

На правах рукописи



Китаева Анна Борисовна

Сравнительный анализ организации тубулинового цитоскелета в ходе развития симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum*) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula*)

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2018

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

Научный руководитель кандидат биологических наук

Цыганов Виктор Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Лутова Людмила Алексеевна,
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Санкт-Петербургский
государственный университет»,
профессор кафедры генетики и
биотехнологии

Федорова Елена Эриковна,
кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт физиологии
растений им. К.А. Тимирязева Российской
академии наук, ведущий научный
сотрудник

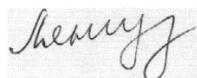
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук

Защита состоится «20» декабря 2018 г. в 14.00 ч на заседании диссертационного совета Д 002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В. Л. Комарова по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2

Тел. (812) 372-54-42, факс (812) 372-54-43. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук, dissovet.d00221102@binran.ru

Автореферат разослан “ ” октября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



И.В. Лянгузова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Растения сем. Бобовые являются важным источником растительного белка для человека и животных. Ценность Бобовых заключается в их способности, вступая в симбиоз с почвенными граммотрицательными бактериями – ризобиями, накапливать атмосферный азот. При симбиозе на корнях бобовых растений формируются специальные органы – клубеньки (Brewin, 1991).

Развитие клубенька начинается с узнавания растением-хозяином сигнальных липохитоолигосахаридов – Nod-факторов, выделяемых ризобиями в ответ на действие экскретируемых растением флавоноидов (Denarie et al., 1996). Nod-факторы запускают инфекцию корня ризобиями, а также органогенез клубенька (Oldroyd, Downie 2004). При инфекции происходит скручивание кончика корневого волоска с прикрепленными на нем ризобиями и начинается рост инфекционной нити внутри волоска. Одновременно с этим происходит инициация клеточных делений в перцикле, а также во внутренних или наружных слоях коры корня. В результате делений клеток формируется примордий клубенька. Инфекционная нить, достигнув основания клетки корневого волоска, продолжает рост через клетки коры корня по направлению к примордию. Когда она достигает клеток примордия, происходит выход ризобий в растительную клетку (Brewin, 1991; 2004). Если меристема клубенька функционирует непродолжительное время – формируются детерминированные клубеньки, характеризующиеся сферической формой. В том случае, когда меристема функционирует продолжительное время, возникают недетерминированные клубеньки, имеющие гистологическую зональность и характеризующиеся вытянутой формой (Guinel, 2009). В недетерминированном клубеньке выделяют меристему, зону инфекции и зону азотфиксации, а в зрелых клубеньках появляется и зона старения (Vasse et al., 1993). При этом можно выделить клетки на различных стадиях дифференцировки: меристематические, молодые инфицированные, зрелые инфицированные, азотфиксирующие. Также в клубеньке присутствуют неинфицированные клетки. Процесс дифференцировки растительной клетки сложен и затрагивает перестройку многих физиологических процессов, что способствует подготовке клетки к размещению ризобий и азотфиксации.

Очевидно, что в процессах дифференцировки клеток симбиотического клубенька активную роль играет реорганизация элементов цитоскелета. Цитоскелет, представленный тубулиновыми микротрубочками и актиновыми микрофиламентами, вовлечен во многие клеточные процессы: клеточные деления (Palevitz, 1987a, b; Traas et al., 1987; Schmit, Lambert, 1987; Goodbody, Lloyd, 1990), изменение формы клетки, положение органелл в клетке и их движение в цитоплазме (Hashimoto, 2003; Wasteneys, Galway, 2003; Williamson, 1993; Staiger et al., 1994). Актиновые микрофиламенты участвуют в гравитропизме (White, Sack, 1990; Baluska, Hasenstein, 1997), транспорте

везикул (Tolmie et al., 2017), защите от инфекций патогенными грибами (Kobayashi et al., 1997; Takemoto, Hardham, 2004). Тубулиновые микротрубочки участвуют в формировании веретена деления, изменении формы клетки и анизотропном росте клетки (Wasteneys, Yang, 2004), а также при развитии арбускулярно-микоризного симбиоза (Genre, Bonfante, 1997).

Хорошо изучена роль и изменения цитоскелета при развитии симбиотического клубенька на ранних этапах. Показано, что тубулиновые микротрубочки участвуют в скручивании корневого волоска и росте инфекционной нити в волоске (Cárdenas et al., 1988, 2003; Sieberer et al., 2005; Vassileva et al., 2005; Timmers et al., 2007), формировании преинфекционных нитей (Timmers et al., 1999). На поздних стадиях цитоскелет был изучен в клубеньках гороха (Davidson and Newcomb, 2001), люцерны (Timmers et al., 1998), сои (Whitehead et al. 1998) и люпина (Fedorova et al., 2007). Показано, что происходят изменения в организации цитоскелета в процессе инфицирования клеток ризобиями. Однако, не было выявлено как тубулиновые микротрубочки участвуют в росте инфекционных нитей и формировании инфекционных капель, а также распределении симбиосом в клетках клубеньков. Также не была выявлена трехмерная структура тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков в различных гистологических зонах клубенька.

Целью данной работы являлось изучение организации тубулинового цитоскелета на поздних стадиях развития симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum*) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula*).

Были сформулированы следующие **задачи**:

1. Анализ организации микротрубочек в клетках клубеньков *M. truncatula* с использованием репортерного флуоресцентного белка.
2. Создание методики иммулокализации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*.
3. Иммулокализация тубулинового цитоскелета и сравнительный анализ его организации в клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*.
4. Анализ функции тубулинового цитоскелета в распределении симбиосом в клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula* с использованием модификатора полимеризации микротрубочек оризалина.
5. Сравнительный количественный анализ паттернов распределения микротрубочек в инфицированных и неинфицированных клетках симбиотических клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*.

Научная новизна

В результате проведенных исследований создана универсальная методика визуализации клеточных структур клубеньков. Впервые выявлена трехмерная структура тубулинового цитоскелета в клетках всех

гистологических зон клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*. Впервые показано, что микротрубочки создают матрицу для роста инфекционных нитей и поддерживают инфекционные капли, подготавливая выход бактерий в цитоплазму клеток клубеньков. Впервые показано участие тубулинового цитоскелета в расположении симбиосом в азотфиксирующих клетках *P. sativum* и *M. truncatula*. Впервые выявлена связь в изменении организации кортикального цитоскелета и выхода бактерий в растительную клетку, обеспечивающего ее переход к изодиаметрическому росту, что создает необходимую предпосылку для заселения инфицированной клетки симбиосомами. Впервые проведен количественный анализ организации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*.

Теоретическая и практическая значимость

В данном исследовании выявлена роль тубулинового цитоскелета в росте и развитии инфекционных структур, выходе бактерий в растительную клетку, пространственной организации симбиосом. Полученные данные вносят существенный вклад в понимание клеточных механизмов дифференцировки клеток и развития инфекционных структур клубенька, что является теоретической основой для создания высокоэффективных растительно-микробных систем. Универсальная методика визуализации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков может быть использована и уже используется (Zhang et al., 2018) для визуализации других клеточных структур.

Положения, выносимые на защиту

1. Эндоплазматические микротрубочки направляют развитие инфекционных структур (инфекционных нитей и капель) и организуют пространственное расположение симбиосом в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula*.
2. Паттерн кортикальных микротрубочек в инфицированной клетке в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula* определяет ее изодиаметрический рост, направленный на значительное увеличение объема клетки для размещения в ней многочисленных симбиосом.
3. Видоспецифические различия, наблюдаемые между паттернами эндоплазматических микротрубочек, вовлеченных в распределение симбиосом в цитоплазме клеток клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*, связаны с различной морфологией бактериоидов

Личный вклад соискателя

Все исследования, посвященные анализу организации цитоскелета в клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*, проведены лично автором. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем работы.

Степень достоверности

Достоверность результатов обеспечена проведением исследований на современном оборудовании в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и

клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ и «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» ФГБУН БИН РАН им В.Л. Комарова с применением высокотехнологичных средств анализа данных.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на: минисимпозиуме и курсе для аспирантов «Адаптация к изменяющимся климатическим условиям в регионе Балтийского моря: вклад биотехнологии растений и микроорганизмов» (2010 г., Миккели, Финляндия), VII съезде Общества физиологов растений и конференции «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и международной научной школе «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции» (2011 г., Нижний Новгород), II (X) международной ботанической конференции молодых ученых (2012 г., Санкт-Петербург), VIII съезде Общества физиологов растений и всероссийской научной конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (2015 г., Петрозаводск), III (XI) международной ботанической конференции молодых ученых (2015г., Санкт-Петербург), 4^{ом} международном симпозиуме «Сигналинг и поведение растений» (2016 г., Санкт-Петербург), 12^{ой} европейской конференции по азотфиксации (2016 г., Будапешт, Венгрия), на годовичном собрании Общества физиологов растений и Научной конференции и школе для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (2017г., Судак), на IV (XII) международной ботанической конференции молодых ученых (2018г., Санкт-Петербург), на 10^{ом} международном симпозиуме по изучению корня (2018г., Тель-Авив, Израиль).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура работы

Диссертация изложена на 100 страницах, содержит 43 рисунка, 1 таблицу и состоит из введения, основной части, содержащей 4 главы (обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение), заключения, выводов и списка литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы приведено описание развития симбиотического клубенька, от начальных стадий развития инфекции до формирования зрелого клубенька. Описаны сигнальные пути и гормональная регуляция, лежащие в основе формирования симбиотического клубенька. Особое внимание уделено участию цитоскелета в данном процессе.

