Moing A., Abad P., Hérouart D., Puppo A., Favery B., Frendo P. (Homo)glutathione deficiency impairs root-knot nematode development in *Medicago truncatula* // *PLOS Pathogens*. — 2012. — V. 8, № 1. — P. e1002471.
 18. Ball L., Accotto G.-P., Bechtold U., Creissen G., Funck D., Jimenez A., Kular B., Leyland N., Mejia-Carranza J., Reynolds H., Karpinski S., Mullineaux P.M. Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. — 2004. — V. 16, № 9. — P. 2448-2462.
 19. Bardarov K., Naydenov M., Djingova R. HPLC–HRMS method for fast phytochelatin determination in plants. Application to analysis of *Clinopodium vulgare* L // *Talanta*. — 2015. — V. 142. — P. 20-27.

20. Becana M., Matamoros M.A., Udvardi M., Dalton D.A. Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules // *New Phytologist*. — 2010. — V. 188, № 4. — P. 960-976.
21. Benaben V., Duc G., Lefebvre V., Huguet T. TE7, an inefficient symbiotic mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong // *Plant Physiology*. — 1995. — V. 107, № 1. — P. 53-62.
22. Benezech C., Doudement M., Gourion B. Legumes tolerance to rhizobia is not always observed and not always deserved // *Cellular Microbiology*. — 2020. — V. 22, № 1. — P. e13124.
23. Beringer J.E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* // *Journal of General Microbiology*. — 1974. — V. 84, № 1. — P. 188-198.
24. Berrabah F., Bourcy M., Eschstruth A., Cayrel A., Guefrachi I., Mergaert P., Wen J., Jean V., Mysore K.S., Gourion B., Ratet P. A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis // *New Phytologist*. — 2014. — V. 203, № 4. — P. 1305-1314.
25. Berrabah F., Ratet P., Gourion B. Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia // *Journal of Experimental Botany*. — 2015. — V. 66, № 7. — P. 1977-1985.
26. Berrada H., Fikri-Benbrahim K. Taxonomy of the *Rhizobia*: Current Perspectives // *British Microbiology Research Journal*. — 2014. — V. 4. — P. 616-639.
27. Bolaños L., Cebrián A., Redondo-Nieto M., Rivilla R., Bonilla I. Lectin-like glycoprotein PsNLEC-1 is not correctly glycosylated and targeted in boron-deficient pea nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 5. — P. 663-670.
28. Bolaños L., Redondo-Nieto M., Rivilla R., Brewin N.J., Bonilla I. Cell surface interactions of *Rhizobium* bacteroids and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2004. — V. 17, № 2. — P. 216-223.
29. Boller T., Felix G. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors // *Annual Review of Plant Biology*. — 2009. — V. 60, № 1. — P. 379-406.
30. Borisov A.Y., Rozov S.M., Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. Sequential functioning of *Sym-13* and *Sym-31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // *Molecular and General Genetics*. — 1997. — V. 254, № 5. — P. 592-598.
31. Böttcher C., Westphal L., Schmotz C., Prade E., Scheel D., Glawischnig E. The multifunctional enzyme CYP71B15 (Phytoalexin deficient3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Cell*. — 2009. — V. 21, № 6. — P. 1830-1845.

32. Bourcy M., Brocard L., Pislariu C.I., Cosson V., Mergaert P., Tadege M., Mysore K.S., Udvardi M.K., Gourion B., Ratet P. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions // *New Phytologist*. — 2013. — V. 197, № 4. — P. 1250-1261.
33. Bradley D.J., Kjellbom P., Lamb C.J. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response // *Cell*. — 1992. — V. 70, № 1. — P. 21-30.
34. Brewin N.J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis // *Critical Reviews in Plant Sciences*. — 2004. — V. 23, № 4. — P. 293-316.
35. Broeckling C.D., Huhman D.V., Farag M.A., Smith J.T., May G.D., Mendes P., Dixon R.A., Sumner L.W. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism // *Journal of Experimental Botany*. — 2004. — V. 56, № 410. — P. 323-336.
36. Bryan J.A., Berlyn G.P., Gordon J.C. Toward a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the *Leguminosae* // *Current Issues in Symbiotic Nitrogen Fixation* / Elkan G. H., Upchurch R. G. — Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. — P. 151-159.
37. Buwalda F., Stulen I., De Kok L.J., Kuiper P.J.C. Cysteine, γ -glutamyl-cysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. II. Glutathione accumulation in detached leaves exposed to H₂S in the absence of light is stimulated by the supply of glycine to the petiole // *Physiologia Plantarum*. — 1990. — V. 80, № 2. — P. 196-204.
38. Cairns N.G., Pasternak M., Wachter A., Cobbett C.S., Meyer A.J. Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo // *Plant Physiology*. — 2006. — V. 141, № 2. — P. 446-455.
39. Campbell G.R.O., Sharypova L.A., Scheidle H., Jones K.M., Niehaus K., Becker A., Walker G.C. Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants // *Journal of Bacteriology*. — 2003. — V. 185, № 13. — P. 3853-3862.
40. Cao Y., Halane M.K., Gassmann W., Stacey G. The role of plant innate immunity in the legume-*Rhizobium* symbiosis // *Annual Review of Plant Biology*. — 2017. — V. 68, № 1. — P. 535-561.
41. Cao Y., Liang Y., Tanaka K., Nguyen C.T., Jedrzejczak R.P., Joachimiak A., Stacey G. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1 // *eLife*. — 2014. — P. Medium: ED; Size: 19 p.
42. Cao Y., Miller S.S., Dornbusch M.R., Castle S.S., Lenz P., Ferguson J., Sadowsky M.J., Nelson M.S., Klatt C., Samac D.A. Widespread occurrence of *Sinorhizobium meliloti* strains with a type IV secretion system // *Symbiosis*. — 2018. — V. 75, № 2. — P. 81-91.
43. Capela D., Filipe C., Bobik C., Batut J., Bruand C. *Sinorhizobium meliloti* differentiation during symbiosis with alfalfa: A transcriptomic dissection //

- Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2006. — V. 19, № 4. — P. 363-372.
44. Capoen W., Sun J., Wysham D., Otegui M.S., Venkateshwaran M., Hirsch S., Miwa H., Downie J.A., Morris R.J., Ané J.-M., Oldroyd G.E.D. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2011. — V. 108, № 34. — P. 14348-14353.
45. Cárdenas L., Quinto C. Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors // Plant Signaling and Behavior. — 2008. — V. 3, № 12. — P. 1101-1102.
46. Catalano C.M., Czymmek K.J., Gann J.G., Sherrier D.J. *Medicago truncatula* syntaxin SYP132 defines the symbiosome membrane and infection droplet membrane in root nodules // Planta. — 2007. — V. 225, № 3. — P. 541-550.
47. Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R.V., Journet E.-P., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C., Dénarié J. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway // The Plant Cell. — 2000. — V. 12, № 9. — P. 1647-1665.
48. Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W., Langebartels C., Sandermann H., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1998. — V. 95, № 10. — P. 5818-5823.
49. Chang C., Damiani I., Puppo A., Frenedo P. Redox Changes during the *Legume-Rhizobium* symbiosis // Molecular Plant. — 2009. — V. 2, № 3. — P. 370-377.
50. Chaouch S., Queval G., Vanderauwera S., Mhamdi A., Vandenabeele M., Langlois-Meurinne M., Van Breusegem F., Saindrenan P., Noctor G. Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by isochorismate synthase1 in a daylength-related manner // Plant Physiology. — 2010. — V. 153, № 4. — P. 1692-1705.
51. Charpentier M., Bredemeier R., Wanner G., Takeda N., Schleiff E., Parniske M. *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis // The Plant Cell. — 2008. — V. 20, № 12. — P. 3467-3479.
52. Charpentier M., Sun J., Martins T.V., Radhakrishnan G.V., Findlay K., Soumpourou E., Thouin J., Véry A.-A., Sanders D., Morris R.J., Oldroyd G.E.D. Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations // Science. — 2016. — V. 352, № 6289. — P. 1102-1105.
53. Chen R., Bhagwat A.A., Yaklich R., Keister D.L. Characterization of *ndvD*, the third gene involved in the synthesis of cyclic β -(13),(16)-D-glucans in *Bradyrhizobium japonicum* // Canadian Journal of Microbiology. — 2002. — V. 48, № 11. — P. 1008-1016.

54. Chen T., Duan L., Zhou B., Yu H., Zhu H., Cao Y., Zhang Z. Interplay of pathogen-induced defense responses and symbiotic establishment in *Medicago truncatula* // *Frontiers in Microbiology*. — 2017. — V. 8, № 973.
55. Chen X., Li S., Zhao X., Zhu X., Wang Y., Xuan Y., Liu X., Fan H., Chen L., Duan Y. Modulation of (homo)glutathione metabolism and H₂O₂ accumulation during soybean cyst nematode infections in susceptible and resistant soybean cultivars // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — V. 21, № 2. — P. 388.
56. Cheng H.-P., Walker G.C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti* // *Journal of Bacteriology*. — 1998. — V. 180, № 19. — P. 5183-5191.
57. Clemens S. Evolution and function of phytochelatin synthases // *Journal of Plant Physiology*. — 2006. — V. 163, № 3. — P. 319-332.
58. Clemente M.R., Bustos-Sanmamed P., Loscos J., James E.K., Pérez-Rontomé C., Navascués J., Gay M., Becana M. Thiol synthetases of legumes: immunogold localization and differential gene regulation by phytohormones // *Journal of Experimental Botany*. — 2012. — V. 63, № 10. — P. 3923-3934.
59. Colville L., Blanco Sáez C.M., Lewis G.P., Kranner I. The distribution of glutathione and homoglutathione in leaf, root and seed tissue of 73 species across the three sub-families of the Leguminosae // *Phytochemistry*. — 2015. — V. 115. — P. 175-183.
60. Combier J.-P., Frugier F., de Billy F., Boualem A., El-Yahyaoui F., Moreau S., Vernié T., Ott T., Gamas P., Crespi M., Niebel A. *MtHAP2-1* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula* // *Genes and Development*. — 2006. — V. 20, № 22. — P. 3084-3088.
61. Cooper J.E. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection // *Advances in Botanical Research*. — 2004. — V. 41. — P. 1-62.
62. Creissen G., Firmin J., Fryer M., Kular B., Leyland N., Reynolds H., Pastori G., Wellburn F., Baker N., Wellburn A., Mullineaux P. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress // *The Plant Cell*. — 1999. — V. 11, № 7. — P. 1277-1291.
63. Crook M.B., Lindsay D.P., Biggs M.B., Bentley J.S., Price J.C., Clement S.C., Clement M.J., Long S.R., Griffiths J.S. Rhizobial plasmids that cause impaired symbiotic nitrogen fixation and enhanced host invasion // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2012. — V. 25, № 8. — P. 1026-1033.
64. Cruz de Carvalho M.H., Brunet J., Bazin J., Kranner I., Arcy-Lameta A.d., Zuily-Fodil Y., Contour-Ansel D. Homoglutathione synthetase and glutathione synthetase in drought-stressed cowpea leaves: Expression patterns and accumulation of low-molecular-weight thiols // *Journal of Plant Physiology*. — 2010. — V. 167, № 6. — P. 480-487.

