

На правах рукописи



КУСАКИН ПЁТР ГЛЕБОВИЧ

**АНАЛИЗ РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК
ПРИ РАЗВИТИИ СИМБИОТИЧЕСКОГО КЛУБЕНЬКА ГОРОХА
(*Pisum sativum* L.)**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2023

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

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Цыганов Виктор Евгеньевич

Официальные оппоненты: **Топунов Алексей Фёдорович**,
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
„Фундаментальные основы биотехнологии“
Российской академии наук», Институт биохимии
им. А.Н. Баха, заведующий лабораторией

Лебедева Мария Александровна,
кандидат биологических наук, Федеральное
государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-
Петербургский государственный университет»,
старший научный сотрудник

Ведущая организация: Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Защита состоится «13» апреля 2023 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.1.002.02. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. Тел. (812) 342-54-42, факс (812) 372-54-43, Адрес электронной почты: dissovet.24100202@binran.ru

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бобовые растения являются важными сельскохозяйственными культурами благодаря своей способности вступать в симбиоз с почвенными клубеньковыми бактериями. Это позволяет им фиксировать атмосферный азот и обогащать почву азотсодержащими соединениями. Формирование симбиотического клубенька начинается с обмена сигнальными молекулами между растением и бактериями (Oldroyd, 2013). Это приводит к развитию специфического ответа у растения, в ходе которого происходят перестройки цитоскелета корневого волоска и его скручивание, а также формирование в месте скручивания инфекционной нити, с помощью которой бактерии проникают вглубь корня (Timmers, 2008; Tsyganova *et al.*, 2021a). Одновременно с этим происходит инициация делений в клетках перицикла, а также во внутренних или наружных слоях коры корня (в зависимости от типа формируемого клубенька), в результате чего формируется примордий симбиотического клубенька. Когда инфекционные нити достигают клеток примордия, на них формируются выросты, окружённые лишь плазматической мембраной, — инфекционные капли, из которых бактерии высвобождаются в цитоплазму растительных клеток, оставаясь при этом отделёнными от неё мембраной растительного происхождения. Вышедшие бактерии дифференцируются в бактериоиды, которые, будучи окружёнными симбиотической мембраной, образуют органелло-подобные формы, способные фиксировать атмосферный азот в аммоний, — симбиосомы (Tsyganova *et al.*, 2018). Инфицированные клетки клубенька также дифференцируются, претерпевая при этом процесс эндоредупликации (Kondorosi, Kondorosi, 2004). Дифференцировка инфицированных клеток направлена прежде всего на увеличение их размера. В отличие от клеток корня, где клетки растут благодаря анизотропному типу роста, инфицированные клетки клубенька растут изодиаметрически (Kitaeva *et al.*, 2016). Такой тип роста обеспечивает увеличение объёма инфицированной клетки до 80 раз по сравнению с меристематическими клетками (Maróti, Kondorosi, 2014), что создаёт условия для размещения в ней десятков тысяч бактериоидов.

В клубеньках недетерминированного типа, к которым относятся клубеньки гороха, формируется меристема, которая функционирует продолжительное время, в результате чего в клубеньке формируется гистологическая зональность. Наряду с меристемой выделяют зону инфекции, зону азотфиксации и зону старения (Guinel, 2009).

В настоящее время механизмы, лежащие в основе дифференцировки инфицированных клеток симбиотического клубенька, активно изучаются. Тем не менее до сих пор такого рода исследования в основном связаны с изучением модельных видов Бобовых. В данном исследовании проводилось изучение дифференцировки клеток клубеньков важной сельскохозяйственной культуры — гороха посевного.

Цели и задачи работы. Целью данной работы являлось изучение регуляции дифференцировки растительных клеток в ходе развития симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.) за счет дифференциальной экспрессии генов, изменения уровня цитокининов и реорганизации цитоскелета.

Для выполнения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Провести транскриптомный анализ клеток различных зон симбиотического клубенька гороха дикого типа SGE, изолированных с использованием лазерной микродиссекции.

2. Провести иммуноцитохимический анализ распределения цитокининов в клубеньках исходных линий гороха SGE и Sprint-2, а также мутантов по генам *PsSym33*, *PsSym40*, *PsSym26* и *PsSym31*, блокированных на различных стадиях развития симбиотических клубеньков, с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

3. Разработать методику количественного анализа тубулинового и актинового цитоскелета в клетках симбиотического клубенька.

4. Провести сравнительный количественный анализ тубулинового и актинового цитоскелета в неинфицированных и азотфиксирующих клетках клубеньков гороха дикого типа SGE, а также различных видов Бобовых.

Научная новизна работы. Впервые был проведён транскриптомный анализ образцов клеток ранней зоны инфекции, поздней зоны инфекции, а также зоны азотфиксации, полученных с помощью лазерной микродиссекции срезов клубеньков гороха дикого типа, были выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены при сравнении клеток исследованных зон клубенька, а также значимо обогащённые функциональные категории генов онтологии и метаболические пути KEGG. Впервые с использованием иммунолокализации и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии был проведён анализ распределения цитокининов рибозида транс-зеатина и N⁶-изопентениладенозина в клубеньках гороха дикого типа и мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза, через 2 и 4 недели после инокуляции и показано влияние цитокининов на процессы дифференцировки растительных и бактериальных клеток в ходе развития инфекции. Разработана методика количественного анализа организации цитоскелета в растительных клетках, визуализированного при помощи флуоресцентных антител и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Впервые проведён сравнительный количественный анализ организации тубулинового и актинового цитоскелета в неинфицированных и азотфиксирующих клетках гороха и различных видов Бобовых.

Теоретическая и практическая ценность. Результаты работы вносят вклад в понимание процессов дифференцировки растительных клеток симбиотического клубенька гороха. Так, результаты транскриптомного анализа клеток из различных зон клубенька гороха позволяют определять группы генов, специфичных для той

или иной стадии дифференцировки растительной клетки, что может явиться основой для более детального изучения таких генов, в том числе и ключевых регуляторов развития бактериоидов — NCR-пептидов (Zorin *et al.*, 2022). Продемонстрированная связь цитокининов с развитием клубенька на поздних этапах является важным шагом в разработке более эффективных растительно-микробных систем на основе бобово-ризобияльного симбиоза. Методика количественного анализа цитоскелетных элементов в клетках клубеньков может применяться и уже активно используется (Китаева, 2018; Китаева и др., 2018; Садовская, 2020; Kitaeva *et al.*, 2021; Tsyganova *et al.*, 2021b; Kitaeva *et al.*, 2022) при сравнении организации тубулинового и актинового цитоскелета различных клеток в клубеньках различных видов Бобовых.