Материалы и методы

Были использованы семена гороха посевного (*Pisum sativum* L.) лабораторной линии SGE (Kosterin, Rozov, 1993) и соответствующих мутантных линий SGEFix⁻¹ (*Pssym40*), SGEFix⁻² (*Pssym33*) (Tsyganov et al., 1994, 1998), SGEFix⁻³ (*Pssym26*) (Tsyganov et al., 2000), а также лабораторной линии Sprint-2 (Бердников и др., 1989) и мутантной линии Sprint-2Fix⁻ (*Pssym31*) (Борисов и др., 1994).

Также использовали семена люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.) сорта Jemalong A17 и соответствующих мутантных линий *Mtefd-1* (Vernie et al., 2008), TR3 (*Mtipd3*) (Maunoury et al., 2010; Ovchinnikova et al., 2011), *Mtdnf-1* (Wang et al., 2010).

Трансгенные корни были получены методом агробактериальной трансформации бактериями *Agrobacterium rhizogenes*, описанным Boisson-Dernier с соавторами (2001). Для визуализации микротрубочек использовали репортерное слияние фрагмента гена, кодирующего белок млекопитающих, ассоциированный с микротрубочками MAP4 (связывающийся с микротрубочками домен (MAD)), с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) (Marc et al., 1998), находящееся под контролем промотора *Arabidopsis thaliana elongation factor 1 α* , который активно экспрессируется в клубеньках *M. truncatula* (Auriac, Timmers, 2007).

Визуализацию тубулинового цитоскелета проводили по модифицированной методике Valuška с соавторами (1992), отработанной для корней кукурузы. Для иммунолокализации клубеньки *P. sativum* и *M. truncatula* инкубировали в фиксирующем растворе (3% формальдегид, 0,25% глутаральдегид) с добавлением Tween-20, Triton X-100 в разбавленном буфере MTSB. Концентрация пермеабилizующих веществ и буфера MTSB определялась для каждого генотипа. Клубеньки заключали в воск Стивмана (Vitha et al., 1997) и приготавливали срезы на микротоме, либо заключали в блоки 3% агарозы и приготавливали срезы на микротоме с вибрирующим лезвием. Для визуализации тубулина использовали первичные моноклональные мышинные антитела к тубулину клон DM1A (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:1000 и вторичные козы антитела к мышинному гамма-глобулину, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США). Для визуализации инфекционных капель и инфекционных нитей использовали поликлональные крысиные антитела MAC265 (VandenBosch et al., 1989) в разведении 1:100 и вторичные козы антитела к крысиному гамма-глобулину, конъюгированные с Alexa Fluor 546 (Life Technologies, США). У *M. truncatula* инфекционные капли и инфекционные нити визуализировали с использованием кроличьих моноклональных антител к белку реморину (Lefebvre et al., 2010) в разведении 1:500 и вторичных козы антител к кроличьему гамма-глобулину, конъюгированных с Alexa Fluor 633 (Life Technologies, США). для визуализации ядер и бактерий использовали 4'6-диамидино-2-фенилиндо́л (DAPI) 1 мкг мл⁻¹ или йодид пропидия 0,5 мкг мл⁻¹.

Для разрушения тубулиновых микротрубочек в клетках клубеньков применяли обработку раствором оризалина по модифицированной методике (Sampathkumar et al., 2011).

Количественный анализ организации тубулинового цитоскелета производили с использованием программного обеспечения MicroFilament Analyzer (Jacques et al., 2013)

Результаты

Создание методики визуализации тубулинового цитоскелета в клубеньках

За основу методики визуализации организации тубулиновых микротрубочек в клубеньках *P. sativum* взяли методику фиксации и иммунолокализации корней кукурузы (Baluška et al., 1992). Согласно данной методике, после фиксации клубеньки *P. sativum* заключали в воск Стивмана (Vitha et al., 1997). В результате тубулиновые микротрубочки наблюдали во всех типах клеток клубеньков *P. sativum*. Однако часто микротрубочки были фрагментированы. Поэтому было решено для приготовления срезов клубеньков использовать микротом с вибрирующим лезвием с заключением клубеньков в блоки 3% агарозы. В результате во всех типах клеток клубенька наблюдали более густую сеть целых (не фрагментированных) микротрубочек. На сохранность тубулина влиял состав фиксирующего раствора, циклы вакуумирования при фиксации, температура инкубации с антителами и возраст клубеньков.

Исследование организации тубулинового цитоскелета в клубеньках *M. truncatula* начали с использованием трансгенных растений, которые несли ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) слитый с фрагментом гена, кодирующего белок млекопитающих, ассоциированный с микротрубочками MAP4. Однако, данный метод не дал удовлетворительных результатов, так как сигнал был достаточно диффузным, и конструкция не работала в клетках зоны азотфиксации. Поэтому был применен метод иммунофлуоресценции. За основу взяли методику, отработанную для клубеньков *P. sativum*. Оптимизировали состав фиксирующего раствора и возраст клубеньков для каждого генотипа.

Организация тубулинового цитоскелета в клетках меристемы и инфицированных клетках из зоны инфекции клубенька у *P. sativum* и *M. truncatula*

В клубеньках дикого типа и мутантных линий *P. sativum* и *M. truncatula* в клетках меристемы кортикальные микротрубочки были ориентированы случайным образом, перекрещивались между собой, формируя нерегулярный паттерн. Перинуклеарные микротрубочки окружали ядро. Микротрубочки участвовали в формировании препрофазного пояса и веретена деления у *P. sativum* и *M. truncatula* (Рисунок 1 А, Б).

Закончив митоз, клетки увеличиваются в размерах, происходит инфицирование клеток. В дистальной части клеток зоны инфекции (которую мы обозначили как «раннюю» зону инфекции) организация кортикальных микротрубочек была сходна с меристематическими клетками, как у линий дикого типа, так и у мутантных линий.

Организация тубулинового цитоскелета в неинфицированных клетках *P. sativum* и *M. truncatula*

Выход бактерий происходит не во всех клетках клубенька, некоторые остаются неинфицированными. В данном типе клеток в клубеньках обоих видов микротрубочки располагались параллельно друг другу и перпендикулярно продольной оси клетки, формируя регулярный паттерн (Рисунок 1 В, Г).

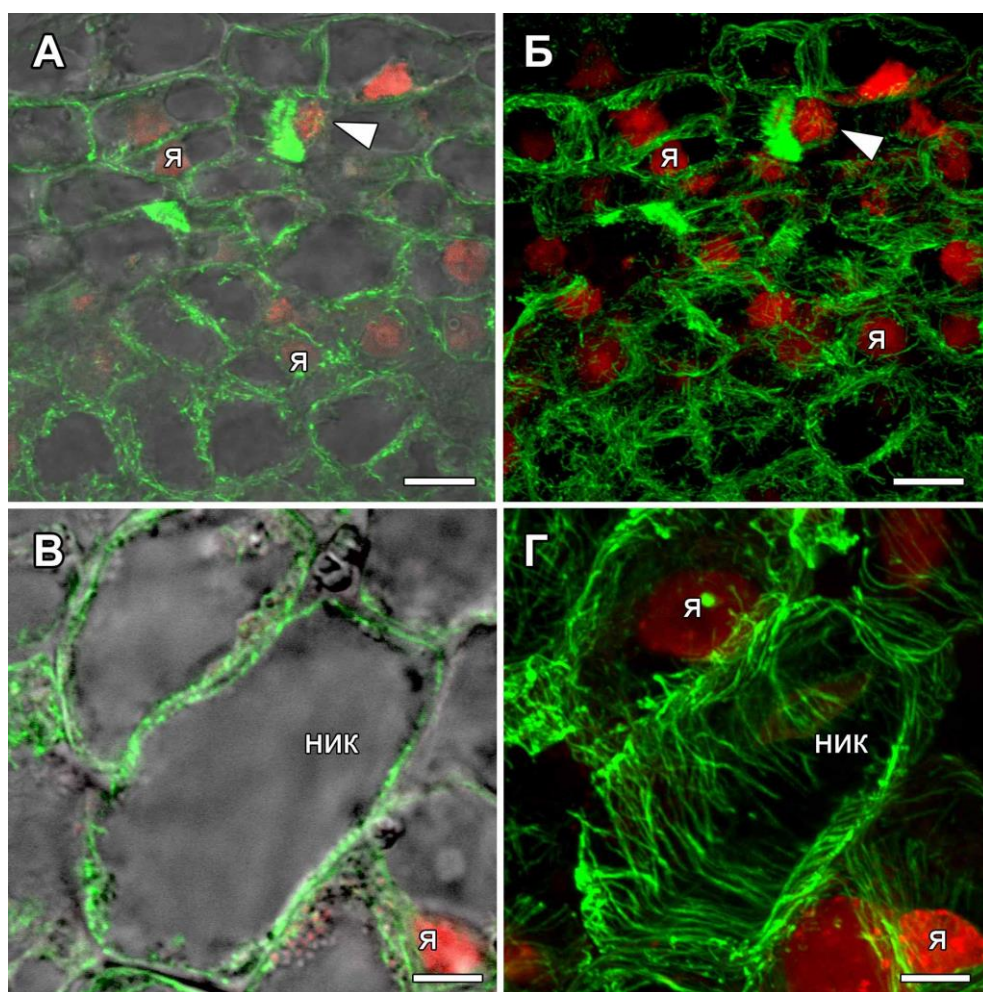


Рисунок 1. - Организация микротрубочек в меристематических и неинфицированных клетках клубеньков *M. truncatula*