65. Cummins I., Dixon D.P., Freitag-Pohl S., Skipsey M., Edwards R. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification // *Drug Metabolism Reviews*. — 2011. — V. 43, № 2. — P. 266-280.
66. D'Antuono A.L., Casabuono A., Couto A., Ugalde R.A., Lepek V.C. Nodule Development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2005. — V. 18, № 5. — P. 446-457.
67. D'Haese W., De Rycke R., Mathis R., Goormachtig S., Pagnotta S., Verplancke C., Capoen W., Holsters M. Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2003. — V. 100, № 20. — P. 11789-11794.
68. D'Haese W., Holsters M. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity // *Trends in Microbiology*. — 2004. — V. 12, № 12. — P. 555-561.
69. D'Haese W., Holsters M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development // *Glycobiology*. — 2002. — V. 12, № 6. — P. 79R-105R.
70. Dahiya P., Sherrier D.J., Kardailsky I.V., Borisov A.Y., Brewin N.J. Symbiotic gene *Sym31* controls the presence of a lectinlike glycoprotein in the symbiosome compartment of nitrogen-fixing pea nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 1998. — V. 11, № 9. — P. 915-923.
71. Dalton D.A., Langeberg L., Treneman N.C. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules // *Physiologia Plantarum*. — 1993. — V. 87, № 3. — P. 365-370.
72. Damiani I., Pauly N., Puppo A., Brouquisse R., Boscari A. Reactive oxygen species and nitric oxide control early steps of the *Legume – Rhizobium* symbiotic interaction // *Frontiers in Plant Science*. — 2016. — V. 7, № 454.
73. Deakin W.J., Broughton W.J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems // *Nature Reviews Microbiology*. — 2009. — V. 7, № 4. — P. 312-320.
74. del Río L.A. ROS and RNS in plant physiology: an overview // *Journal of Experimental Botany*. — 2015. — V. 66, № 10. — P. 2827-2837.
75. Després C., Chubak C., Rochon A., Clark R., Bethune T., Desveaux D., Fobert P.R. The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1 // *The Plant Cell*. — 2003. — V. 15, № 9. — P. 2181-2191.
76. Diaz-Vivancos P., de Simone A., Kiddle G., Foyer C.H. Glutathione – linking cell proliferation to oxidative stress // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2015. — V. 89. — P. 1154-1164.
77. Diaz-Vivancos P., Dong Y., Ziegler K., Markovic J., Pallardó F.V., Pellny T.K., Verrier P.J., Foyer C.H. Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis*

- thaliana* and lowers the oxidative defence shield // *The Plant Journal*. — 2010a. — V. 64, № 5. — P. 825-838.
78. Diaz-Vivancos P., Wolff T., Markovic J., Pallardó Federico V., Foyer Christine H. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle // *Biochemical Journal*. — 2010b. — V. 431, № 2. — P. 169-178.
79. Die J.V., Román B., Nadal S., Dita M.Á., González-Verdejo C.I. Expression analysis of *Pisum sativum* putative defence genes during *Orobanche crenata* infection // *Crop and Pasture Science*. — 2009. — V. 60, № 5. — P. 490-498.
80. Dixon D.P., Skipsey M., Edwards R. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism // *Phytochemistry*. — 2010. — V. 71, № 4. — P. 338-350.
81. Dixon D.P., Skipsey M., Grundy N.M., Edwards R. Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. — 2005. — V. 138, № 4. — P. 2233-2244.
82. Downie J.A. Functions of rhizobial nodulation genes // *The Rhizobiaceae* Springer, 1998. — P. 387-402.
83. Downie J.A. Legume nodulation // *Current Biology*. — 2014. — V. 24, № 5. — P. R184-R190.
84. Dron M., Clouse S.D., Dixon R.A., Lawton M.A., Lamb C.J. Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1988. — V. 85, № 18. — P. 6738-6742.
85. Echevarría-Zomeño S., Pérez-de-Luque A., Jorrín J., Maldonado A.M. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies // *Journal of Experimental Botany*. — 2006. — V. 57, № 15. — P. 4189-4200.
86. Edwards A., Heckmann A.B., Yousafzai F., Duc G., Downie J.A. Structural implications of mutations in the pea *Sym8* symbiosis gene, the *DMII* ortholog, encoding a predicted ion channel // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2007. — V. 20, № 10. — P. 1183-1191.
87. Edwards R., Blount J.W., Dixon R.A. Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures // *Planta*. — 1991. — V. 184, № 3. — P. 403-409.
88. Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals // *Cell*. — 1996. — V. 85, № 5. — P. 673-681.
89. El Msehli S., Lambert A., Baldacci-Cresp F., Hopkins J., Boncompagni E., Smiti S.A., Hérouart D., Frenco P. Crucial role of (homo)glutathione in nitrogen fixation in *Medicago truncatula* nodules // *New Phytologist*. — 2011. — V. 192, № 2. — P. 496-506.
90. El Yahyaoui F., Küster H., Ben Amor B., Hohnjec N., Pühler A., Becker A., Gouzy J., Vernié T., Gough C., Niebel A., Godiard L., Gamas P. Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the

- symbiotic program // *Plant Physiology*. — 2004. — V. 136, № 2. — P. 3159-3176.
91. Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G.B. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development // *Nature*. — 2002. — V. 417, № 6892. — P. 962-966.
 92. Evans P.J., Gallesi D., Mathieu C., Hernandez M.J., de Felipe M., Halliwell B., Puppo A. Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence // *Planta*. — 1999. — V. 208, № 1. — P. 73-79.
 93. Fåhraeus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique // *Journal of General Microbiology*. — 1957. — V. 16, № 2. — P. 374-381.
 94. Farkas A., Maróti G., Dürögő H., Györgypál Z., Lima R.M., Medzihradzky K.F., Kereszt A., Mergaert P., Kondorosi É. *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2014. — V. 111, № 14. — P. 5183-5188.
 95. Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa* // *The Plant Journal*. — 1998. — V. 13, № 4. — P. 455-463.
 96. Ferrari S., Plotnikova J.M., De Lorenzo G., Ausubel F.M. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires Eds4 and Pad2, but not Sid2, Eds5 or Pad4 // *The Plant Journal*. — 2003. — V. 35, № 2. — P. 193-205.
 97. Firmin J., Wilson K., Rossen L., Johnston A. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants // *Nature*. — 1986. — V. 324, № 6092. — P. 90-92.
 98. Fischer H.-M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia // *Microbiological Reviews*. — 1994. — V. 58, № 3. — P. 352-386.
 99. Fliegmann J., Bono J.-J. Lipo-chitoooligosaccharidic nodulation factors and their perception by plant receptors // *Glycoconjugate Journal*. — 2015. — V. 32, № 7. — P. 455-464.
 100. Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept // *Annual Review of Phytopathology*. — 1971. — V. 9, № 1. — P. 275-296.
 101. Forrest R.S., Lyon G.D. Substrate degradation patterns of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell walls // *Journal of Experimental Botany*. — 1990. — V. 41, № 4. — P. 481-488.
 102. Fournier J., Teillet A., Chabaud M., Ivanov S., Genre A., Limpens E., de Carvalho-Niebel F., Barker D.G. Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair // *Plant Physiology*. — 2015. — V. 167, № 4. — P. 1233-1242.

103. Foyer C.H., Bloom A.J., Queval G., Noctor G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling // *Annual Review of Plant Biology*. — 2009. — V. 60, № 1. — P. 455-484.
104. Foyer C.H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub // *Plant Physiology*. — 2011. — V. 155, № 1. — P. 2-18.
105. Foyer C.H., Noctor G. Redox signaling in plants // *Antioxidants and Redox Signaling*. — 2013. — V. 18, № 16. — P. 2087-2090.
106. Franssen H.J., Xiao T.T., Kulikova O., Wan X., Bisseling T., Scheres B., Heidstra R. Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem // *Development*. — 2015. — V. 142, № 17. — P. 2941-2950.
107. Fraysse N., Couderc F., Poinso V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*–legume symbiosis // *European Journal of Biochemistry*. — 2003. — V. 270, № 7. — P. 1365-1380.
108. Frendo P., Gallesi D., Turnbull R., Van de Sype G., Hérouart D., Puppo A. Localisation of glutathione and homoglutathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis // *The Plant Journal*. — 1999. — V. 17, № 2. — P. 215-219.
109. Frendo P., Harrison J., Norman C., Jiménez M.J.H., Van de Sype G., Gilabert A., Puppo A. Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2005. — V. 18, № 3. — P. 254-259.
110. Frendo P., Jiménez M.a.J.H., Mathieu C., Duret L., Gallesi D., Van de Sype G., Hérouart D., Puppo A. A *Medicago truncatula* homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication // *Plant Physiology*. — 2001. — V. 126, № 4. — P. 1706-1715.
111. Frendo P., Matamoros M., Alloing G., Becana M. Thiol-based redox signaling in the nitrogen-fixing symbiosis // *Frontiers in Plant Science*. — 2013. — V. 4, № 376.
112. Gage D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2004. — V. 68, № 2. — P. 280-300.
113. Gavrin A., Kulikova O., Bisseling T., Fedorova E.E. Interface symbiotic membrane formation in root nodules of *Medicago truncatula*: the role of synaptotagmins *MtSyt1*, *MtSyt2* and *MtSyt3* // *Frontiers in Plant Science*. — 2017. — V. 8, № 201.
114. Glazebrook J., Ausubel F.M. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1994. — V. 91, № 19. — P. 8955-8959.
115. Glenn A.R., Poole P.S., Hudman J.F., Succinate uptake by free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* // *Microbiology*. — 1980. — V. 119, № 1 — P. 267-271.
116. Godiard L., Lepage A., Moreau S., Laporte D., Verdenaud M., Timmers T., Gamas P. *MtBHLH1*, a bHLH transcription factor involved in *Medicago*