Положения, выносимые на защиту:

1. В основе дифференцировки инфицированных клеток симбиотического клубенька *Pisum sativum* лежат значительные изменения в экспрессии генов, наиболее выраженные при переходе клеток в зону азотфиксации.
2. Цитокинины в клубеньках гороха вовлечены в контроль выхода бактерий в цитоплазму растительных клеток, дифференцировку растительных и бактериальных клеток, а также негативную регуляцию роста инфекционных нитей и капель.
3. Разработана методика количественного анализа организации тубулинового и актинового цитоскелета и выявлены показатели, численно характеризующие перестройки цитоскелета при дифференцировке азотфиксирующих клеток в клубеньках различных видов Бобовых.

Личный вклад автора. Все исследования, посвящённые изучению регуляции дифференцировки растительных клеток при развитии симбиотического клубенька гороха за счет дифференциальной экспрессии генов, изменения уровня цитокининов и количественного анализа реорганизации цитоскелета, проведены лично автором. Использование материалов, полученных другими сотрудниками лаборатории молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ, обсуждалось с ними и руководителем работы. 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 современных методов анализа данных.

Апробация работы. Материалы исследования были представлены на 8 отечественных и международных конференциях, в том числе на Годичном собрании Общества физиологов растений России и научной конференции и школе для молодых учёных «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (2017 г., Судак, Крым), IV(XII) Международной ботанической конференции молодых учёных (2018 г., Санкт-Петербург, Россия), Международной

научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» и школы-конференции для молодых учёных «Экологическая генетика микробно-растительных взаимодействий» (2018 г., Уфа, Россия), 13-й Европейской конференции по азотфиксации (2018 г., Стокгольм, Швеция), 9-м Съезде общества физиологов растений России и научной конференции с международным участием и школе для молодых учёных «Физиология растений — основа создания растений будущего» (2019 г., Казань, Россия), II Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2020 и школе-конференции для молодых учёных «Экологическая генетика микробно-растительных взаимодействий» (2020 г., Саратов, Россия), IV школе-конференции для молодых учёных «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий» (2020 г., Санкт-Петербург, Россия), V Всероссийской школе-конференции с международным участием для молодых учёных «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий» (2021 г., Санкт-Петербург, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и включённых в международную базу Scopus.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, основной части (содержащей 3 главы: обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение), заключения, выводов и списка литературы (266 источников). Работа изложена на 135 страницах, содержит 36 рисунков и 2 таблицы.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю В.Е. Цыганову за предоставление интересной темы диссертации, всестороннюю поддержку на всех этапах её выполнения и конструктивную критику. Автор выражает благодарность своим коллегам, сотрудникам лаборатории молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ А.Б. Китаевой, Т.А. Серовой, А.В. Цыгановой, К.Н. Демченко, К.А. Ивановой, А.П. Горшкову и Е.А. Киричеку за их вклад в совместные исследования, дружескую атмосферу в лаборатории, помощь и поддержку.

Автор признателен сотрудникам ФГБНУ ВНИИСХМ Е.Е. Андронову и В.А. Жукову за конструктивные замечания к проведённому исследованию и тексту диссертации.

Автор выражает благодарность преподавателям биологического факультета СПбГУ, прежде всего кафедры физиологии и биохимии растений, за их вклад в его теоретическую подготовку.

Автор искренне и тепло благодарен своим родным: привившим любовь к науке О.Г. Кусакину и А.П. Касаткиной, родителям Г.О. Кусакину и О.И. Чуриновой, сестре П.Г. Кусакиной и жене З.Е. Лызловой за их безграничную любовь, заботу и неоценимую поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Изложено описание развития бобово-ризобияльного симбиоза от начальных стадий до формирования зрелого клубенька. Описаны сигнальные пути и гормональная регуляция, лежащие в основе формирования симбиотического клубенька. Особое внимание уделено дифференцировке растительных и бактериальных клеток в ходе этого процесса.

Материалы и методы.

Использовали семена гороха посевного (*Pisum sativum* L.) лабораторной линии SGE (Kosterin, Rozov, 1993) и Sprint-2 (Бердников и др., 1989), а также соответствующих мутантных линий SGEFix⁻² (*Pssym33-3*), SGEFix⁻¹ (*Pssym40-1*) (Tsyganov *et al.*, 1998), SGEFix⁻³ (*Pssym26*) (Tsyganov *et al.*, 2000), Sprint-2Fix⁻ (*Pssym31*) (Борисов и др., 1994), блокированных на различных стадиях развития симбиотического клубенька. В работе был использован штамм клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Glenn *et al.*, 1980). Растения выращивали в стерильном вермикулите, дополненном безазотным питательным раствором (Fåhræus, 1957), в климатических камерах в контролируемых условиях.

Прочтения библиотек, подготовленных из образцов клеток ранней зоны инфекции, поздней зоны инфекции и зоны азотфиксации клубеньков дикого типа SGE, полученных с использованием лазерной микродиссекции, очищали и картировали на референсный геном гороха (Kreplak *et al.*, 2019). Было подсчитано количество прочтений, относящихся к тому или иному гену, и определены дифференциально экспрессирующиеся гены для клеток каждой зоны по сравнению с остальными. Для каждого сравнения был проведён анализ обогащения функциональных категорий геной онтологии и метаболических путей KEGG, после чего были выявлены значимо обогащённые категории.