(А, Б). Кортикальные микротрубочки перекрещиваются в клетках меристемы и в дистальной части зоны инфекции. (В, Г) Кортикальные микротрубочки располагаются параллельно друг другу и перпендикулярно продольной оси клетки. (А, В) наложение дифференциально-интерференционного контраста, зеленого и красного каналов, (Б, Г)

наложение зеленого и красного каналов. Проекция максимальной интенсивности, основанные на z-стеках из 29 (Б), 70 (Г) оптических срезов. Микротрубочки – зеленые, ядра и бактерии – красные. я – ядро, ник – неинфицированная клетка. Треугольники указывают на фигуры митоза. Масштабная линейка (А–Г) = 10 мкм

Организация эндоплазматических микротрубочек вдоль инфекционных нитей и вокруг инфекционных капель в клетках в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula*

В клетках линий дикого типа *P. sativum* и *M. truncatula* (Рисунок 2 А, Б) вдоль инфекционных нитей проходили утолщенные пучки микротрубочек. При этом на поперечном срезе виден образуемый микротрубочками канал, в котором располагалась инфекционная нить (Рисунок 3). Особенно наглядно данный паттерн проявлялся в клетках мутантов $SGE\text{Fix}^-2$ (*Pssym33*) и TR3 (*Mtipd3*) (Рисунок 2 В, Г), характеризующихся формированием крупных инфекционных нитей.

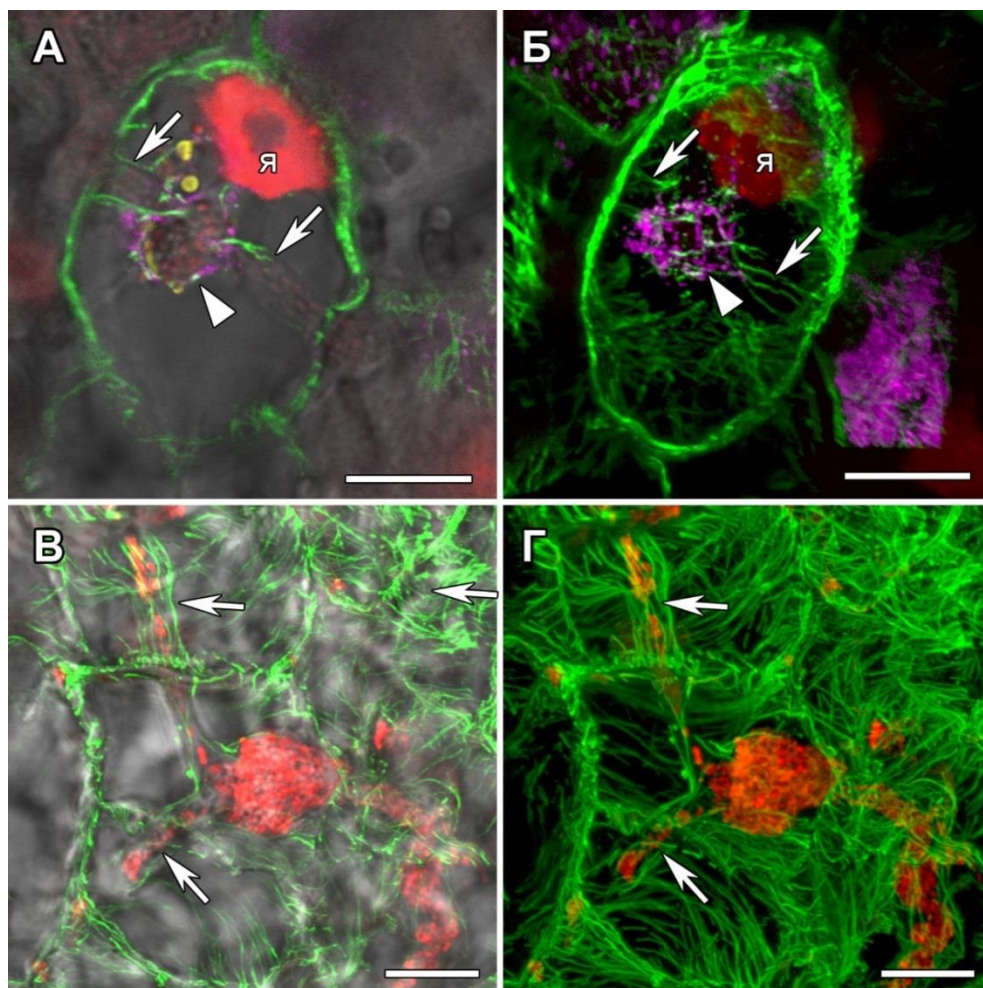


Рисунок 2. – Организация эндоплазматических микротрубочек вокруг инфекционных нитей в клубеньках *M. truncatula* линии дикого типа A17 и мутантной линии TR3 (*Mtipd3*)

Эндоплазматические микротрубочки проходят вдоль инфекционных нитей. У мутанта TR3 (*Mtipd3*) хорошо различим канал, формируемый микротрубочками, в котором растет инфекционная нить. Иммулокализация (А–Г) тубулина, (А, Б) реморина, (А) МАС265. (А, Б) Линия дикого типа А17, (В, Г) мутант TR3 (*Mtipd3*). (А) наложение дифференциально–интерференционного контраста (ДИК), зеленого, красного, желтого и пурпурного каналов, (Б) наложение зеленого, красного, и пурпурного каналов, (В) наложение ДИК, зеленого и красного каналов, (Г) наложение зеленого и красного каналов. Проекция максимальной интенсивности, основанные на z–стеках из 75 (Б), 80 (Г) оптических срезов. Микротрубочки – зеленые, ядра и бактерии – красные, инфекционные капли, меченные МАС265, – желтые, инфекционные капли и симбиосомы, меченные иммунной сывороткой к реморину, – пурпурные. я – ядро; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники – инфекционные капли. Масштабная линейка (А–Е) = 10 мкм.

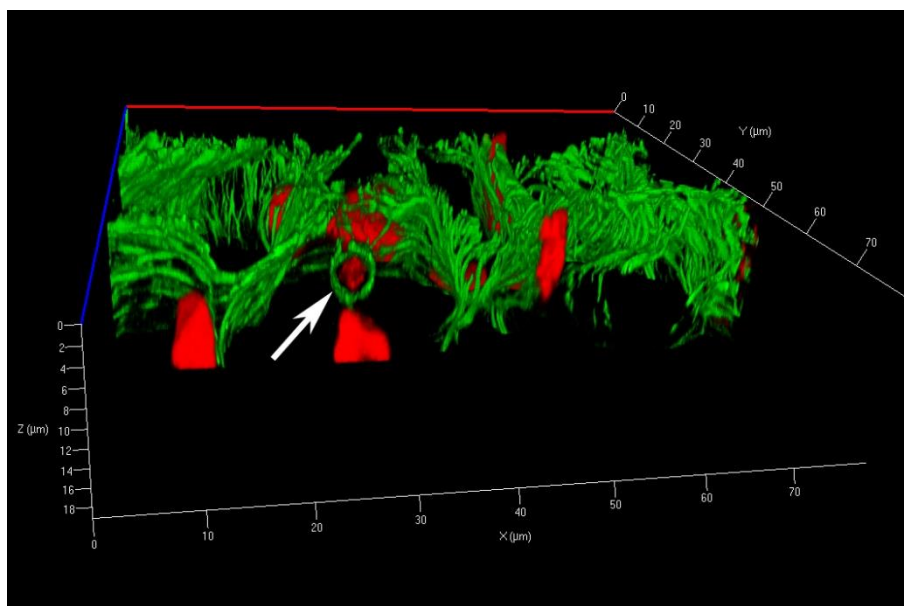


Рисунок 3. – Организация эндоплазматических микротрубочек вокруг инфекционных нитей в клубеньках *P. sativum* линии дикого типа SGE

Виден канал (указан стрелкой), формируемый микротрубочками, в котором формируется инфекционная нить. Микротрубочки – зеленые, ядра – красные.