- truncatula* nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges // *New Phytologist*. — 2011. — V. 191, № 2. — P. 391-404.
117. Gomez L.D., Noctor G., Knight M.R., Foyer C.H. Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione // *Journal of Experimental Botany*. — 2004. — V. 55, № 404. — P. 1851-1859.
 118. Gough C., Cullimore J. Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2011. — V. 24, № 8. — P. 867-878.
 119. Gourion B., Berrabah F., Ratet P., Stacey G. *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity // *Trends in plant science*. — 2015. — V. 20, № 3. — P. 186-194.
 120. Groten K., Vanacker H., Dutilleul C., Bastian F., Bernard S., Carzaniga R., Foyer C.H. The roles of redox processes in pea nodule development and senescence // *Plant, Cell and Environment*. — 2005. — V. 28, № 10. — P. 1293-1304.
 121. Guinel F.C. Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types // *Botany*. — 2009. — V. 87, № 12. — P. 1117-1138.
 122. Guinel F.C., Geil R.D. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses // *Canadian Journal of Botany*. — 2002. — V. 80, № 7. — P. 695-720.
 123. Gully D., Gargani D., Bonaldi K., Grangeteau C., Chaintreuil C., Fardoux J., Nguyen P., Marchetti R., Nouwen N., Molinaro A., Mergaert P., Giraud E. A peptidoglycan-remodeling enzyme is critical for bacteroid differentiation in *Bradyrhizobium* spp. during legume symbiosis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2016. — V. 29, № 6. — P. 447-457.
 124. Gust A.A., Willmann R., Desaki Y., Grabherr H.M., Nürnberger T. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity // *Trends in Plant Science*. — 2012. — V. 17, № 8. — P. 495-502.
 125. Hakoyama T., Niimi K., Yamamoto T., Isobe S., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Kumagai H., Umehara Y., Brossuleit K., Petersen T.R., Sandal N., Stougaard J., Udvardi M.K., Tamaoki M., Kawaguchi M., Kouchi H., Sukanuma N. The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules // *Plant and Cell Physiology*. — 2012. — V. 53, № 1. — P. 225-236.
 126. Hamel L.-P., Beaudoin N. Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions // *Planta*. — 2010. — V. 232, № 4. — P. 787-806.
 127. Haney C.H., Long S.R. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2010. — V. 107, № 1. — P. 478-483.
 128. Hérouart D., Baudouin E., Frendo P., Harrison J., Santos R., Jamet A., Van de Sype G., Touati D., Puppo A. Reactive oxygen species, nitric oxide

- and glutathione: a key role in the establishment of the legume–*Rhizobium* symbiosis? // *Plant Physiology and Biochemistry*. — 2002. — V. 40, № 6. — P. 619-624.
129. Hirsch S., Kim J., Muñoz A., Heckmann A.B., Downie J.A., Oldroyd G.E.D. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula* // *The Plant Cell*. — 2009. — V. 21, № 2. — P. 545-557.
 130. Høgslund N., Radutoiu S., Krusell L., Voroshilova V., Hannah M.A., Goffard N., Sanchez D.H., Lippold F., Ott T., Sato S., Tabata S., Liboriussen P., Lohmann G.V., Schauser L., Weiller G.F., Udvardi M.K., Stougaard J. Dissection of symbiosis and organ development by integrated transcriptome analysis of *Lotus japonicus* mutant and wild-type plants // *PLOS ONE*. — 2009. — V. 4, № 8. — P. e6556.
 131. Horváth B., Domonkos Á., Kereszt A., Szűcs A., Ábrahám E., Ayaydin F., Bóka K., Chen Y., Chen R., Murray J.D., Udvardi M.K., Kondorosi É., Kaló P. Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula dnf7* mutant // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2015. — V. 112, № 49. — P. 15232-15237.
 132. Hossain M.S., Liao J., James E.K., Sato S., Tabata S., Jurkiewicz A., Madsen L.H., Stougaard J., Ross L., Szczyglowski K. *Lotus japonicus ARPC1* is required for rhizobial infection // *Plant Physiology*. — 2012. — V. 160, № 2. — P. 917-928.
 133. Hubber A., Vergunst A.C., Sullivan J.T., Hooykaas P.J.J., Ronson C.W. Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system // *Molecular Microbiology*. — 2004. — V. 54, № 2. — P. 561-574.
 134. Innocenti G., Pucciariello C., Le Gleuher M., Hopkins J., de Stefano M., Delledonne M., Puppo A., Baudouin E., Frenedo P. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots // *Planta*. — 2007. — V. 225, № 6. — P. 1597-1602.
 135. Iturbe-Ormaetxe I., Heras B., Matamoros M.A., Ramos J., Moran J.F., Becana M. Cloning and functional characterization of a homoglutathione synthetase from pea nodules // *Physiologia Plantarum*. — 2002. — V. 115, № 1. — P. 69-73.
 136. 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.
 137. Jamet A., Mandon K., Puppo A., Hérouart D. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis // *Journal of Bacteriology*. — 2007. — V. 189, № 23. — P. 8741-8745.

138. Jamet A., Sigaud S., Van de Sype G., Puppo A., Hérouart D. Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2003. — V. 16, № 3. — P. 217-225.
139. Jardinaud M.-F., Boivin S., Rodde N., Catrice O., Kisiala A., Lepage A., Moreau S., Roux B., Cottret L., Sallet E. A laser dissection-RNAseq analysis highlights the activation of cytokinin pathways by Nod factors in the *Medicago truncatula* root epidermis // *Plant Physiology*. — 2016. — V. 171, № 3. — P. 2256-2276.
140. Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system // *Nature*. — 2006. — V. 444, № 7117. — P. 323-329.
141. Jones K.M., Sharopova N., Lohar D.P., Zhang J.Q., VandenBosch K.A., Walker G.C. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2008. — V. 105, № 2. — P. 704-709.
142. Kaminski P.A., Batut J., Boistard P. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia // *The Rhizobiaceae* Springer, 1998. — P. 431-460.
143. Kawaharada Y., Kelly S., Nielsen M.W., Hjuler C.T., Gysel K., Muszyński A., Carlson R.W., Thygesen M.B., Sandal N., Asmussen M.H., Vinther M., Andersen S.U., Krusell L., Thirup S., Jensen K.J., Ronson C.W., Blaise M., Radutoiu S., Stougaard J. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection // *Nature*. — 2015. — V. 523. — P. 308-312.
144. Kereszt A., Mergaert P., Maróti G., Kondorosi É. Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis // *Current Opinion in Microbiology*. — 2011. — V. 14, № 1. — P. 76-81.
145. Kevei Z., Lougnon G., Mergaert P., Horváth G.V., Kereszt A., Jayaraman D., Zaman N., Marcel F., Regulski K., Kiss G.B., Kondorosi A., Endre G., Kondorosi E., Ane J.M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula* // *The Plant Cell*. — 2007. — V. 19, № 12. — P. 3974-3989.
146. Kim M., Chen Y., Xi J., Waters C., Chen R., Wang D. An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2015. — V. 112, № 49. — P. 15238-15243.
147. Kirienko A.N., Porozov Y.B., Malkov N.V., Akhtemova G.A., Le Signor C., Thompson R., Saffray C., Dalmais M., Bendahmane A., Tikhonovich I.A., Dolgikh E.A. Role of a receptor-like kinase K1 in pea *Rhizobium* symbiosis development // *Planta*. — 2018. — V. 248, № 5. — P. 1101-1120.
148. Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Timmers A.C.J., Tsyganov V.E. 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 Phytologist*. — 2016. — V. 210, № 1. — P. 168-183.
149. Kitaeva A.B., Kusakin P.G., Demchenko K.N., Tsyganov V.E. Key methodological features of tubulin cytoskeleton studies in nodules of legume plants // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. — 2018. — V. 53, № 3. — P. 634-644.
150. Klapheck S. Homogluthatione: isolation, quantification and occurrence in legumes // *Physiologia Plantarum*. — 1988. — V. 74, № 4. — P. 727-732.
151. Kneen B.E., LaRue T.A., Hirsch A.M., Smith C.A., Weeden N.F. *sym 13* — a gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum* // *Plant Physiology*. — 1990. — V. 94, № 3. — P. 899-905.
152. Koornneef A., Leon-Reyes A., Ritsema T., Verhage A., Den Otter F.C., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation // *Plant Physiology*. — 2008. — V. 147, № 3. — P. 1358-1368.
153. Kopp E., Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors // *Current Opinion in Immunology*. — 2003. — V. 15, № 4. — P. 396-401.
154. Kosterin O.E., Rozov S.M. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I // *Pisum Genetics*. — 1993. — V. 25. — P. 27-31.
155. Krusell L., Krause K., Ott T., Desbrosses G., Krämer U., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., James E.K., Sandal N., Stougaard J., Kawaguchi M., Miyamoto A., Sukanuma N., Udvardi M.K. The sulfate transporter *SST1* is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules // *The Plant Cell*. — 2005. — V. 17, № 5. — P. 1625-1636.
156. Kushalappa A.C., Yogendra K.N., Karre S. Plant innate immune response: Qualitative and quantitative resistance // *Critical Reviews in Plant Sciences*. — 2016. — V. 35, № 1. — P. 38-55.
157. Kuznetsova E., Seddas-Dozolme P.M.A., Arnould C., Tollot M., van Tuinen D., Borisov A., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. Symbiosis-related pea genes modulate fungal and plant gene expression during the arbuscule stage of mycorrhiza with *Glomus intraradices* // *Mycorrhiza*. — 2010. — V. 20, № 6. — P. 427-443.
158. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. — 1997. — V. 48, № 1. — P. 251-275.
159. Laporte P., Lepage A., Fournier J., Catrice O., Moreau S., Jardinaud M.-F., Mun J.-H., Larrainzar E., Cook D.R., Gamas P., Niebel A. The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection // *Journal of Experimental Botany*. — 2014. — V. 65, № 2. — P. 481-494.