Для выявления локализации цитокининов рибозида транс-зеатина и N⁶-изопентениладенозина срезы 2- и 4-недельных клубеньков были инкубированы с соответствующими первичными поликлональными антителами (иммуноглобулинами G) кролика (Agrisera). В качестве вторичных антител были использованы козы антитела к иммуноглобулину G кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). Для визуализации ДНК ядер и бактерий использовалась окраска иодидом пропидия. Исследование образцов проводилось с помощью лазерных сканирующих конфокальных микроскопов LSM 510 META и 780 (Carl Zeiss), для возбуждения флуоресцентной метки Alexa Fluor 488 использовалась длина волны 488 нм, для возбуждения иодида пропидия — 561 нм.

Подготовку изображений к количественному анализу, выделение изображений отдельных клеток, а также количественный анализ осуществляли, используя подготовленные программы-расширения для программы ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). Количественный анализ ориентации элементов цитоскелета

на переведённых в проекцию максимальной интенсивности и бинаризованных объёмных изображениях проводили с использованием программы MicroFilament Analyzer (Jacques *et al.*, 2013) либо расширения OrientationJ (Püspöki *et al.*, 2016). Углы детектированных на изображении элементов цитоскелета подразделяли на 3 класса относительно продольной оси клетки: продольные, диагональные и поперечные. Для количественного анализа характеристик сети элементов цитоскелета объёмные конфокальные изображения бинаризовали, производили снижение шума, а также размытие по Гауссу. Далее изображения переводили в топологические скелеты, ветви-артефакты удаляли. Анализ полученных изображений проводился с использованием программы AnalyzeSkeleton (Arganda-Carreras *et al.*, 2010), на основе результатов её работы рассчитывали характеристики, описывающие характер распределения элементов цитоскелета в клетке. Обработка данных, расчёт параметров и статистический анализ, а также построение графиков проводилось с помощью программы, написанной на языке R.

Результаты и обсуждение

1. Транскриптомный анализ клеток из различных гистологических зон симбиотического клубенька

В рамках данной работы был проведён анализ дифференциально экспрессирующихся генов в двух сравнениях: (1) клетки поздней зоны инфекции клубенька в сравнении с клетками ранней зоны инфекции; (2) клетки зоны азотфиксации клубенька в сравнении с клетками поздней зоны инфекции. Были показаны изменения в количестве дифференциально экспрессирующихся генов в данных сравнениях (Рисунок 1): из 44 756 генов, аннотированных в референсном геноме гороха, 2 026 меняли свою экспрессию при переходе клеток из ранней зоны инфекции в позднюю зону инфекции и 4 404 — при переходе из поздней зоны инфекции в зону азотфиксации.

Наблюдаемое большое число изменяющих свою экспрессию генов при сравнении клеток из различных зон клубенька свидетельствует о значительных изменениях при переходе от одной стадии дифференцировки растительных клеток клубенька недетерминированного типа к другой. При этом выявляется существенное отличие транскриптного профиля инфицированных клеток зоны азотфиксации от клеток зоны инфекции, в то время как сравнение ранней и поздней зоны инфекции показало меньшее число генов. Согласно исследованиям транскриптомов клубеньков *P. sativum*, *Medicago truncatula* Gaertn. и некоторых других Бобовых, симбиотические клубеньки являются уникальными органами с точки зрения специфических транскриптомных изменений (Alves-Carvalho *et al.*, 2015; Zhukov *et al.*, 2015; Mergaert *et al.*, 2019). Исходя из представленных в данной работе результатов, можно предположить, что большой вклад в уникальность транскриптного профиля клубенька *P. sativum* вносят именно инфицированные клетки азотфиксирующей зоны.

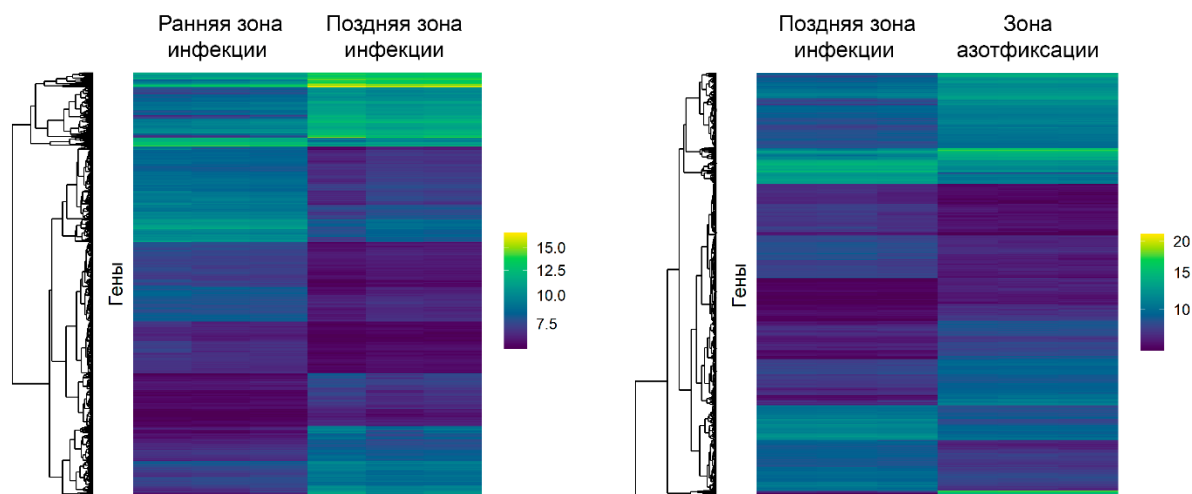


Рисунок 1. Тепловые карты генов, дифференциально экспрессирующихся в сравнениях исследованных образцов.

Цветом обозначены нормализованные значения количества прочтений для каждого гена в исследованных образцах. Количество дифференциально экспрессирующихся генов: 2 026 в сравнении поздней зоны инфекции с ранней зоной инфекции и 4 404 — зоны азотфиксации с поздней зоной инфекции.