На инфекционной нити образуются инфекционные капли, из которых затем выходят бактерии. В клубеньках линий дикого типа SGE и А17 (Рисунок 4 А, Б) инфекционные капли были окружены плотной сетью эндоплазматических микротрубочек, вероятно, подготавливая выход бактерий. У мутантных линий *P. sativum* SGEFix⁻¹ (*Pssym40*) и *M. truncatula*

Mtefd-1 (Рисунок 4 В, Г), образующих гипертрофированные инфекционные капли, также наблюдали сеть эндоплазматических микротрубочек, окружающих инфекционные капли и соединяющие их с плазматической мембраной.

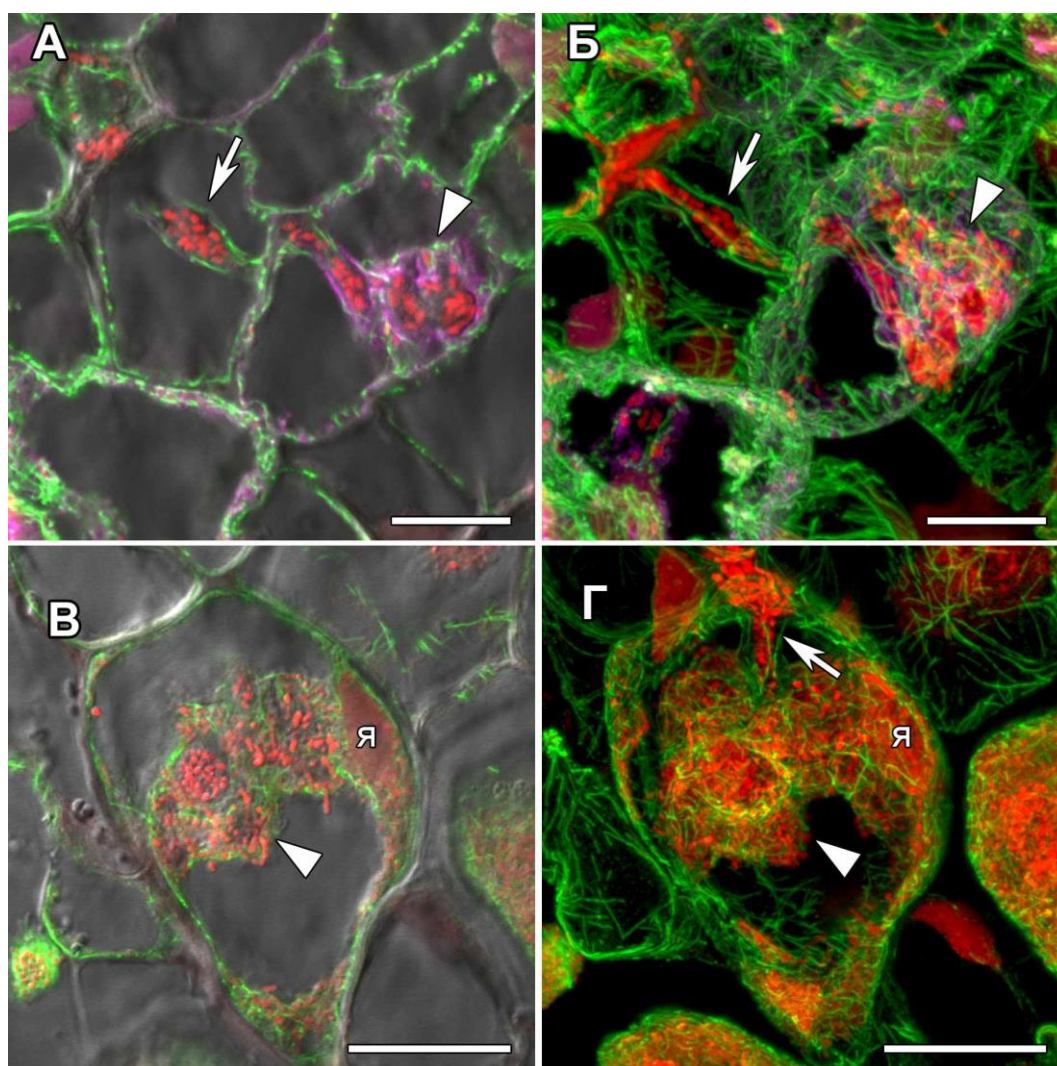


Рисунок 4. - Организация эндоплазматических микротрубочек вокруг инфекционных капель в клетках клубеньков *M. truncatula* линии дикого типа A17 и мутантной линии *Mtefd-1*

Эндоплазматические микротрубочки окружают инфекционные капли и ассоциированы с периферией клетки. (А, Б) Линия дикого типа A17, (В, Г) мутантная линия *Mtefd-1*. Иммунолокализация (А–Г) тубулина, (А, Б) реморина. (А) наложение дифференциально–интерференционного контраста (ДИК), зеленого, красного и пурпурного каналов, (Б) наложение зеленого, красного и пурпурного каналов, (В) наложение ДИК, зеленого и красного канала, (Г) наложение зеленого и красного каналов. Проекция максимальной интенсивности, основанные на z–стеках из 60 (Б), 100 (Г) оптических срезов. Микротрубочки – зеленые, ядра и бактерии – красные, инфекционные капли и симбиосомы меченные иммунной сывороткой к реморину – пурпурные; я – ядро. Стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники – инфекционные капли. Масштабная линейка (А, Б) = 10 мкм, (В, Г) = 20 мкм.

Реорганизация кортикальных микротрубочек в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula* при вторичном выходе бактерий в цитоплазму клеток хозяина в зоне азотфиксации

В зоне азотфиксации клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula* наблюдались колонизированные клетки, которые содержали инфекционные структуры: инфекционные нити и капли, из которых не происходил выход бактерий. Организация кортикальных микротрубочек в таких клетках была сходна с организацией кортикальных микротрубочек неинфицированных клеток, т.е. в них наблюдался регулярный паттерн (Рисунок 5 А, Б). В некоторых подобных клетках наблюдали единичные вышедшие бактерии (Рисунок 5 В, Г). Данный процесс был обозначен нами как «вторичный выход», так как он, в отличие от «первичного» выхода происходит не в зоне инфекции, а в зоне азотфиксации. При этом наблюдавшийся регулярный паттерн микротрубочек менялся на нерегулярный. С использованием мутанта *P. sativum* SGEFix⁻² (*Pssym33*), формирующего хорошо развитую сеть «запертых» инфекционных нитей, из которых не происходит выхода бактерий, было показано, что в колонизированных клетках поддерживается регулярный паттерн кортикальных микротрубочек (Рисунок 5 Д). В то же время в отдельных клетках клубеньков у данного мутанта происходит выход бактерий, и в таких клетках кортикальные микротрубочки формируют нерегулярный паттерн (Рисунок 5Е).

Организация тубулинового цитоскелета в инфицированных клетках зоны азотфиксации *P. sativum* и *M. truncatula*

В клетках зоны азотфиксации тубулиновый цитоскелет представлен многочисленными пучками эндоплазматических микротрубочек, организующих расположение симбиосом в клетках линий дикого типа SGE (Рисунок 6 А, Б) и Sprint2. Бактероиды в клубеньках линии дикого типа *M. truncatula* A17 характеризуются удлиненной формой и симбиосомы располагаются в клетке радиально и параллельно друг другу (Рисунок 6 В, Г). Пучки эндоплазматических микротрубочек при этом располагались параллельно симбиосомам.

Применение оризалина – модификатора полимеризации микротрубочек позволило подтвердить их участие в пространственной ориентации симбиосом. При концентрации оризалина 50 мкМ и инкубации в течение 48 ч наблюдали разрушение микротрубочек в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula* (Рисунок 7 В). При этом наблюдались изменения в ориентации симбиосом в клубеньках обоих видов, что особенно проявлялось в клубеньках *M. truncatula*, в которых симбиосомы под действием оризалина располагались в отличие от контроля не радиально и параллельно друг другу (Рисунок 7 А, Б), а хаотично (Рисунок 7 В, Г).