160. Lattanzio V., Lattanzio V.M.T., Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. — Trivandrum: Research Signpost, 2006. — P. 23-67.
161. Ledermann R., Bartsch I., Müller B., Wülser J., Fischer H.-M. A functional general stress response of *Bradyrhizobium diazoefficiens* is required for early stages of host plant infection // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2018. — V. 31, № 5. — P. 537-547.
162. Lefebvre B., Timmers T., Mbengue M., Moreau S., Hervé C., Tóth K., Bittencourt-Silvestre J., Klaus D., Deslandes L., Godiard L., Murray J.D., Udvardi M.K., Raffaele S., Mongrand S., Cullimore J., Gamas P., Niebel A., Ott T. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2010. — V. 107, № 5. — P. 2343-2348.
163. Lévy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.-P., Ané J.-M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C., Debelle F. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses // *Science*. — 2004. — V. 303, № 5662. — P. 1361-1364.
164. Liang Y., Cao Y., Tanaka K., Thibivilliers S., Wan J., Choi J., Kang C.h., Qiu J., Stacey G. Nonlegumes respond to rhizobial nod factors by suppressing the innate immune response // *Science*. — 2013. — V. 341, № 6152. — P. 1384-1387.
165. 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, № 1. — P. 17-28.
166. Lillig C., Berndt C. Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange // *Antioxidants & Redox Signaling*. — 2013. — V. 18, № 13. — P. 1654-1665.
167. Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection // *Science*. — 2003. — V. 302, № 5645. — P. 630-633.
168. Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., VandenBosch K.A. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-*Rhizobia* symbiosis // *New Phytologist*. — 2007. — V. 173, № 1. — P. 39-49.
169. Lohar D.P., Sharopova N., Endre G., Penuela S., Samac D., Town C., Silverstein K.A., VandenBosch K.A. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2006. — V. 140, № 1. — P. 221-234.
170. Lopez-Gomez M., Sandal N., Stougaard J., Boller T. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus* // *Journal of Experimental Botany*. — 2011. — V. 63, № 1. — P. 393-401.
171. Loscos J., Matamoros M.A., Becana M. Ascorbate and homogluthione metabolism in common bean nodules under stress

- conditions and during natural senescence // *Plant Physiology*. — 2008. — V. 146, № 3. — P. 1282-1292.
172. Lotze M.T., Zeh H.J., Rubartelli A., Sparvero L.J., Amoscato A.A., Washburn N.R., DeVera M.E., Liang X., Tör M., Billiar T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity // *Immunological Reviews*. — 2007. — V. 220, № 1. — P. 60-81.
173. Lulai E.C., Morgan W.C. Histochemical probing of potato periderm with neutral red: A sensitive cytofluorochrome for the hydrophobic domain of suberin // *Biotechnic and Histochemistry*. — 1992. — V. 67, № 4. — P. 185-195.
174. Lynch M., Conery J.S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes // *Science*. — 2000. — V. 290, № 5494. — P. 1151-1155.
175. Macho Alberto P., Zipfel C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling // *Molecular Cell*. — 2014. — V. 54, № 2. — P. 263-272.
176. Madsen E.B., Antolín-Llovera M., Grossmann C., Ye J., Vieweg S., Broghammer A., Krusell L., Radutoiu S., Jensen O.N., Stougaard J. Autophosphorylation is essential for the *in vivo* function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5 // *The Plant Journal*. — 2011. — V. 65, № 3. — P. 404-417.
177. Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals // *Nature*. — 2003. — V. 425, № 6958. — P. 637-640.
178. Marino D., González E.M., Frendo P., Puppo A., Arrese-Igor C. NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase // *Planta*. — 2007. — V. 225, № 2. — P. 413-421.
179. Marsh J.F., Rakocevic A., Mitra R.M., Brocard L., Sun J., Eschstruth A., Long S.R., Schultze M., Ratet P., Oldroyd G.E.D. *Medicago truncatula* *NIN* is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase // *Plant Physiology*. — 2007. — V. 144, № 1. — P. 324-335.
180. Martínez-Abarca F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P., Sanjuan J., Bisseling T., Olivares J. Involvement of Salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 1998. — V. 11, № 2. — P. 153-155.
181. Matamoros M.A., Becana M. Chapter Three - Redox control of the legume-*Rhizobium* symbiosis // *Advances in Botanical Research* / Frendo P. et al. Academic Press, 2020. — P. 67-96.
182. Matamoros M.A., Clemente M.R., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Ramos J., Moran J.F., Stiller J., Gresshoff P.M., Becana M. Molecular analysis of the pathway for the synthesis of thiol tripeptides in the model

- legume *Lotus japonicus* // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2003. — V. 16, № 11. — P. 1039-1046.
183. Matamoros M.A., Fernández-García N., Wienkoop S., Loscos J., Saiz A., Becana M. Mitochondria are an early target of oxidative modifications in senescing legume nodules // *New Phytologist*. — 2013. — V. 197, № 3. — P. 873-885.
184. Matamoros M.A., Moran J.F., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M.C., Becana M. Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules // *Plant Physiology*. — 1999. — V. 121, № 3. — P. 879-888.
185. Mateo A., Funck D., Mühlenbock P., Kular B., Mullineaux P.M., Karpinski S. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis // *Journal of Experimental Botany*. — 2006. — V. 57, № 8. — P. 1795-1807.
186. Maughan S., Foyer C.H. Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants // *Physiologia Plantarum*. — 2006. — V. 126, № 3. — P. 382-397.
187. Maunoury N., Kondorosi A., Kondorosi E., Mergaert P. Cell biology of nodule infection and development // *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses / Dilworth M. J. et al.* — Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. — P. 153-189.
188. May M.J., Hammond-Kosack K.E., Jones J. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* // *Plant Physiology*. — 1996. — V. 110, № 4. — P. 1367-1379.
189. Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A., Kondorosi E. A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs // *Plant Physiology*. — 2003. — V. 132, № 1. — P. 161-173.
190. Mergaert P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., Mausset A.-E., Barloy-Hubler F., Galibert F., Kondorosi A., Kondorosi E. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2006. — V. 103, № 13. — P. 5230-5235.
191. Minchin F.R., James E.K., Becana M. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules // *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses / Dilworth M. J. et al.* — Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. — P. 321-362.
192. Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* // *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences. — 2007. — V. 104, № 49. — P. 19613-19618.
193. Miyata K., Kozaki T., Kouzai Y., Ozawa K., Ishii K., Asamizu E., Okabe Y., Umehara Y., Miyamoto A., Kobae Y., Akiyama K., Kaku H., Nishizawa Y., Shibuya N., Nakagawa T. The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice // *Plant and Cell Physiology*. — 2014. — V. 55, № 11. — P. 1864-1872.
 194. Montiel J., Downie J.A., Farkas A., Bihari P., Herczeg R., Bálint B., Mergaert P., Kereszt A., Kondorosi É. Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2017. — V. 114, № 19. — P. 5041-5046.
 195. Moran J.F., Iturbe-Ormaetxe I., Matamoros M.A., Rubio M.C., Clemente M.R., Brewin N.J., Becana M. Glutathione and homoglutathione synthetases of Legume nodules. Cloning, Expression, and Subcellular Localization // *Plant Physiology*. — 2000. — V. 124, № 3. — P. 1381-1392.
 196. Morieri G., Martinez E.A., Jarynowski A., Driguez H., Morris R., Oldroyd G.E., Downie J.A. Host-specific Nod-factors associated with *Medicago truncatula* nodule infection differentially induce calcium influx and calcium spiking in root hairs // *New Phytologist*. — 2013. — V. 200, № 3. — P. 656-662.
 197. Mou Z., Fan W., Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes // *Cell*. — 2003. — V. 113, № 7. — P. 935-944.
 198. Muglia C., Comai G., Spegazzini E., Riccillo P.M., Aguilar O.M. Glutathione produced by *Rhizobium tropici* is important to prevent early senescence in common bean nodules // *FEMS Microbiology Letters*. — 2008. — V. 286, № 2. — P. 191-198.
 199. Nakagawa T., Kaku H., Shimoda Y., Sugiyama A., Shimamura M., Takanashi K., Yazaki K., Aoki T., Shibuya N., Kouchi H. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume–*Rhizobium* symbiosis // *The Plant Journal*. — 2011. — V. 65, № 2. — P. 169-180.
 200. Naya L., Ladrera R., Ramos J., González E.M., Arrese-Igor C., Minchin F.R., Becana M. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants // *Plant Physiology*. — 2007. — V. 144, № 2. — P. 1104-1114.
 201. Nelson M.S., Chun C.L., Sadowsky M.J. Type IV effector proteins involved in the *Medicago-Sinorhizobium* symbiosis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2017. — V. 30, № 1. — P. 28-34.
 202. Niehaus K., Kapp D., Pühler A. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant // *Planta*. — 1993. — V. 190, № 3. — P. 415-425.