В сравнении поздней зоны инфекции с ранней зоной инфекции повышали свою экспрессию разнообразные гены, кодирующие клубеньк-специфичные цистеин- (NCR) и глицин-богатые (NGR) белки, кислые эндохитиназы, леггемоглобин, MtN21/EamA-подобный транспортер, а также протеазы. Анализ генов, понижающих экспрессию в этом сравнении, обнаружил тенденцию к подавлению генов, связанных с развитием клубенька. Так, понижалась экспрессия генов, вовлечённых в работу меристемы, например *PLETHORA2*-подобный ген (Psat5g287880), который у *M. truncatula* экспрессируется в меристеме корня и клубенька (Franssen *et al.*, 2015), а также ген, сходный с кодирующим фактор роста меристемы 9 *G. soja* (Psat7g050080). Также было выявлено понижение экспрессии генов, охарактеризованных как кодирующие белки LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) 16 и 18 (Psat3g059000 и Psat3g115560 соответственно). У *M. truncatula* LBD16, активируемый ключевым регулятором клубенькообразования NODULE INCEPTION (NIN), участвует в создании максимума ауксина, необходимого для формирования клубенька (Schiessl *et al.*, 2019). Кроме того, известно, что данные белки участвуют в развитии боковых корней, а также активации и регуляции генов клеточного цикла (Lee *et al.*, 2015). Понижение экспрессии гена *PsIAA4* (Psat6g102800) также указывает на связь с активностью ауксина (Ballas *et al.*, 1993). Известно, что гены семейства *Auxin/Indole-3-Acetic Acid Inducible (Aux/IAA)* вовлечены в подавление экспрессии ранних генов ответа на ауксин (Parry, Estelle, 2006). Среди 50 наиболее понизивших свою экспрессию генов был обнаружен ген из семейства *KNOTTED1-LIKE HOMEBOX (KNOX)*, Psat0s1648g0080). Ранее было показано, что транскрипционный фактор KNOX3 у гороха вовлечён в активацию генов биосинтеза цитокининов (Azarakhsh *et*

al., 2015), а уровень экспрессии *PsKNOX3* поддерживался на высоком уровне в двухнедельных клубеньках гороха дикого типа, однако снижался у мутантов с нарушениями развития инфекции и низким уровнем цитокининов (Dolgikh *et al.*, 2020). Наблюдаемое в данном сравнении (в зоне инфекции) снижение экспрессии гена, охарактеризованного как кодирующий белок из семейства KNOX, может указывать на различную роль представителей этого семейства в развитии инфекции. Несколько генов белков, связанных с развитием защитных реакций, понижали свою экспрессию, например *ERECTA*-подобный ген (Psat6g022040), а также *PsPATHOGENESIS-RELATED 1* и *2*- (*PR1*- и *PR2*)-подобные гены (Psat1g156240 и Psat1g213200 соответственно). Известно, что *ERECTA* у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. связан с ответами на патогены, опосредованными изменениями в клеточной стенке (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2009). Кроме того, показано, что *PR* гены подавляются у растений ещё во время самых ранних стадий развития клубенька (Mithöfer, 2002; Mitra, Long, 2004). Однако представленные в диссертации данные демонстрируют, что подавление защитной системы происходит также и во время поздних стадий развития клубеньков. Это согласуется с тем, что у гороха мутации в генах *PsSym33* и *PsSym40*, кодирующих транскрипционные факторы CYCLOPS и ETHYLENE RESPONSE FACTOR REQUIRED FOR NODULE DIFFERENTIATION (EFD) (Tsyganov, Tsyganova, 2020), приводят к развитию выраженных защитных реакций в клубеньке (Ivanova *et al.*, 2015; Tsyganova *et al.*, 2019a).

В сравнении зоны азотфиксации с поздней зоной инфекции повышали свою экспрессию как несколько генов, соответствующих NCR- и NGR-белкам, так и гены, контролирующие системы транспорта азота (кодирующие цитоплазматическую пуриновую 5'-нуклеотидазу, аспарагинсинтетазу) и нитратов (кодирующие белки, подобные высокоаффинным нитратным транспортёрам NRT2.4, транспортёр глутамин GDU6), кодирующие леггемоглобин, QRT3 (QUARTET)-подобную полигалактуроназу, клубеньковый лектин (PsNlec-1), а также продукты, сходные с NIN-подобными белками 8/9, белком CUP-SHAPED COTYLEDON 3 (CUC3/NAC) и кальмодулин-связывающим белком. Известно, что цитоплазматическая пуриновая 5'-нуклеотидаза (ген Psat2g033440) вовлечена в синтез уреидов, являющихся главной транспортной формой фиксированного азота в детерминированных клубеньках (Smith, Atkins, 2002; Garneau *et al.*, 2018). Тем не менее наблюдалось также и более ожидаемое повышение экспрессии гена аспарагинсинтетазы (Psat5g153000), типичного для недетерминированных клубеньков фермента ассимиляции азота (Reynolds *et al.*, 1982). NRT2.4 у *L. japonicus* был охарактеризован как главный транспортёр нитрата в клубеньках (Valkov *et al.*, 2020). Поскольку в данном исследовании повышение экспрессии сходных генов гороха (Psat4g155600, Psat7g149120) происходило именно в зоне азотфиксации, становится возможным предположить сходную роль таких транспортёров в недетерминированных клубеньках. Ген Psat3g193960 соответствовал белку GDU6, который у *A. thaliana* выступает в роли экспортёра глутамин (и, возможно, других аминокислот)