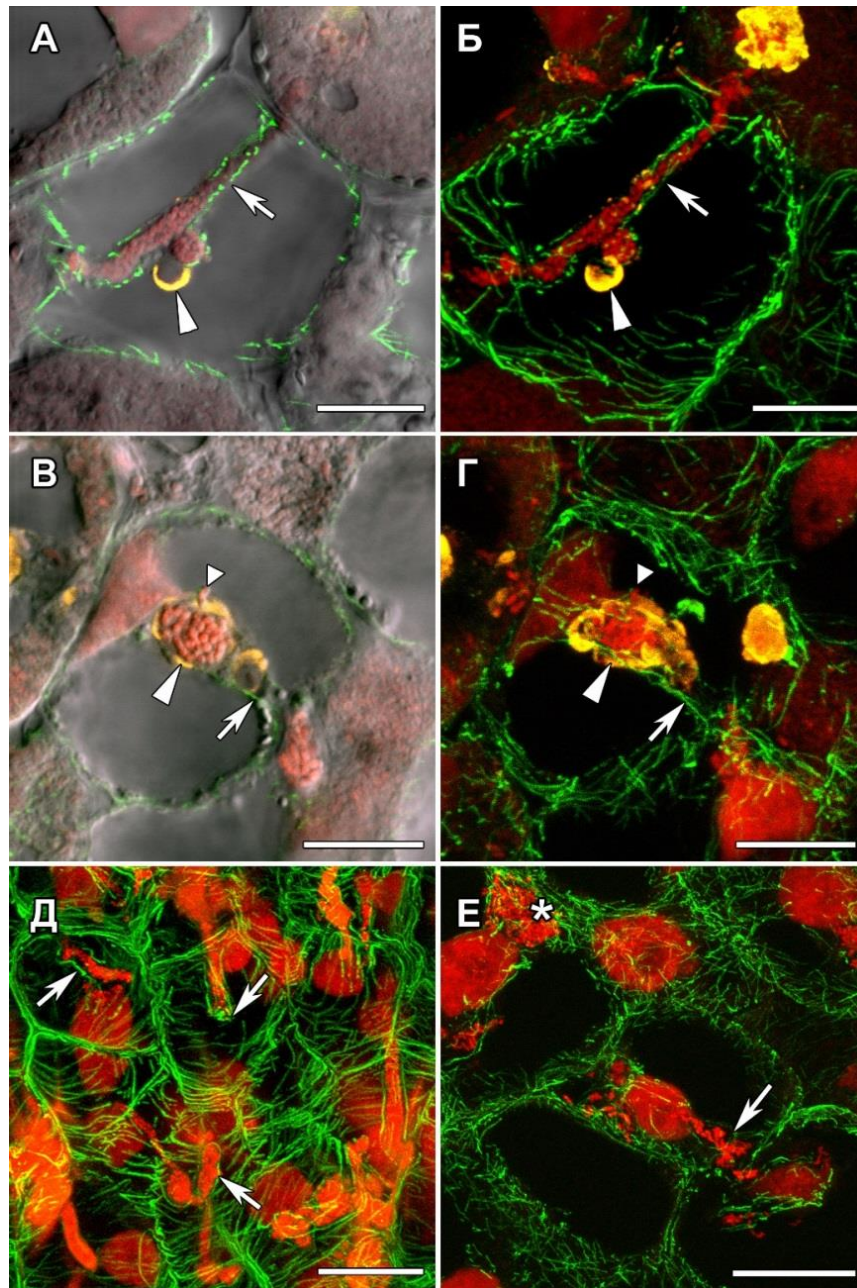


Рисунок 5. – Организация кортикальных микротрубочек в клетках до и после выхода бактерий в клубеньках *P. sativum*

Параллельное расположение пучков кортикальных микротрубочек в колонизированной клетке линии дикого типа, содержащей инфекционные нити и инфекционные капли (А, Б), в клубеньке мутанта *SGEFix⁻²* (*Pssym33*), микротрубочки сохраняют поперечную организацию в клетках, заполненных сетью инфекционных нитей (Д). При выходе бактерий регулярный поперечный порядок нарушался (В, Г, Е). Иммулокализация (А–Е) тубулина, (А–Г) MAC265. (А–Г) линия дикого типа SGE, (Д, Е) мутантная линия *SGEFix⁻²* (*Pssym33*). (А, Б, Д) до выхода бактерий, (В, Г, Е) после выхода бактерий. (А, В) наложение дифференциально-интерференционного контраста, зеленого, красного и желтого каналов, (Б, Г) наложение зеленого, красного и желтого каналов, (Д, Е) наложение зеленого и красного каналов. Проекция максимальной интенсивности, основанная на

z-стеках из 62 (Б), 59 (Г), 20 (Д), 36 (Е) оптических срезов. Микротрубочки – зеленые, ядра и бактерии – красные, инфекционные капли, меченные антителом MAC265 – желтые. Треугольники указывают на инфекционные капли, стрелки – инфекционные нити, маленький треугольник – высвобождающуюся бактерию, звездочка – вышедшие бактерии. Масштабная линейка (А–Е) = 10 мкм.

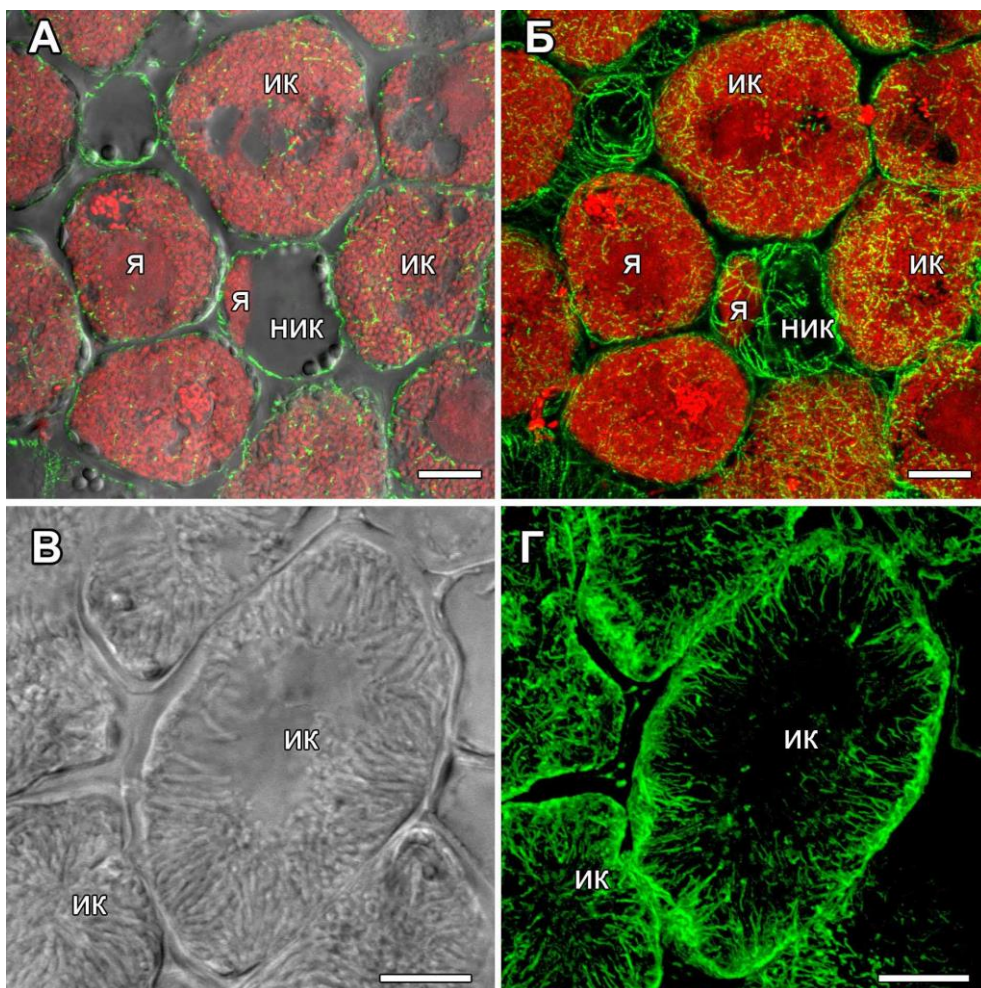


Рисунок 6. – Организация микротрубочек в инфицированных клетках зоны азотфиксации клубеньков *P. sativum* линии дикого типа SGE и *M. truncatula* линии дикого типа A17.

В клубеньках *P. sativum* симбиосомы располагаются в инфицированных клетках неупорядоченно (А, Б). В клубеньках *M. truncatula* симбиосомы располагаются радиально и параллельно друг другу (В, Г). (А, Б, Г) иммунолокализация тубулина. (А) наложение дифференциально-интерференционного контраста (ДИК), зеленого и красного каналов, (Б) наложение зеленого и красного каналов, (В) ДИК, (Г) зеленый канал. Проекции максимальной интенсивности, основанные на z-стеках из 51 (Б), 16 (Г) оптических срезов, Микротрубочки – зеленые, ядра и бактерии – красные, я – ядро, ик – инфицированная клетка, ник – неинфицированная клетка. Масштабная линейка (А–Г) = 10 мкм.