203. Noctor G., Arisi A.-C.M., Jouanin L., Valadier M.-H., Roux Y., Foyer C.H. The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar. Possible implications for glutathione production during stress // *Physiologia Plantarum*. — 1997. — V. 100, № 2. — P. 255-263.
204. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H. Glutathione in plants: an integrated overview // *Plant, Cell and Environment*. — 2012. — V. 35, № 2. — P. 454-484.
205. Noji M., Saito K. Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulfur metabolic engineering in plants // *Amino acids*. — 2002. — V. 22, № 3. — P. 231-243.
206. Novák K., Pešina K., Nebesářová J., Škrdleta V., Lisá L., Našinec V. Symbiotic tissue degradation pattern in the ineffective nodules of three nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.) // *Annals of Botany*. — 1995. — V. 76, № 3. — P. 303-313.
207. Oger E., Marino D., Guignonis J.-M., Pauly N., Puppo A. Sulfenylated proteins in the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis // *Journal of Proteomics*. — 2012. — V. 75, № 13. — P. 4102-4113.
208. Okazaki S., Kaneko T., Sato S., Saeki K. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2013. — V. 110, № 42. — P. 17131-17136.
209. Okazaki S., Zehner S., Hempel J., Lang K., Göttfert M. Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii* // *FEMS Microbiology Letters*. — 2009. — V. 295, № 1. — P. 88-95.
210. Oldroyd G.E. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants // *Nature Reviews Microbiology*. — 2013. — V. 11, № 4. — P. 252-263.
211. Oono R., Anderson C.G., Denison R.F. Failure to fix nitrogen by non-reproductive symbiotic rhizobia triggers host sanctions that reduce fitness of their reproductive clonemates // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. — 2011. — V. 278, № 1718. — P. 2698-2703.
212. Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Dolgikh E.A., Goormachtig S. *Wuschel-related homeobox5* gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation // *Plant Physiology*. — 2012. — V. 158, № 3. — P. 1329-1341.
213. Ovchinnikova E., Journet E.-P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., Fedorova E., Liu W., den Camp R.O., Zhukov V., Tikhonovich I., Borisov A., Bisseling T., Limpens E. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* spp. // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2011. — V. 24, № 11. — P. 1333-1344.

214. Parisy V., Poinssot B., Owsianowski L., Buchala A., Glazebrook J., Mauch F. Identification of Pad2 as a γ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis* // *The Plant Journal*. — 2007. — V. 49, № 1. — P. 159-172.
215. Park C.-J., Caddell D., Ronald P. Protein phosphorylation in plant immunity: insights into the regulation of pattern recognition receptor-mediated signaling // *Frontiers in Plant Science*. — 2012. — V. 3, № 177.
216. Parthasarathy A., Adams L.E., Savka F.C., Hudson A.O. The *Arabidopsis thaliana* gene annotated by the locus tag At3g08860 encodes alanine aminotransferase // *Plant Direct*. — 2019. — V. 3, № 9. — P. e00171.
217. Pasternak M., Lim B., Wirtz M., Hell R., Cobbett C.S., Meyer A.J. Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development // *The Plant Journal*. — 2008. — V. 53, № 6. — P. 999-1012.
218. Pasternak T., Asard H., Potters G., Jansen M.A.K. The thiol compounds glutathione and homogluthione differentially affect cell development in alfalfa (*Medicago sativa* L.) // *Plant Physiology and Biochemistry*. — 2014. — V. 74. — P. 16-23.
219. Pawlowski K., Bisseling T. Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features? // *The Plant Cell*. — 1996. — V. 8, № 10. — P. 1899-1913.
220. Peleg-Grossman S., Golani Y., Kaye Y., Melamed-Book N., Levine A. NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and Legumes and Non-Legumes // *PLOS ONE*. — 2009. — V. 4, № 12. — P. e8399.
221. Peleg-Grossman S., Melamed-Book N., Levine A. ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression // *Plant Signaling and Behavior*. — 2012. — V. 7, № 3. — P. 409-415.
222. Penterman J., Abo R.P., De Nisco N.J., Arnold M.F.F., Longhi R., Zanda M., Walker G.C. Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2014. — V. 111, № 9. — P. 3561-3566.
223. Pérez-de-Luque A., González-Verdejo C.I., Lozano M.D., Dita M.A., Cubero J.I., González-Melendi P., Risueño M.C., Rubiales D. Protein cross-linking, peroxidase and β -1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata* // *Journal of Experimental Botany*. — 2006. — V. 57, № 6. — P. 1461-1469.
224. Perotto S., Brewin N., Kannenberg E. Cytological evidence for a host defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 1994. — V. 7, № 1. — P. 99-112.

225. Peyraud R., Dubiella U., Barbacci A., Genin S., Raffaele S., Roby D. Advances on plant–pathogen interactions from molecular toward systems biology perspectives // *The Plant Journal*. — 2017. — V. 90, № 4. — P. 720–737.
226. Poole P., Ramachandran V., Terpolilli J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts // *Nature Reviews Microbiology*. — 2018. — V. 16. — P. 291–303.
227. Price P.A., Tanner H.R., Dillon B.A., Shabab M., Walker G.C., Griffiths J.S. Rhizobial peptidase HrrP cleaves host-encoded signaling peptides and mediates symbiotic compatibility // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2015. — V. 112, № 49. — P. 15244–15249.
228. Pucciariello C., Innocenti G., Van de Velde W., Lambert A., Hopkins J., Clément M., Ponchet M., Pauly N., Goormachtig S., Holsters M., Puppo A., Frenco P. (Homo)glutathione depletion modulates host gene expression during the symbiotic interaction between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti* // *Plant Physiology*. — 2009. — V. 151, № 3. — P. 1186–1196.
229. Queval G., Jaillard D., Zechmann B., Noctor G. Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts // *Plant, Cell & Environment*. — 2011. — V. 34, № 1. — P. 21–32.
230. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Grønlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // *Nature*. — 2003. — V. 425, № 6958. — P. 585–592.
231. Ramu S.K., Peng H.-M., Cook D.R. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2002. — V. 15, № 6. — P. 522–528.
232. Rathbun E.A., Naldrett M.J., Brewin N.J. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2002. — V. 15, № 4. — P. 350–359.
233. Reguera M., Abreu I., Brewin N.J., Bonilla I., Bolaños L. Borate promotes the formation of a complex between legume AGP-extensin and rhamnogalacturonan II and enhances production of *Rhizobium* capsular polysaccharide during infection thread development in *Pisum sativum* symbiotic root nodules // *Plant, Cell and Environment*. — 2010. — V. 33, № 12. — P. 2112–2120.
234. Reuber T.L., Walker G.C. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm1021 // *Journal of Bacteriology*. — 1993. — V. 175, № 11. — P. 3653–3655.

235. Ribeiro C.W., Alloing G., Mandon K., Frendo P. Redox regulation of differentiation in symbiotic nitrogen fixation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. — 2015. — V. 1850, № 8. — P. 1469-1478.
236. Riccillo P.M., Muglia C.I., de Bruijn F.J., Roe A.J., Booth I.R., Aguilar O.M. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance // *Journal of Bacteriology*. — 2000. — V. 182, № 6. — P. 1748-1753.
237. Riely B.K., Loughon G., Ané J.-M., Cook D.R. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots // *The Plant Journal*. — 2007. — V. 49, № 2. — P. 208-216.
238. Robatzek S., Saijo Y. Plant immunity from A to Z // *Genome Biology*. — 2008. — V. 9, № 4. — P. 304.
239. Roetschi A., Si-Ammour A., Belbahri L., Mauch F., Mauch-Mani B. Characterization of an *Arabidopsis-Phytophthora* Pathosystem: resistance requires a functional *Pad2* gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling // *The Plant Journal*. — 2001. — V. 28, № 3. — P. 293-305.
240. Roudier F., Fedorova E., Lebris M., Lecomte P., Györgyey J., Vaubert D., Horvath G., Abad P., Kondorosi A., Kondorosi E. The *Medicago* species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs // *Plant Physiology*. — 2003. — V. 131, № 3. — P. 1091-1103.
241. Rouhier N. Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly // *New Phytologist*. — 2010. — V. 186, № 2. — P. 365-372.
242. Rouhier N., Koh C.S., Gelhaye E., Corbier C., Favier F., Didierjean C., Jacquot J.-P. Redox based anti-oxidant systems in plants: Biochemical and structural analyses // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. — 2008a. — V. 1780, № 11. — P. 1249-1260.
243. Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J.-P. The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation // *Annual Review of Plant Biology*. — 2008b. — V. 59, № 1. — P. 143-166.
244. Roy S., Liu W., Nandety R.S., Crook A., Mysore K.S., Pislariu C.I., Frugoli J., Dickstein R., Udvardi M.K. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation // *The Plant Cell*. — 2020. — V. 32, № 1. — P. 15-41.
245. Rubio M.C., James E.K., Clemente M.R., Bucciarelli B., Fedorova M., Vance C.P., Becana M. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2004. — V. 17, № 12. — P. 1294-1305.
246. Sánchez C., Iannino F., Deakin W.J., Ugalde R.A., Lepek V.C. Characterization of the *Mesorhizobium loti* MAFF303099 Type-three protein

- secretion system // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2009. — V. 22, № 5. — P. 519-528.
247. Santos R., Hérouart D., Sigaud S., Touati D., Puppo A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 1. — P. 86-89.
248. Sauviac L., Philippe H., Phok K., Bruand C. An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti* // *Journal of Bacteriology*. — 2007. — V. 189, № 11. — P. 4204-4216.
249. Scheidle H., Groß A., Niehaus K. The Lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants // *New Phytologist*. — 2005. — V. 165, № 2. — P. 559-566.
250. Schippers J.H.M., Foyer C.H., van Dongen J.T. Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2016. — V. 29. — P. 121-128.
251. Schlaeppli K., Bodenhausen N., Buchala A., Mauch F., Reymond P. The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis* // *The Plant Journal*. — 2008. — V. 55, № 5. — P. 774-786.
252. Schlueter J.A., Dixon P., Granger C., Grant D., Clark L., Doyle J.J., Shoemaker R.C. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species // *Genome*. — 2004. — V. 47, № 5. — P. 868-876.
253. Schmid M., Davison T.S., Henz S.R., Pape U.J., Demar M., Vingron M., Schölkopf B., Weigel D., Lohmann J.U. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development // *Nature Genetics*. — 2005. — V. 37, № 5. — P. 501-506.
254. Schneider A., Walker S., Poyser S., Sagan M., Ellis T., Downie J. Genetic mapping and functional analysis of a nodulation-defective mutant (*sym19*) of pea (*Pisum sativum* L.) // *Molecular and General Genetics*. — 1999. — V. 262, № 1. — P. 1-11.
255. Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls // *Journal of Experimental Botany*. — 1999. — V. 50, № 337. — P. 1267-1280.
256. Schultze M., Kondorosi A. Regulation of symbiotic root nodule development // *Annual review of genetics*. — 1998. — V. 32, № 1. — P. 33-57.
257. Schumpp O., Deakin W.J. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules // *Trends in Plant Science*. — 2010. — V. 15, № 4. — P. 189-195.
258. Senda K., Ogawa K.i. Induction of PR-1 accumulation accompanied by runaway cell death in the *lsd1* mutant of *Arabidopsis* is dependent on glutathione levels but independent of the redox state of glutathione // *Plant and Cell Physiology*. — 2004. — V. 45, № 11. — P. 1578-1585.