(Pratelli *et al.*, 2009). На примере *Vicia faba* L. было высказано предположение, что в недетерминированных клубеньках транспорт аминокислот включает в себя апопластный этап, когда инфицированные клетки экспортируют аминокислоты в апопластический компартмент (Peiter *et al.*, 2004; White *et al.*, 2007). Таким образом, можно предположить, что сходный механизм может существовать и в клубеньках гороха. Также среди генов с наиболее повышенной экспрессией был обнаружен ген Psat1g066920, кодирующий QRT3-подобную полигалактуроназу. Известно, что эти ферменты вовлечены в модификации клеточных стенок в ходе роста клеток, поэтому вероятно, что продукт данного гена играет сходную роль при увеличении размеров инфицированных клеток. Среди генов с наиболее повышенной экспрессией в данном сравнении был также и ген Psat6g053920, охарактеризованный как кодирующий транскрипционный фактор из семейства CUC3/NAC. Ранее было показано, что белок из этого семейства у *M. truncatula* вовлечён в задержку старения (de Zélicourt *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2020). Можно предположить, что активность этого гена необходима в молодых 11-дневных клубеньках *P. sativum* для отсрочки индукции естественного старения. В данном сравнении сильнее всего понижали свою экспрессию гены, относящиеся к инициации транскрипции (Psat5g055240, белок S/IID), контролю клеточного цикла (Psat5g040080, циклин A-3-1), поддержке работы меристемы (Psat7g151360, AGL MADS-box белок, который у *A. thaliana* участвует в функционировании корневой меристемы (Burgeff *et al.*, 2002)), а также ген, кодирующий белок, подобный гистону H2B.3 (Psat6g173520). Это согласуется с показанным ранее отсутствием экспрессии генов, контролирующих клеточный цикл, а также генов гистонов в зоне азотфиксации клубеньков *M. truncatula* (Vinardell *et al.*, 2003). Кроме того, было обнаружено заметное снижение экспрессии нескольких генов, имеющих сходство с кодирующими пентатрикопептиды (Psat6g072560, Psat5g033520, Psat6g083600, Psat2g174920, Psat7g088720, Psat6g069280). Это большое семейство белков с разнообразными функциями, часто выступающих в качестве регуляторов транскрипции хлоропластов и митохондрий (Barkan, Small, 2014). В настоящее время нет данных, позволяющих сделать вывод о той роли, которую могли бы играть эти белки в ходе развития клубенька и дифференцировки клеток. Хотя известно, что в ходе дифференцировки инфицированной клетки происходит перераспределение пластид и митохондрий к периферии клетки (Newcomb, 1976). Выявленное снижение в данном сравнении гена Psat4g097000 (охарактеризованного как кодирующий 3-эпи-6-дезоксокатастерон 23-монооксигеназу, для которой у *A. thaliana* показано участие в биосинтезе brassinостероидов (Ohnishi *et al.*, 2006)) согласуется с недавними исследованиями роли brassinостероидов в развитии и функционировании клубеньков, показавшими малое влияние данных гормонов на зрелые клубеньки *P. sativum* (McGuinness *et al.*, 2020). Сходно с понижением экспрессии *PR* генов в поздней зоне инфекции, описанным выше, в данном сравнении понижалась экспрессия гена Psat1g006640, охарактеризованного как кодирующий эндо1,3-β-глюканазу. В растениях сои

данный фермент индуцировался в ходе защитной реакции против патогенов и супрессировался после инокуляции ризобиями (Khatoon *et al.*, 2012).

Проведённый анализ обогащения как функциональных категорий геной онтологии «Biological process» (Рисунок 2), «Molecular function» (Рисунок 3) и «Cellular component» (Рисунок 4), так и метаболических путей KEGG показал значительные изменения в дифференциально экспрессирующихся генах, связанных со многими ключевыми биологическими процессами.

Результаты исследования дифференциально экспрессирующихся генов в клетках ранней зоны инфекции, поздней зоны инфекции, а также зоны азотфиксации свидетельствуют о существенных изменениях в транскрипционных профилях в ходе дифференцировки растительных клеток при развитии инфекции и переходе к азотфиксации. Было показано, что наибольшие изменения экспрессии (затрагивающие 4 404 гена) происходят при переходе клеток к азотфиксации, что подчёркивает особый статус этой зоны, инфицированные клетки которой адаптированы для размещения функционирующих симбиосом. Изучение генов с наиболее изменчивой экспрессией выявило гены, функции которых хорошо известны при развитии клубенька, и те, чьё участие в дифференцировке инфицированных клеток ранее не было показано. Кроме того, было показано, что в ходе дифференцировки гены в основном снижали свою экспрессию. В ходе анализа обогащения функциональных групп геной онтологии дифференциально экспрессирующимися генами при сравнении образцов из трёх изученных зон были обнаружены изменения в экспрессии генов, связанных с ключевыми биологическими процессами в растительной клетке, процессами транспорта ионов, фитогормональной регуляцией клеток, процессами метаболизма, иммунного ответа, роста и развития.



Рисунок 2. Значимо обогащённые категории генной онтологии «Biological process» в сравнениях клеток из исследованных зон клубенька. Чертой для каждого сравнения отмечены группы, значимо обогащённые генами. Красным цветом обозначены категории, обогащённые генами, повышавшими свою экспрессию, синим — понижавшими.