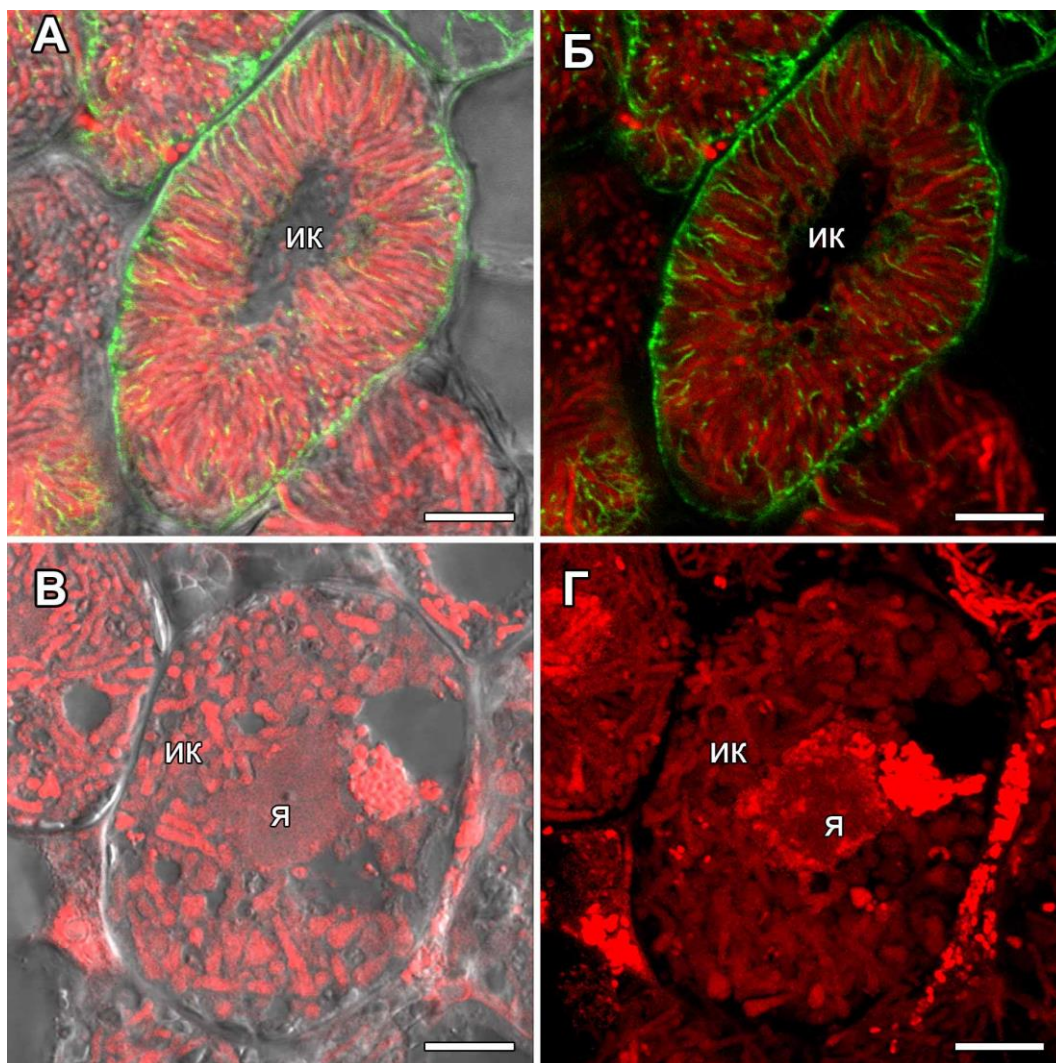


Рисунок 7. - Действие оризалина на тубулиновый цитоскелет клеток клубеньков *M. truncatula* линии дикого типа A17

Разрушение микротрубочек и деградация симбиосом в клетках зоны азотфиксации после инкубации клубеньков в растворе оризалина. (А, Б) контроль, (В, Г) инкубация в 50 мкМ растворе оризалина. (А) наложение дифференциально–интерференционного контраста зеленого и красного каналов, (Б) наложение зеленого и красного каналов, (В) наложение дифференциально–интерференционного контраста и красного канала, (Г) красный канал. Проекции максимальной интенсивности, основанные на z-стеках из 35 (Б), 25 (Г) оптических срезов. Микротрубочки – зеленые, бактерии и ядра - красные. ик – инфицированная клетка, я – ядро. Масштабная линейка (А–Г) = 10 мкм.

Количественный анализ организации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*

При анализе тубулинового цитоскелета в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula* были выявлены различающиеся паттерны микротрубочек в инфицированных и неинфицированных клетках. Для подтверждения визуально наблюдаемых различий применили количественный анализ с

использованием программы MicroFilament Analyzer (Jacques et al., 2013). Данная программа определяет углы наклона отдельных микротрубочек относительно продольной оси клетки. Были проанализированы азотфиксирующие и неинфицированные клетки *P. sativum* и *M. truncatula*. Результаты анализа подтвердили наблюдаемые визуально различия паттернов микротрубочек азотфиксирующих и неинфицированных клеток (Рисунок 8).

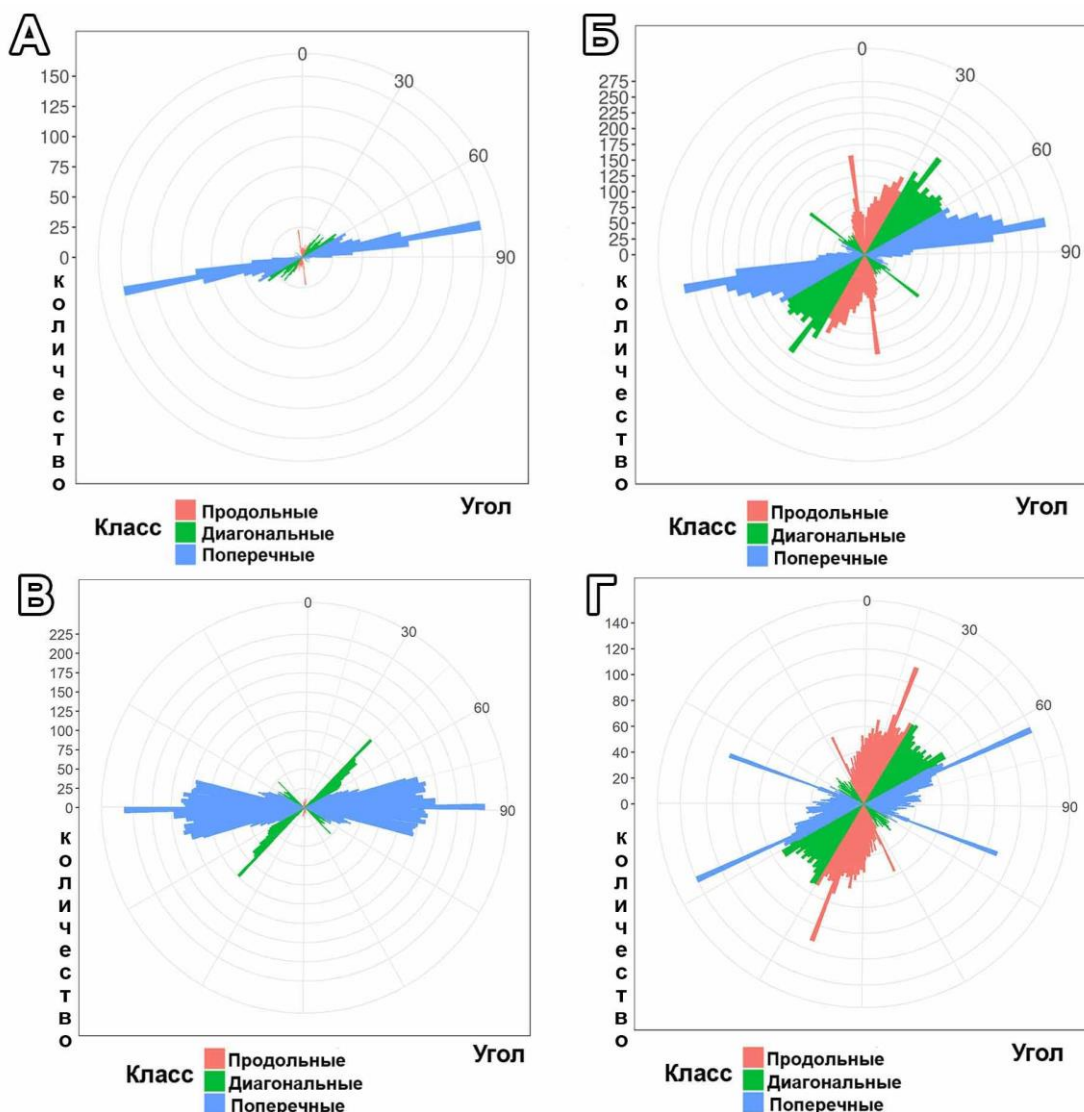


Рисунок 8. Количественный анализ ориентации микротрубочек в инфицированной и неинфицированной клетках азотфиксирующих клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*

(А, Б) клетки клубеньков *P. sativum* линии дикого типа SGE, (В, Г) клетки клубеньков *M. truncatula* линии дикого типа A17. (А, В) количество отдельных микротрубочек с определенным углом наклона относительно продольной оси клетки в неинфицированной клетке, (Б, Г) количество отдельных микротрубочек с определенным углом наклона относительно продольной оси клетки в инфицированной клетке.

Обсуждение

Тубулиновый цитоскелет участвует во многих клеточных процессах. Хорошо изучена роль микротрубочек на ранних этапах формирования симбиотического клубенька (Timmers et al., 1999). Микротрубочки участвуют в скручивании корневого волоска, росте инфекционной нити в корневом волоске и в клетках коры корня. Данные о роли тубулинового цитоскелета в инфицировании и дифференцировке клеток клубенька немногочисленны (Timmers et al., 1998; Davidson, Newcomb, 2001; Fedorova et al., 2007). Ранее изучался тубулиновый цитоскелет клеток клубеньков *P. sativum* (Davidson, Newcomb, 2001), но ясной картины организации микротрубочек не было получено, в том числе отсутствовали данные о ассоциации микротрубочек с инфекционными структурами (Timmers, 2008). Так, например, была описана диффузная флуоресценция вокруг инфекционных нитей в клубеньках *P. sativum* (Davidson, Newcomb, 2001).