259. Serova T.A., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization // *Journal of Plant Physiology*. — 2017. — V. 212. — P. 29-44.
260. 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.
261. Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road // *Frontiers in Plant Science*. — 2016. — V. 7, № 187.
262. Shaw S.L., Long S.R. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume // *Plant Physiology*. — 2003. — V. 132, № 4. — P. 2196-2204.
263. Shibuya N., Minami E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. — 2001. — V. 59, № 5. — P. 223-233.
264. Shoemaker R.C., Schlueter J., Doyle J.J. Paleopolyploidy and gene duplication in soybean and other legumes // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2006. — V. 9, № 2. — P. 104-109.
265. Sieberer B.J., Chabaud M., Timmers A.C., Monin A., Fournier J., Barker D.G. A nuclear-targeted cameleon demonstrates intranuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors // *Plant Physiology*. — 2009. — V. 151, № 3. — P. 1197-1206.
266. Singh S., Katzer K., Lambert J., Cerri M., Parniske M. CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development // *Cell Host and Microbe*. — 2014. — V. 15, № 2. — P. 139-152.
267. Sinharoy S., Liu C., Breakspear A., Guan D., Shailes S., Nakashima J., Zhang S., Wen J., Torres-Jerez I., Oldroyd G., Murray J.D., Udvardi M.K. A *Medicago truncatula* cystathionine- β -synthase-like domain-containing protein is required for rhizobial infection and symbiotic nitrogen fixation // *Plant Physiology*. — 2016. — V. 170, № 4. — P. 2204-2217.
268. Sinharoy S., Torres-Jerez I., Bandyopadhyay K., Kereszt A., Pislariu C.I., Nakashima J., Benedito V.A., Kondorosi E., Udvardi M.K. The C₂H₂ transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene *VAMP721a* and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula* // *The Plant Cell*. — 2013. — V. 25, № 9. — P. 3584-3601.
269. Skipsey M., Davis Benjamin G., Edwards R. Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) // *Biochemical Journal*. — 2005. — V. 391, № 3. — P. 567-574.

270. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions // *Microbial Cell Factories*. — 2006. — V. 5, № 1. — P. 7.
271. Smith I.K., Kendall A.C., Keys A.J., Turner J.C., Lea P.J. Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Science Letters*. — 1984. — V. 37, № 1. — P. 29-33.
272. Soltis D.E., Albert V.A., Leebens-Mack J., Bell C.D., Paterson A.H., Zheng C., Sankoff D., de Pamphilis C.W., Wall P.K., Soltis P.S. Polyploidy and angiosperm diversification // *American Journal of Botany*. — 2009. — V. 96, № 1. — P. 336-348.
273. Srivastava S., Emery R.J.N., Kurepin L.V., Reid D.M., Fristensky B., Kav N.N.V. Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels // *Plant Growth Regulation*. — 2006. — V. 49, № 1. — P. 17-25.
274. Stacey G., McAlvin C.B., Kim S.-Y., Olivares J., Soto M.J. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2006. — V. 141, № 4. — P. 1473-1481.
275. Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis // *Nature*. — 2002. — V. 417, № 6892. — P. 959-962.
276. Su T., Xu J., Li Y., Lei L., Zhao L., Yang H., Feng J., Liu G., Ren D. Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Cell*. — 2011. — V. 23, № 1. — P. 364-380.
277. Sugawara M., Takahashi S., Umehara Y., Iwano H., Tsurumaru H., Otake H., Suzuki Y., Kondo H., Konno Y., Yamakawa T., Sato S., Mitsui H., Minamisawa K. Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with *Rj2*-soybeans via effector-triggered immunity // *Nature Communications*. — 2018. — V. 9, № 1. — P. 3139.
278. Sultan S.E. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history // *Trends in Plant Science*. — 2000. — V. 5, № 12. — P. 537-542.
279. Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins // *Science*. — 2008. — V. 321, № 5891. — P. 952-956.
280. Tang F., Yang S., Liu J., Zhu H. *Rj4*, a gene controlling nodulation specificity in soybeans, encodes a thaumatin-like protein but not the one previously reported // *Plant Physiology*. — 2016. — V. 170, № 1. — P. 26-32.
281. Taté R., Cermola M., Riccio A., Diez-Roux G., Patriarca E.J. Glutathione is required by *Rhizobium etli* for glutamine utilization and

- symbiotic effectiveness // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2012. — V. 25, № 3. — P. 331-340.
282. Tellström V., Usadel B., Thimm O., Stitt M., Küster H., Niehaus K. The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2007. — V. 143, № 2. — P. 825-837.
283. Timmers A.C., Auriac M.C., Truchet G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements // *Development*. — 1999. — V. 126, № 16. — P. 3617-3628.
284. Timmers A.C., Vallotton P., Heym C., Menzel D. Microtubule dynamics in root hairs of *Medicago truncatula* // *European Journal of Cell Biology*. — 2007. — V. 86, № 2. — P. 69-83.
285. Timmers A.C.J. The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia // *Journal of Microscopy*. — 2008. — V. 231, № 2. — P. 247-256.
286. Tirichine L.I., de Billy F., Huguet T. *Mtsym6*, a gene conditioning *Sinorhizobium* strain-specific nitrogen fixation in *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2000. — V. 123, № 3. — P. 845-852.
287. Tsuda K., Katagiri F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2010. — V. 13, № 4. — P. 459-465.
288. Tsukui T., Eda S., Kaneko T., Sato S., Okazaki S., Kakizaki-Chiba K., Itakura M., Mitsui H., Yamashita A., Terasawa K., Minamisawa K. The type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with *Rj2* soybean plants // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2013. — V. 79, № 3. — P. 1048-1051.
289. Tsurumaru H., Hashimoto S., Okizaki K., Kanasaki Y., Yoshikawa H., Yamakawa T. A putative type III secretion system effector encoded by the *MA20_12780* gene in *Bradyrhizobium japonicum* is-34 causes incompatibility with *Rj4* genotype soybeans // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2015. — V. 81, № 17. — P. 5812-5819.
290. Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Molecular and General Genetics*. — 1998. — V. 259, № 5. — P. 491-503.
291. Tsyganov V.E., Tsyganova A.V. Symbiotic regulatory genes controlling nodule development in *Pisum sativum* L. // *Plants*. — 2020. — V. 9, № 12. — P. 1741.
292. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Herrera-Cervera J.A., Sanjuan-Pinilla J.M., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Priefer U.B., Olivares J., Sanjuan J. Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum* // *New Phytologist*. — 2003. — V. 159, № 2. — P. 521-530.

293. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Priefer U.B., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis // *Annals of Botany*. — 2002. — V. 89, № 4. — P. 357-366.
294. Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Structure and development of the Legume-Rhizobial symbiotic interface in infection threads // *Cells*. — 2021. — V. 10, № 5. — P. 1050-1064.
295. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Tsyganov V.E. Cell differentiation in nitrogen-fixing nodules hosting symbiosomes // *Functional Plant Biology*. — 2018. — V. 45, № 2. — P. 47-57.
296. Van de Velde W., Guerra J.C.P., Keyser A.D., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M., Goormachtig S. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2006. — V. 141, № 2. — P. 711-720.
297. Van de Velde W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Nagy A., Tiricz H., Satiat-Jeunemaître B., Alunni B., Bourge M., Kucho K.-i., Abe M., Kereszt A., Maroti G., Uchiumi T., Kondorosi E., Mergaert P. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis // *Science*. — 2010. — V. 327, № 5969. — P. 1122-1126.
298. van de Wiel C., Scheres B., Franssen H., van Lierop M.J., van Lammeren A., van Kammen A., Bisseling T. The early nodulin transcript *ENOD2* is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules // *The EMBO Journal*. — 1990. — V. 9, № 1. — P. 1-7.
299. van Rhijn P., Vanderleyden J. The *Rhizobium*-plant symbiosis // *Microbiological Reviews*. — 1995. — V. 59, № 1. — P. 124-142.
300. Vanacker H., Carver T.L.W., Foyer C.H. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction // *Plant Physiology*. — 2000. — V. 123, № 4. — P. 1289-1300.
301. Vasse J., de Billy F., Truchet G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction // *The Plant Journal*. — 1993. — V. 4, № 3. — P. 555-566.
302. Velazquez E., Mateos P.F., Pedrero P., Dazzo F.B., Martinez-Molina E. Attenuation of symbiotic effectiveness by *Rhizobium meliloti* SAF22 related to the presence of a cryptic plasmid // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1995. — V. 61, № 5. — P. 2033-2036.
303. Venkateshwaran M., Jayaraman D., Chabaud M., Genre A., Balloon A.J., Maeda J., Forshey K., den Os D., Kwiecien N.W., Coon J.J., Barker D.G., Ane J.M. A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2015. — V. 112, № 31. — P. 9781-9786.