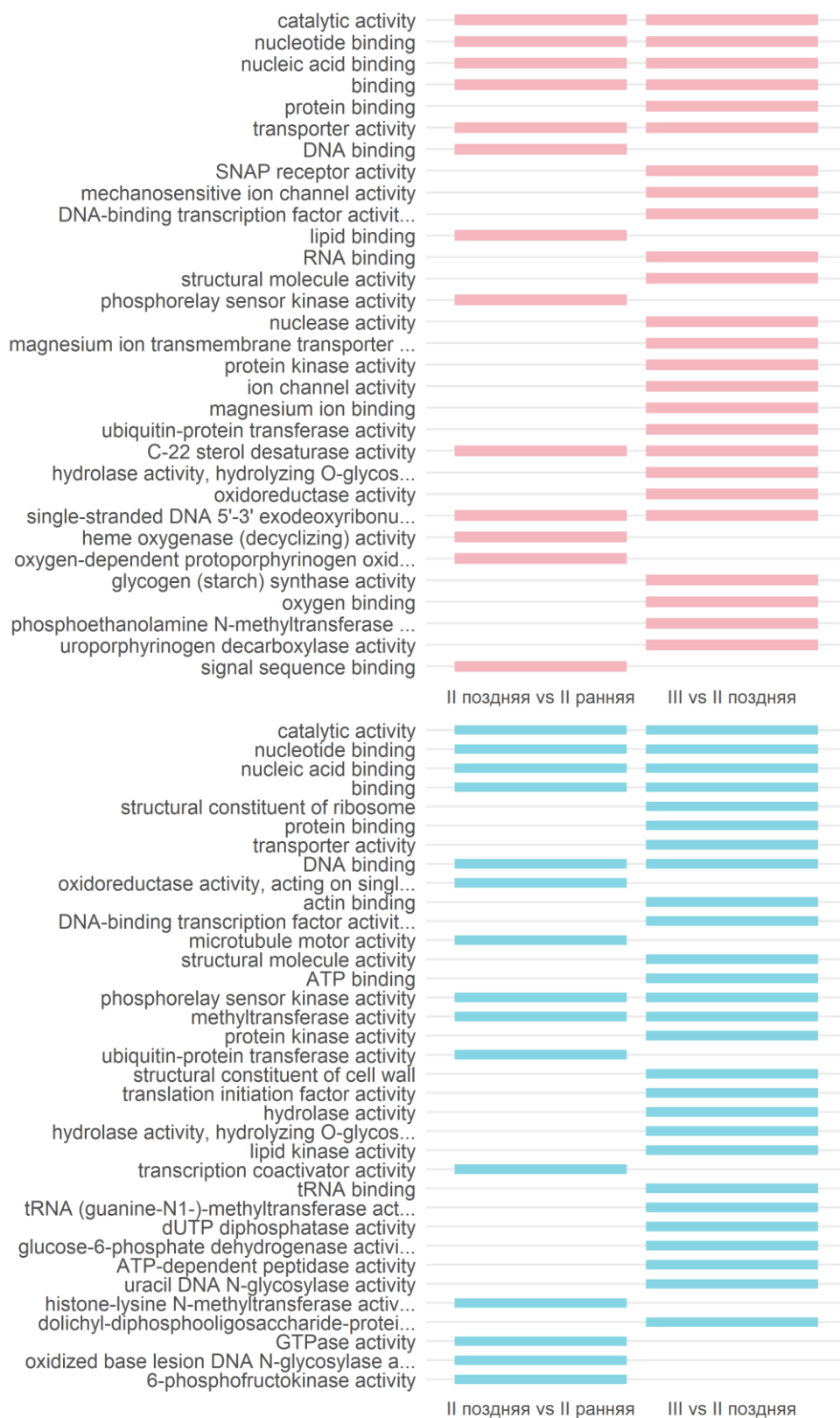


Рисунок 3. Значимо обогащённые категории генной онтологии

«Molecular function» в сравнениях клеток из исследованных зон клубенька.

Чертой для каждого сравнения отмечены группы, значимо обогащённые генами. Красным цветом обозначены категории, обогащённые генами, повышавшими свою экспрессию, синим — понижавшими.



Рисунок 4. Значимо обогащённые категории генной онтологии «Cellular component» в сравнениях клеток из исследованных зон клубенька.

Чертой для каждого сравнения отмечены группы, значимо обогащённые генами. Красным цветом обозначены категории, обогащённые генами, повышавшими свою экспрессию, синим — понижавшими.

2. Анализ фитогормональной регуляции дифференцировки клеток симбиотического клубенька цитокининами

Для выявления роли цитокининов в регуляции процессов дифференцировки клеток клубеньков и бактерий с помощью специфичных антител была произведена иммулокализация транспортных форм цитокинина, транс-зеатина и N⁶-изопентениладенозина, в клубеньках гороха дикого типа и мутантных линий разного возраста.

Было показано, что N⁶-изопентениладенозин распределяется в клубеньках гороха сходным образом с рибозидом транс-зеатина, уровень цитокининов снижался к 4 неделям (Рисунок 5). В клубеньках дикого типа, а также мутанта SGEFix⁻3 (*Pssym26*), характеризующегося преждевременной деградацией морфологически дифференцированных бактериоидов, транс-зеатин рибозид наблюдался в меристеме, зоне инфекции и ранней зоне азотфиксации (Рисунок 5А, Д, Рисунок 6). Метка обнаруживалась в цитоплазме клеток ранней зоны инфекции, однако не была связана с инфекционными структурами, в отличие от клеток поздней зоны инфекции (Рисунок 6Г–Е, Ж–И). В 2-недельных клубеньках мутанта SGEFix⁻2 (*Pssym33-3*), формирующего клубеньки с «запертыми» инфекционными нитями, максимум

сигнала наблюдался в зоне меристемы (Рисунок 5Б). Метка не была ассоциирована с инфекционными нитями, но в клетках с выходом бактерий была связана с инфекционными каплями (Рисунок 7А–Е). В 2-недельных клубеньках мутанта *SGEFix⁻¹* (*Pssym40-1*), образующего клубеньки с гипертрофированными инфекционными каплями, максимальная интенсивность сигнала транс-зеатин рибозида наблюдалась в зоне меристемы и в инфицированных клетках (Рисунок 5В). Метка не была связана с гипертрофированными инфекционными каплями (Рисунок 7Ж–М). В данных мутантах метка, в отличие от дикого типа, наблюдалась в ядрах колонизированных клеток (Рисунок 6, Рисунок 7).