Важным этапом данной работы явилась разработка методики. Растения *P. sativum* плохо поддаются трансформации и получение трансгенных клубеньков является сложной задачей (Iantcheva et al., 2013). Поэтому нами была проведена разработка методики иммунолокализации тубулинового цитоскелета в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula* с учетом особенностей каждого генотипа. В результате был разработан протокол визуализации микротрубочек в клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*. В качестве альтернативного метода использован метод визуализации с помощью репортерных флуоресцентных белков. Оказалось, что данный метод чувствителен к пробоподготовке и может давать значительные артефакты. Также использованная конструкция не позволяла визуализировать цитоскелет в инфицированных клетках зоны азотфиксации.

В ходе проведенного исследования были получены трехмерные изображения организации тубулинового цитоскелета в клетках *P. sativum* и *M. truncatula* для каждой гистологической зоны клубенька. Тубулиновый цитоскелет присутствует во всех типах клеток, в зоне инфекции разборка микротрубочек не наблюдалась, как было ранее описано для клубеньков люцерны посевной (Timmers et al., 1998).

Показано, что организация микротрубочек в клетках меристемы обоих видов не отличается. Кончики инфекционных нитей доходят до клеток меристемы. Однако не найдены структуры сходные с преинфекционными нитями, которые образуются при росте инфекционной нити в клетках коры корня. Показано, что рост инфекционной нити сопровождается тубулиновыми микротрубочками. Микротрубочки образуют канал, в котором располагается инфекционная нить. В формировании инфекционных капель также принимает участие тубулиновый цитоскелет, в том числе и в ходе их гипертрофированного развития. Клубеньки *P. sativum* и *M. truncatula* характеризуются различной морфологией бактериоидов, которая влияет на организацию эндоплазматических микротрубочек. В клубеньках *P. sativum* симбиосомы располагаются хаотично, эндоплазматические микротрубочки

расположены неупорядоченно, поддерживая группы симбиосом. В клубеньках люцерны симбиосомы расположены радиально и параллельно друг другу. Организация эндоплазматических микротрубочек повторяет организацию симбиосом: радиально и параллельно друг другу. С использованием модификатора полимеризации микротрубочек – оризалина было подтверждено, что микротрубочки отвечают за расположение симбиосом в инфицированной клетке.

Обнаружены различные паттерны организации кортикальных микротрубочек неинфицированных и инфицированных клеток. В неинфицированных клетках микротрубочки располагаются параллельно друг другу и перпендикулярно продольной оси клетки, в инфицированных клетках наблюдалась неупорядоченная организация. Полученные данные согласуются с предыдущими работами (Davidson, Newcomb, 2001). Применение количественного анализа путем подсчета углов ориентации микротрубочек подтвердило визуальные наблюдения.

Нами было показано, что в ходе дифференцировки в клетках клубенька кортикальные микротрубочки организуют регулярный паттерн, также как это происходит в клетках корня (Hogetsu, Oshima, 1986; Bichet et al., 2001; Takahashi et al., 2003; Adamakis et al., 2010) (Рисунок 9). При этом такой паттерн формируется не только в неинфицированных клетках, но и в колонизированных клетках, т.е. в клетках содержащих инфекционные структуры – нити и капли. В то же время в инфицированных клетках при выходе бактерий кортикальные микротрубочки организуются в нерегулярный паттерн, который, вероятно, необходим для изодиаметрического роста клетки, направленного на значительное увеличение ее объема для заселения многочисленными симбиосомами.

Было выявлено, что отсутствие дифференцировки бактериоидов приводит к разрушению тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков *M. truncatula*, однако оно не влияет на микротрубочки в клетках клубеньков *P. sativum*.

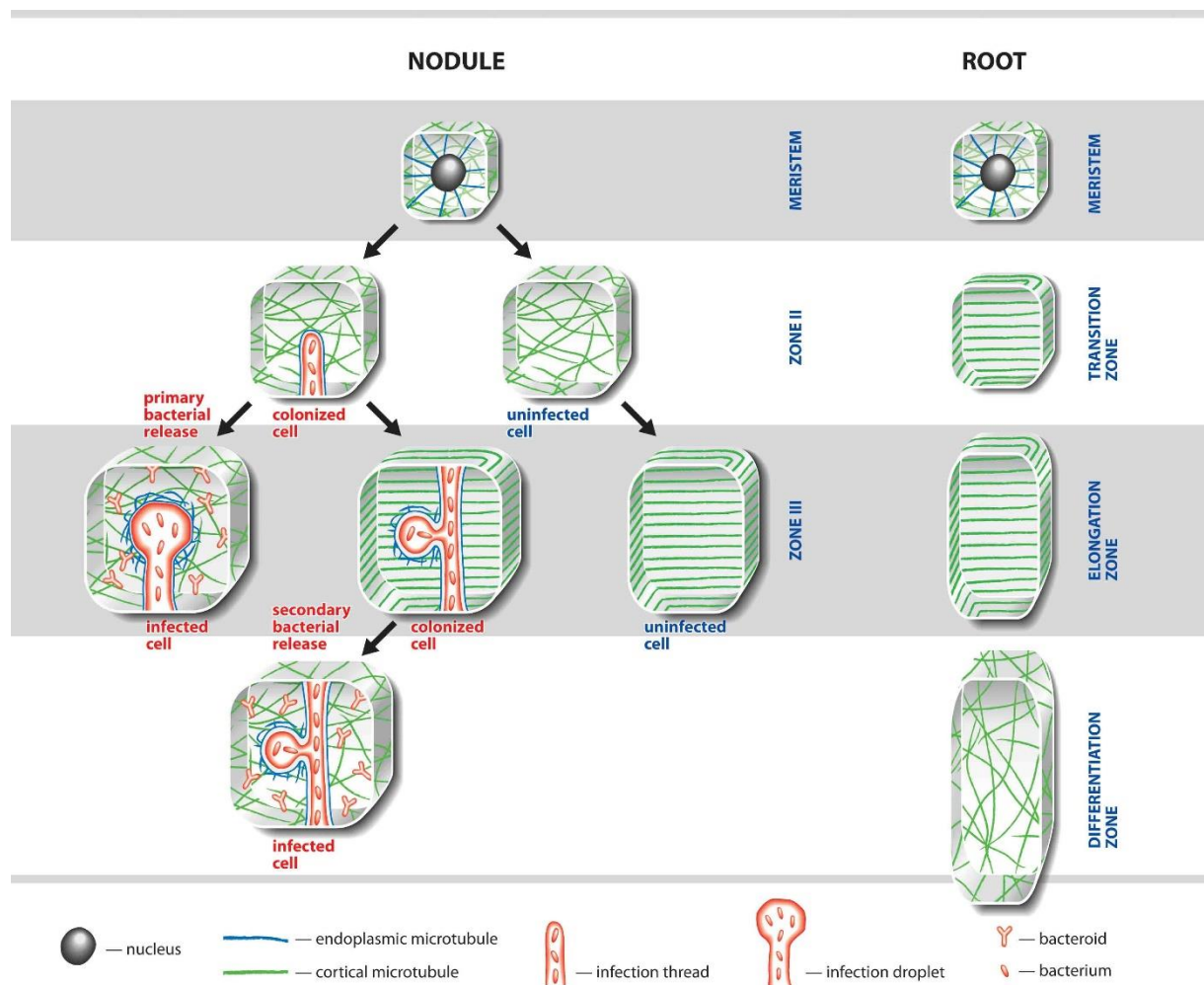


Рисунок 9. - Схема организации кортикальных и эндоплазматических микротрубочек в различных гистологических зонах корня и клубенька у *P. sativum* и *M. truncatula*

Кортикальные микротрубочки обозначены зеленым цветом, эндоплазматические – голубым, симбиотические структуры (инфекционные нити, инфекционные капли, бактерии и симбиосомы) – красным. Черные шары – ядра. Выделяются два паттерна кортикальных микротрубочек: нерегулярный (микротрубочки перекрещиваются) и регулярный (микротрубочки расположены параллельно друг другу и перпендикулярно продольной оси клетки) (Kitaeva, et al. 2016).

Заключение

Таким образом, дифференцировка клеток клубенька сопровождается изменением организации тубулинового цитоскелета. Показано, что паттерн кортикальных микротрубочек меняется от регулярного к нерегулярному после выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки, что обеспечивает переход инфицированной клетки к изодиаметрическому росту. Выявлено, что эндоплазматические микротрубочки участвуют в росте инфекционных нитей и формировании инфекционных капель в клубеньках, а также определяют распределение симбиосом в инфицированной клетке.