304. Verma D.P.S., Hu C.-A., Zhang M. Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes // *Physiologia Plantarum*. — 1992. — V. 85, № 2. — P. 253-265.
305. Vernié T., Kim J., Frances L., Ding Y., Sun J., Guan D., Niebel A., Gifford M.L., de Carvalho-Niebel F., Oldroyd G.E.D. The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the *Medicago truncatula* root // *The Plant Cell*. — 2015. — V. 27, № 12. — P. 3410-3424.
306. Vernié T., Moreau S., de Billy F., Plet J., Combier J.-P., Rogers C., Oldroyd G., Frugier F., Niebel A., Gamas P. EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula* // *The Plant Cell*. — 2008. — V. 20, № 10. — P. 2696-2713.
307. Vernoux T., Wilson R.C., Seeley K.A., Reichheld J.-P., Muroy S., Brown S., Maughan S.C., Cobbett C.S., Van Montagu M., Inzé D., May M.J., Sung Z.R. The *Root meristemless1Cadmium sensitive2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development // *The Plant Cell*. — 2000. — V. 12, № 1. — P. 97-109.
308. Vinardell J.M., Fedorova E., Cebolla A., Kevei Z., Horvath G., Kelemen Z., Tarayre S., Roudier F., Mergaert P., Kondorosi A., Kondorosi E. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules // *The Plant Cell*. — 2003. — V. 15, № 9. — P. 2093-2105.
309. Voigt B., Timmers A.C., Šamaj J., Müller J., Baluška F., Menzel D. GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings // *European Journal of Cell Biology*. — 2005. — V. 84, № 6. — P. 595-608.
310. Voroshilova V.A., Boesten B., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Priefer U.B. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 4. — P. 471-476.
311. Voroshilova V.A., Demchenko K.N., Brewin N.J., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads // *New Phytologist*. — 2009. — V. 181, № 4. — P. 913-923.
312. Wagner G., Charton S., Lariagon C., Laperche A., Lugan R., Hopkins J., Frendo P., Bouchereau A., Delourme R., Gravot A., Manzanares-Dauleux M.J. Metabotyping: A new approach to investigate rapeseed (*Brassica napus* L.) Genetic diversity in the metabolic response to clubroot infection // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2012. — V. 25, № 11. — P. 1478-1491.

313. Wais R.J., Galera C., Oldroyd G., Catoira R., Penmetsa R.V., Cook D., Gough C., Dénarié J., Long S.R. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2000. — V. 97, № 24. — P. 13407-13412.
314. Walker S.A., Viprey V., Downie J.A. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2000. — V. 97, № 24. — P. 13413-13418.
315. Wang C., Yu H., Luo L., Duan L., Cai L., He X., Wen J., Mysore K.S., Li G., Xiao A., Duanmu D., Cao Y., Hong Z., Zhang Z. *Nodules with activated defense 1* is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula* // New Phytologist. — 2016. — V. 212, № 1. — P. 176-191.
316. Wang D., Griffiths J., Starker C., Fedorova E., Limpens E., Ivanov S., Bisseling T., Long S. A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis // Science. — 2010. — V. 327, № 5969. — P. 1126-1129.
317. Wingate V.P.M., Lawton M.A., Lamb C.J. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes // Plant Physiology. — 1988. — V. 87, № 1. — P. 206-210.
318. Wirtz M., Hell R. Dominant-negative modification reveals the regulatory function of the multimeric cysteine synthase protein complex in transgenic tobacco // The Plant Cell. — 2007. — V. 19, № 2. — P. 625-639.
319. Wisniewski J.-P., Rathbun E.A., Knox J.P., Brewin N.J. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule Initiation by *Rhizobium leguminosarum* // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2000. — V. 13, № 4. — P. 413-420.
320. Wu Y., Zhou J.-M. Receptor-like kinases in plant innate immunity // Journal of Integrative Plant Biology. — 2013. — V. 55, № 12. — P. 1271-1286.
321. Xiang C., Oliver D.J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis* // The Plant Cell. — 1998. — V. 10, № 9. — P. 1539-1550.
322. Xiao T.T., Schilderink S., Moling S., Deinum E.E., Kondorosi E., Franssen H., Kulikova O., Niebel A., Bisseling T. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules // Development. — 2014. — V. 141, № 18. — P. 3517-3528.
323. Yang L., El Msehli S., Benyamina S., Lambert A., Hopkins J., Cazareth J., Pierre O., Hérouart D., Achi-Smiti S., Boncompagni E., Frendo P. Glutathione deficiency in *Sinorhizobium meliloti* does not impair bacteroid differentiation but induces early senescence in the interaction with *Medicago truncatula* // Frontiers in Plant Science. — 2020. — V. 11, № 137.

324. Yang S., Tang F., Gao M., Krishnan H.B., Zhu H. *R* gene-controlled host specificity in the legume–rhizobia symbiosis // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2010. — V. 107, № 43. — P. 18735-18740.
325. Yang W.C., de Blank C., Meskiene I., Hirt H., Bakker J., van Kammen A., Franssen H., Bisseling T. *Rhizobium* nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation // The Plant Cell. — 1994. — V. 6, № 10. — P. 1415-1426.
326. Yano K., Shibata S., Chen W.-L., Sato S., Kaneko T., Jurkiewicz A., Sandal N., Banba M., Imaizumi-Anraku H., Kojima T., Ohtomo R., Szczyglowski K., Stougaard J., Tabata S., Hayashi M., Kouchi H., Umehara Y. CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume–*Rhizobium* symbiosis // The Plant Journal. — 2009. — V. 60, № 1. — P. 168-180.
327. Yasuda M., Miwa H., Masuda S., Takebayashi Y., Sakakibara H., Okazaki S. Effector-triggered immunity determines host genotype-specific incompatibility in Legume–*Rhizobium* symbiosis // Plant and Cell Physiology. — 2016. — V. 57, № 8. — P. 1791-1800.
328. Yu H., Bao H., Zhang Z., Cao Y. Immune signaling pathway during terminal bacteroid differentiation in nodules // Trends in Plant Science. — 2019. — V. 24, № 4. — P. 299-302.
329. Zaffagnini M., Bedhomme M., Lemaire S.D., Trost P. The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts // Plant Science. — 2012. — V. 185-186. — P. 86-96.
330. Zhang B., Ramonell K., Somerville S., Stacey G. Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis* // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2002. — V. 15, № 9. — P. 963-970.
331. Zhang X., Dong W., Sun J., Feng F., Deng Y., He Z., Oldroyd G.E.D., Wang E. The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling // The Plant Journal. — 2015. — V. 81, № 2. — P. 258-267.
332. Zhao R., Liu L.X., Zhang Y.Z., Jiao J., Cui W.J., Zhang B., Wang X.L., Li M.L., Chen Y., Xiong Z.Q., Chen W.X., Tian C.F. Adaptive evolution of rhizobial symbiotic compatibility mediated by co-evolved insertion sequences // The ISME Journal. — 2018. — V. 12, № 1. — P. 101-111.
333. Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J. The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2008. — V. 21, № 12. — P. 1600-1608.
334. Zhukov V.A., Zhernakov A.I., Kulaeva O.A., Ershov N.I., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. *De Novo* assembly of the pea (*Pisum sativum* L.)

- nodule transcriptome // *International Journal of Genomics*. — 2015. — V. 2015. — P. 695947.
335. Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts agrobacterium-mediated transformation // *Cell*. — 2006. — V. 125, № 4. — P. 749-760.
336. Zipfel C., Oldroyd G.E.D. Plant signalling in symbiosis and immunity // *Nature*. — 2017. — V. 543. — P. 328-336.
337. Zuo W., Chao Q., Zhang N., Ye J., Tan G., Li B., Xing Y., Zhang B., Liu H., Fengler K.A., Zhao J., Zhao X., Chen Y., Lai J., Yan J., Xu M. A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut // *Nature Genetics*. — 2015. — V. 47, № 2. — P. 151-157.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. – Относительный уровень экспрессии генов в корнях с клубеньками *P. sativum* дикого типа и мутантов по генам *sym40-1*, *sym33-2* и *sym33-3*, обработанных растворами 0,1 мМ или 1 мМ глутатиона (GSH) через 2 недели после инокуляции

Образец	Ген	Значение относительной экспрессии*	SEM
ДТ	<i>Cyp15a</i>	0,71628	0,08417
ДТ + BSO	<i>Cyp15a</i>	1,46812	0,04990
ДТ + BSO + GSH	<i>Cyp15a</i>	1,80612	0,15373
<i>sym40-1</i>	<i>Cyp15a</i>	0,65908	0,03929
<i>sym40-1</i> + BSO	<i>Cyp15a</i>	0,72947	0,08849
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>Cyp15a</i>	0,79579	0,27642
<i>sym33-3</i>	<i>Cyp15a</i>	0,94520	0,10540
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>Cyp15a</i>	0,65253	0,07346
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>Cyp15a</i>	0,54879	0,01053
<i>sym33-2</i>	<i>Cyp15a</i>	0,59612	0,00169
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>Cyp15a</i>	1,08821	0,07497
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>Cyp15a</i>	0,81945	0,02666
ДТ	<i>EFD</i>	0,01731	0,00078
ДТ + BSO	<i>EFD</i>	0,01652	0,00153
ДТ + BSO + GSH	<i>EFD</i>	0,02074	0,00123
<i>sym40-1</i>	<i>EFD</i>	0,06031	0,00098
<i>sym40-1</i> + BSO	<i>EFD</i>	0,05782	0,00723
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>EFD</i>	0,03092	0,00361
<i>sym33-3</i>	<i>EFD</i>	0,00457	0,00076
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>EFD</i>	0,00089	0,00008
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>EFD</i>	0,00193	0,00007
<i>sym33-2</i>	<i>EFD</i>	0,00146	0,00003
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>EFD</i>	0,00088	0,00007
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>EFD</i>	0,00072	0,00003
ДТ	<i>GSH1</i>	0,04463	0,00198
ДТ + BSO	<i>GSH1</i>	0,18470	0,00314
ДТ + BSO + GSH	<i>GSH1</i>	0,07642	0,00109
<i>sym40-1</i>	<i>GSH1</i>	0,03901	0,00260