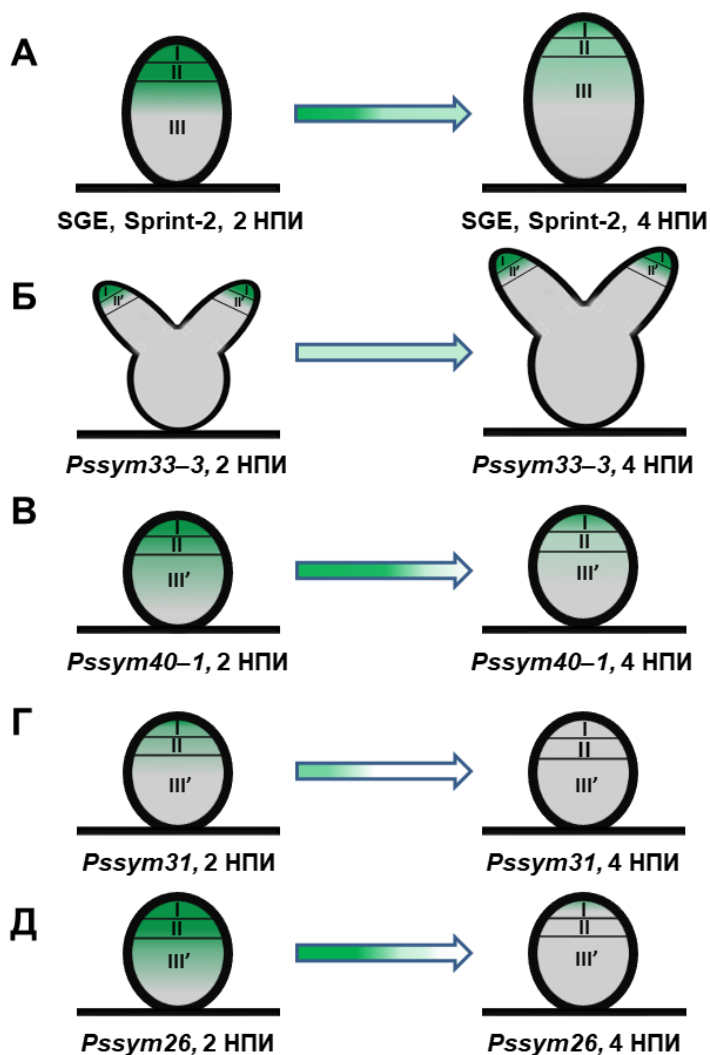


Рисунок 5. Схема локализации цитокининов в клубеньках гороха дикого типа (А), а также мутантов, блокированных на различных стадиях формирования симбиоза *SGEFix⁻²* (*Pssym33-3*) (Б), *SGEFix⁻¹* (*Pssym40-1*) (В), *Sprint-2Fix⁻* (*Pssym31*) (Г) и *SGEFix⁻³* (*Pssym26*) (Д) на 2 и 4 неделю после инокуляции (НПИ).

Понижение интенсивности цвета показывает снижение уровня цитокининов. I, меристема; II, зона инфекции; II', зона роста «заблокированных» инфекционных нитей; III, зона азотфиксации; III', зона, соответствующая зоне азотфиксации дикого типа.

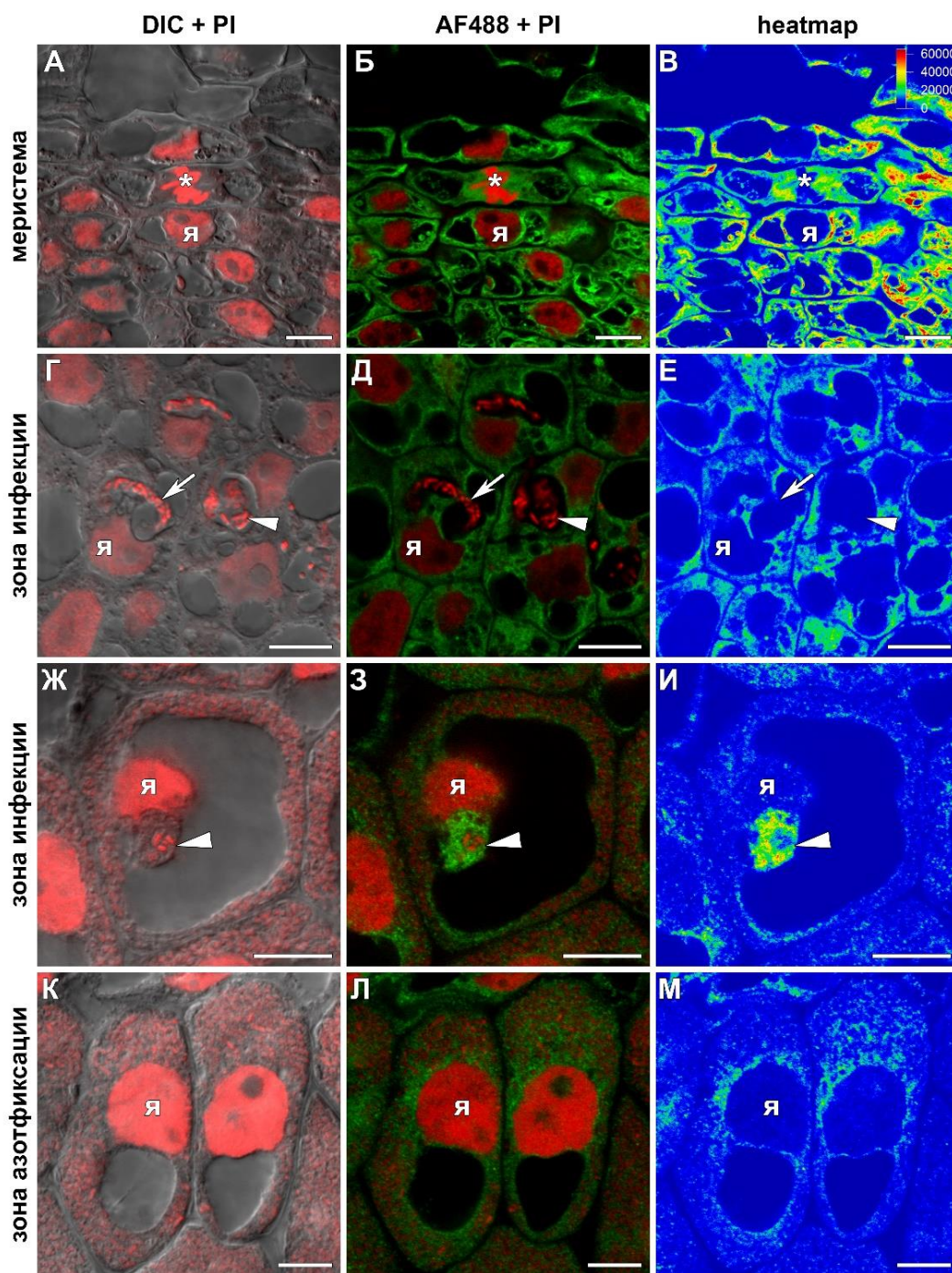


Рисунок 6. Иммунолокализация рибозида транс-зеатина в 2-недельных клубеньках гороха дикого типа SGE.

(А–В) меристема. (Г–Е) клетки ранней зоны инфекции. (Ж–И) клетки поздней зоны инфекции. (К–М) клетки зоны азотфиксации. (А, Г, Ж, К) совмещение канала дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала. (Б, Д, З, Л) совмещение красного и зелёного каналов. Дан один оптический срез: рибозид транс-зеатина показан зелёным, ДНК (бактерии и ядра) красным. (В, Е, И, М) Тепловая карта (heatmap), показывающая интенсивности зелёного канала в виде спектра; шкала интенсивностей одна для всех изображений. PI, иодид пропидия; AF488, Alexa Fluor 488; я, ядро; *, митоз; стрелки указывают на инфекционные нити; головки стрелок указывают на инфекционные капли. Масштабные линейки 10 мкм.