Выводы

1. Показано, что выход бактерий в цитоплазму растительной клетки препятствует реорганизации кортикальных микротрубочек в упорядоченный паттерн (ориентированных параллельно друг другу и перпендикулярно продольной оси клетки), способствуя изодиаметрическому росту инфицированной клетки в процессе ее дифференцировки в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula*.
2. Показано, что эндоплазматические микротрубочки создают матрицу для роста инфекционных нитей и поддерживают инфекционные капли, подготавливая выход бактерий в цитоплазму клеток клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*.
3. Выявлены различия в организации эндоплазматических микротрубочек, вовлеченных в распределение симбиосом в инфицированных клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*. У *P. sativum* наблюдается нерегулярный паттерн, а у *M. truncatula* – регулярный: микротрубочки расположены параллельно симбиосомам.
4. Доказана ключевая роль тубулинового цитоскелета в распределении симбиосом в азотфиксирующих клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula* с использованием модификатора полимеризации микротрубочек оризалина.
5. Сравнительный количественный анализ организации тубулинового цитоскелета подтвердил визуальные различия в паттернах микротрубочек, наблюдаемые в инфицированных и неинфицированных клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*.
6. Показана ограниченность применения репортерных флуоресцентных белков для изучения тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков трансгенных растений *M. truncatula*.
7. Разработана универсальная методика иммунолокализации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков Бобовых.

Список публикаций

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Китаева А.Б.**, Кусакин П.Г., Демченко К.Н., Цыганов В.Е. Методические особенности изучения тубулинового цитоскелета в клубеньках бобовых растений // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, № 3. С. 634-644.
2. Tsyganova A.V., **Kitaeva A.B.**, Tsyganov V.E. Cell differentiation in nitrogen-fixing nodules hosting symbiosomes (review) // Functional Plant Biology. 2018. 45: 47–57.
3. **Kitaeva A.B.**, Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Timmers A.C.J., Tsyganov V.E. Comparative analysis of the microtubular organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: Bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubular rearrangements // New Phytologist. 2016. V. 210. N. 1. P. 168-183.

4. Цыганова А.В., **Китаева А.Б.**, Бревин Н.Дж., Цыганов В.Е. Клеточные механизмы развития симбиотических клубеньков у бобовых растений // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 34-40.

Тезисы:

1. **Китаева А.В.**, Kusakin P.G., Demchenko K.N., Tsyganov V.E. Actin cytoskeleton organization in symbiotic nodules of *Pisum sativum* L. and *Medicago truncatula* Gaertn. Proceedings of 10th Symposium of the International Society of Root Research. 8-12 July 2018. Israel, Tel-Aviv. P. 160.
2. Tsyganov V.E., **Китаева А.В.**, Gorshkov A.P., Tsyganova A.V. Nucleus movement and cytoskeleton rearrangements during infected cell differentiation in symbiotic nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*. Proceedings of the 20th International Congress on Nitrogen Fixation Granada, Spain, 3-7 September 2017, p.172
3. **Китаева А.Б.**, Кусакин П.Г., Демченко К.Н., Цыганов В.Е. Организация актинового цитоскелета в клетках клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) и люцерны (*Medicago truncatula* Gaerth.). Сб. мат. докладов науч. конф. и школы для мол. уч. «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», Годичное собрание ОФР, Крым, Судак, 18-24 сентября 2017 г., С. 194.
4. Кусакин П.Г., **Китаева А.Б.**, Цыганов В.Е. Иммунолокализация цитокинина в эффективных и неэффективных клубеньках гороха. Сб. мат. докладов науч. конф. и школы для мол. уч. «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», Годичное собрание ОФР, Крым, Судак, 18-24 сентября 2017 г., С. 212.
5. Цыганов В.Е., **Китаева А.Б.**, Горшков А.П., Цыганова А.В. Реорганизация органелл в ходе дифференцировки растительной клетки азотфиксирующего клубенька. Сб. мат. докладов науч. конф. и школы для мол. уч. «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», Годичное собрание ОФР, Крым, Судак, 18-24 сентября 2017 г., С. 71.
6. Цыганов В.Е., **Китаева А.Б.**, Цыганова А.В. Клеточные механизмы дифференцировки симбиотического клубенька. Сб. статей межд. науч.-практ. конф. «Вавиловские чтения – 2017», посвященной 130-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова., Саратов, 15-17 ноября 2017 г., С. 175.
7. **Китаева А.В.**, Demchenko K.N., Timmers T., Tsyganov V.E. The role of tubulin and actin cytoskeleton rearrangements during pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodule development. Proceedings of 4th International Symposium on Plant Signaling and Behavior. Saint Petersburg, Russia, June 19 – 23, 2016, pp. 123-124.
8. **Китаева А.В.**, Demchenko K.N., Timmers T., Tsyganov V.E. Comparative analysis of tubulin and actin cytoskeleton organization in symbiotic nodules of pea (*Pisum sativum* L.). Proceedings of 12th European Nitrogen Fixation Conference. Budapest, Hungary, 25 – 28 August 2016, p. 221.
9. Serova T.A., **Китаева А.В.**, Ivanova K.A., Timmers T., Brewin N.J., Demchenko K.N., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Molecular and cellular mechanisms of pea symbiotic nodule development. International Symposium on Plant Signaling and Behavior 2015, Paris, France, 29 June - 2 July 2015, P. 113.
10. Timmers T., **Китаева А.В.**, Demchenko K.N., Tsyganov V.E. Hosting of rhizobia in indeterminate-type nodules. Материалы международной конференции «Генетическая интеграция прокариот и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии», Санкт-Петербург, 24-27 июня 2015, С. 53

11. Tsyganova A.V., **Kitaeva A.B.**, Ivanova K.A., Serova T.A., Kusakin P.G., Timmers T., Brewin N.J., Demchenko K.N., Tsyganov V.E. Molecular and cellular aspects of pea symbiotic nodule development. Материалы международной конференции «Генетическая интеграция прокариот и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии», Санкт-Петербург, 24-27 июня 2015, С. 54.
12. **Китаева А.Б.**, Демченко К.Н., Т. Тиммерс, Цыганов В.Е. Сравнительный анализ организации тубулинового цитоскелета в симбиотических клубеньках *Medicago truncatula* Gaerth. и *Pisum sativum* L. Материалы международной конференции «Генетическая интеграция прокариот и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии», Санкт-Петербург, 24-27 июня 2015, С. 78.
13. **Китаева А.Б.**, Демченко К.Н., Тиммерс Т., Цыганов В.Е. Реорганизация тубулинового цитоскелета в процессе дифференцировки клеток симбиотического клубенька *Medicago truncatula* Gaertn. Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, 21-26 сентября 2015, С. 256.
14. **Китаева А.Б.**, Иванова К.А., Серова Т.А., Стефанов С.Ю., Кусакин П.Г., Горшков А.П., Чижевская Е.П., Демченко К.Н., Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Молекулярно-генетические и клеточные механизмы развития бобово-ризобийного симбиоза. Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, 21-26 сентября 2015, С. 257.
15. **Китаева А.Б.**, Демченко К.Н., Тиммерс Т., Цыганов В.Е. Материалы III (XI) Международной ботанической конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 4-9 октября 2015, С. 76.
16. **Китаева А.Б.**, Демченко К.Н., Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Молекулярно-генетические и клеточные механизмы развития симбиотических клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.). Сборник тезисов VI Съезда ВОГИС и ассоциированных генетических симпозиумов. Ростов-на-Дону, 15 – 20 июня 2014 г. С. 190.
17. **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 microtubular rearrangements. Proceedings of 11th European Nitrogen Fixation Conference. Tenerife, Canary Islands, Spain. September 7 – 10, 2014. P. 219.
18. **Китаева А.Б.**, Цыганов В.Е. Реорганизация микротрубочек в процессе дифференциации клеток клубенька гороха (*Pisum sativum* L.) // Материалы докладов VII съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» 4-10 июля. Н. Новгород. 2011г., С. 337-338.
19. Цыганова А.В., **Китаева А.Б.**, Цыганов В.Е. Клеточные механизмы развития эффективных и неэффективных симбиотических клубеньковых бобовых растений // Материалы докладов VII съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» 4-10 июля. Н. Новгород. 2011г., С. 736-737.
20. Tsyganov V., Tsyganova A., **Kitaeva A.**, Ivanova K., Brewin N. Molecular and cellular mechanisms of symbiotic nodule development. 7th International Symposium: Structure and function of roots. Novy Smokovec, Slovakia. 5-9 September, 2011. P.186.
21. **Kitaeva A.B.**, Tsyganov V.E. Microtubular rearrangements during cell differentiation in root nodules of *Pisum sativum* L. // The joint 5th Postgraduate Course and Minisymposium of AB-RMS, 16th Biotechnology Summer School of University of Gdansk, and 2nd Workshop of PAS and RAAS on Plant Molecular Biotechnology “Adaptation to Climate Change in the Baltic Sea Region: Contributions from Plant and Microbial Biotechnology” July 12 – 17, 2010, Mikkeli, Finland P.53.