<i>sym40-1</i> + BSO	<i>GSH1</i>	0,23456	0,01273
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>GSH1</i>	0,10749	0,00277
<i>sym33-3</i>	<i>GSH1</i>	0,08059	0,00698
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>GSH1</i>	0,43688	0,01014
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>GSH1</i>	0,11458	0,00778
<i>sym33-2</i>	<i>GSH1</i>	0,05086	0,00364
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>GSH1</i>	0,24882	0,00881
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>GSH1</i>	0,13709	0,00852
ДТ	<i>GSHS</i>	0,00983	0,00099
ДТ + BSO	<i>GSHS</i>	0,03107	0,00022
ДТ + BSO + GSH	<i>GSHS</i>	0,02127	0,00070
<i>sym40-1</i>	<i>GSHS</i>	0,00495	0,00045
<i>sym40-1</i> + BSO	<i>GSHS</i>	0,01601	0,00154
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>GSHS</i>	0,00672	0,00016
<i>sym33-3</i>	<i>GSHS</i>	0,00929	0,00090
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>GSHS</i>	0,06291	0,00398
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>GSHS</i>	0,00803	0,00331
<i>sym33-2</i>	<i>GSHS</i>	0,00438	0,00045
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>GSHS</i>	0,02403	0,00101
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>GSHS</i>	0,00942	0,00079
ДТ	<i>hGSHS</i>	0,02889	0,00332
ДТ + BSO	<i>hGSHS</i>	0,04934	0,00306
ДТ + BSO + GSH	<i>hGSHS</i>	0,04117	0,00406
<i>sym40-1</i>	<i>hGSHS</i>	0,06064	0,00571
<i>sym40-1</i> + BSO	<i>hGSHS</i>	0,04767	0,00296
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>hGSHS</i>	0,10735	0,01376
<i>sym33-3</i>	<i>hGSHS</i>	0,03289	0,00225
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>hGSHS</i>	0,02371	0,00152
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>hGSHS</i>	0,02672	0,00096
<i>sym33-2</i>	<i>hGSHS</i>	0,12827	0,00124
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>hGSHS</i>	0,06783	0,00429
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>hGSHS</i>	0,13025	0,02347
ДТ	<i>NF-YA1</i>	0,11170	0,00445
ДТ + BSO	<i>NF-YA1</i>	0,08742	0,00660

ДТ + BSO + GSH	<i>NF-YA1</i>	0,13440	0,00353
<i>sym40-1</i>	<i>NF-YA1</i>	0,10971	0,00906
<i>sym40-1</i> + BSO	<i>NF-YA1</i>	0,11286	0,01174
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>NF-YA1</i>	0,09279	0,00585
<i>sym33-3</i>	<i>NF-YA1</i>	0,04104	0,00340
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>NF-YA1</i>	0,00514	0,00057
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>NF-YA1</i>	0,02708	0,00184
<i>sym33-2</i>	<i>NF-YA1</i>	0,01739	0,00112
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>NF-YA1</i>	0,00953	0,00281
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>NF-YA1</i>	0,01016	0,00227
ДТ	<i>PR1</i>	0,20500	0,01917
ДТ + BSO	<i>PR1</i>	0,40829	0,03164
ДТ + BSO + GSH	<i>PR1</i>	0,46762	0,03370
<i>sym40-1</i>	<i>PR1</i>	0,46818	0,04011
<i>sym40-1</i> + BSO	<i>PR1</i>	0,37119	0,00293
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>PR1</i>	0,54108	0,03275
<i>sym33-3</i>	<i>PR1</i>	1,90489	0,04622
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>PR1</i>	0,58900	0,02060
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>PR1</i>	1,05318	0,06853
<i>sym33-2</i>	<i>PR1</i>	0,64657	0,03213
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>PR1</i>	0,58488	0,01936
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>PR1</i>	0,79526	0,12862
ДТ	<i>PR10</i>	0,14748	0,01450
ДТ + BSO	<i>PR10</i>	0,25866	0,01881
ДТ + BSO + GSH	<i>PR10</i>	0,31942	0,00434
<i>sym40-1</i>	<i>PR10</i>	0,20197	0,01342
<i>sym40-1</i> + BSO	<i>PR10</i>	0,30259	0,02057
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>PR10</i>	0,39508	0,01248
<i>sym33-3</i>	<i>PR10</i>	1,52198	0,13554
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>PR10</i>	0,29016	0,00299
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>PR10</i>	1,17392	0,04595
<i>sym33-2</i>	<i>PR10</i>	0,32376	0,02832
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>PR10</i>	0,31305	0,03684
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>PR10</i>	0,57083	0,08374

ДТ	<i>TTP</i>	0,67696	0,05249
ДТ + BSO	<i>TTP</i>	1,00186	0,09021
ДТ + BSO + GSH	<i>TTP</i>	1,12856	0,06809
<i>sym40-1</i>	<i>TTP</i>	0,59548	0,03153
<i>sym40-1</i> + BSO	<i>TTP</i>	0,59805	0,01284
<i>sym40-1</i> + BSO + GSH	<i>TTP</i>	0,61344	0,03651
<i>sym33-3</i>	<i>TTP</i>	0,73897	0,06486
<i>sym33-3</i> + BSO	<i>TTP</i>	0,60780	0,03158
<i>sym33-3</i> + BSO + GSH	<i>TTP</i>	0,41363	0,00650
<i>sym33-2</i>	<i>TTP</i>	0,64873	0,04781
<i>sym33-2</i> + BSO	<i>TTP</i>	0,74950	0,06592
<i>sym33-2</i> + BSO + GSH	<i>TTP</i>	0,55296	0,03134

* – Данные представляют собой среднее значение для трех повторностей. Уровень транскриптов определяли с помощью ПЦР в реальном времени и анализировали методом ΔCT, используя глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (*GAPC1*) в качестве референсного гена. Уровни экспрессии генов сравнивали с использованием двустороннего дисперсионного анализа ($P < 0,05$).

Таблица 2. – Относительный уровень экспрессии генов в корнях с клубеньками *P. sativum* дикого типа и мутанта по гену *sym33-3*, обработанных растворами 0,1 мМ или 1 мМ глутатиона (GSH) через 2 недели после инокуляции

Образец	Ген	Значение относительной экспрессии*	SEM
ДТ	<i>Cyp15a</i>	0,315556786	0,026316
ДТ + 0.1 мМ GSH	<i>Cyp15a</i>	0,561954351	0,026394
ДТ + 1 мМ GSH	<i>Cyp15a</i>	0,545964039	0,034546
<i>sym33-3</i>	<i>Cyp15a</i>	1,31344416	0,112169
<i>sym33-3</i> + 0.1 мМ GSH	<i>Cyp15a</i>	1,480886456	0,051213
<i>sym33-3</i> + 1 мМ GSH	<i>Cyp15a</i>	2,97967078	0,228658
ДТ	<i>EFD</i>	0,00353748	0,000144
ДТ + 0.1 мМ GSH	<i>EFD</i>	0,005402962	0,000454
ДТ + 1 мМ GSH	<i>EFD</i>	0,004619347	0,000314
<i>sym33-3</i>	<i>EFD</i>	3,8918E-05	1,85E-06
<i>sym33-3</i> + 0.1 мМ GSH	<i>EFD</i>	0,000689396	0,00026

<i>sym33-3</i> + 1 mM GSH	<i>EFD</i>	0,00038578	2,6E-05
ДТ	<i>GSH1</i>	0,02177435	0,001413
ДТ + 0.1 mM GSH	<i>GSH1</i>	0,025041746	0,001199
ДТ + 1 mM GSH	<i>GSH1</i>	0,017469769	0,001466
<i>sym33-3</i>	<i>GSH1</i>	0,066212683	0,003065
<i>sym33-3</i> + 0.1 mM GSH	<i>GSH1</i>	0,086387946	0,005046
<i>sym33-3</i> + 1 mM GSH	<i>GSH1</i>	0,084635552	0,005622
ДТ	<i>GSHS</i>	0,007560318	0,000503
ДТ + 0.1 mM GSH	<i>GSHS</i>	0,006431283	0,000749
ДТ + 1 mM GSH	<i>GSHS</i>	0,005626287	0,000172
<i>sym33-3</i>	<i>GSHS</i>	0,007576644	0,000905
<i>sym33-3</i> + 0.1 mM GSH	<i>GSHS</i>	0,012129145	0,000624
<i>sym33-3</i> + 1 mM GSH	<i>GSHS</i>	0,013321335	0,000717
ДТ	<i>hGSHS</i>	0,010183149	0,000889
ДТ + 0.1 mM GSH	<i>hGSHS</i>	0,014552733	0,000422
ДТ + 1 mM GSH	<i>hGSHS</i>	0,013365909	0,000727
<i>sym33-3</i>	<i>hGSHS</i>	0,137224598	0,009626
<i>sym33-3</i> + 0.1 mM GSH	<i>hGSHS</i>	0,185692785	0,01304
<i>sym33-3</i> + 1 mM GSH	<i>hGSHS</i>	0,15776051	0,005368
ДТ	<i>NF-YA1</i>	0,147726799	0,012563
ДТ + 0.1 mM GSH	<i>NF-YA1</i>	0,240745184	0,020412
ДТ + 1 mM GSH	<i>NF-YA1</i>	0,134287152	0,004941
<i>sym33-3</i>	<i>NF-YA1</i>	0,043370279	0,001508
<i>sym33-3</i> + 0.1 mM GSH	<i>NF-YA1</i>	0,122728125	0,004557
<i>sym33-3</i> + 1 mM GSH	<i>NF-YA1</i>	0,045498789	0,003028
ДТ	<i>PR1</i>	0,230631587	0,021975
ДТ + 0.1 mM GSH	<i>PR1</i>	0,450851516	0,0215
ДТ + 1 mM GSH	<i>PR1</i>	0,363827642	0,013628
<i>sym33-3</i>	<i>PR1</i>	0,817930632	0,038566
<i>sym33-3</i> + 0.1 mM GSH	<i>PR1</i>	0,895965396	0,064074
<i>sym33-3</i> + 1 mM GSH	<i>PR1</i>	2,403253484	0,299286
ДТ	<i>PR10</i>	0,078505897	0,004885
ДТ + 0.1 mM GSH	<i>PR10</i>	0,10144249	0,003803
ДТ + 1 mM GSH	<i>PR10</i>	0,148679029	0,008359
<i>sym33-3</i>	<i>PR10</i>	1,320682994	0,080047
<i>sym33-3</i> + 0.1 mM GSH	<i>PR10</i>	0,95215763	0,337775
<i>sym33-3</i> + 1 mM GSH	<i>PR10</i>	3,360362956	0,219232

* – Данные представляют собой среднее значение для трех повторностей
Уровень транскриптов определяли с помощью ПЦР в реальном времени и анализировали методом ΔCT , используя глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (*GAPC1*) в качестве референсного гена. Уровни экспрессии генов сравнивали с использованием двустороннего дисперсионного анализа ($P < 0,05$).