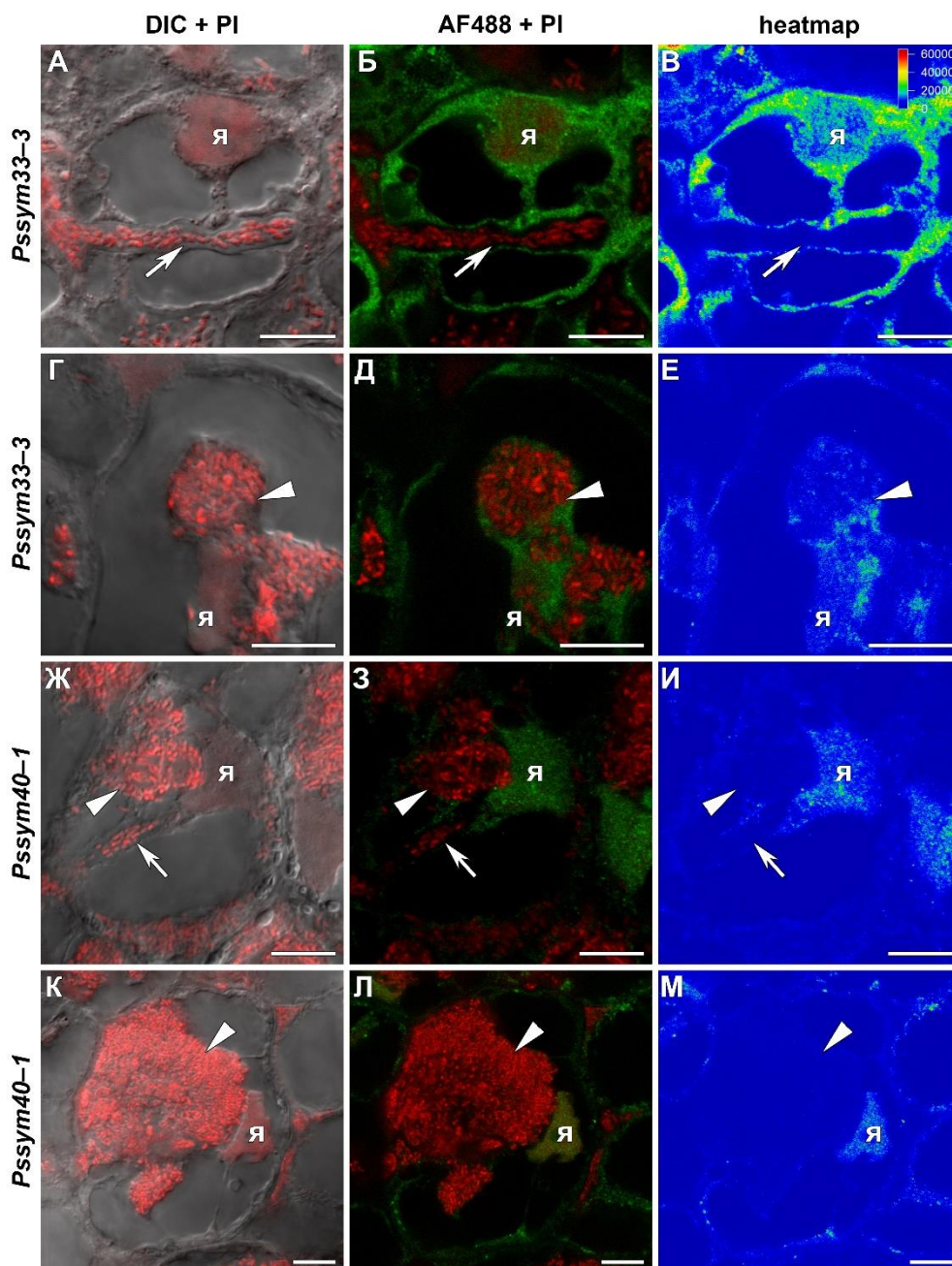


Рисунок 7. Иммулокализация рибозида транс-зеатина в 2-недельных клубеньках гороха мутантов *SGEFix⁻²* (*Pssym33-3*) и *SGEFix⁻¹* (*Pssym40-1*).

(А–В) колонизированная клетка с «запертой» инфекционной нитью. (Г–Е) колонизированная клетка с инфекционной каплей. (Ж–И) молодая инфицированная клетка с инфекционной каплей. (К–М) колонизированная клетка с гипертрофированной инфекционной каплей. (А, Г, Ж, К) совмещение канала дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала. (Б, Д, З, Л) совмещение красного и зелёного каналов. Представлен один оптический срез: рибозид транс-зеатина показан зелёным, ДНК (бактерии и ядра) красным. (В, Е, И, М) тепловая карта (heatmap), показывающая интенсивности зелёного канала в виде спектра; шкала одинакова для всех изображений. PI, иодид пропидия; AF488, Alexa Fluor 488; я, ядро; стрелки указывают на инфекционные нити; головки стрелок указывают на инфекционные капли. Масштабные линейки 10 мкм.

Представленные в данном исследовании результаты иммунолокализации рибозида транс-зеатина и N⁶-изопентениладенозина показывают паттерн распределения цитокининов, сходный с описанным в литературе, однако их наличие в зоне инфекции и зоне азотфиксации предполагает участие цитокининов в дифференцировке тканей клубенька и формировании симбиосом. Изучение характера распределения цитокининов в клубеньках мутантов с нарушениями развития симбиоза показало возможную их связь с выходом бактерий в клетки растений и их последующей дифференцировкой. Результаты анализа распределения цитокининов в клетках клубеньков дикого типа и мутантов позволяют предположить, что цитокинин вовлечён в негативную регуляцию развития ризобияльной инфекции, оказывая влияние на рост инфекционных нитей и, в особенности, развитие инфекционных капель.

3. Разработка методики количественного анализа цитоскелета в клетках симбиотического клубенька

В процессы дифференцировки растительных клеток и развития симбиотического клубенька вовлечены перестройки тубулинового и актинового цитоскелета. Сравнительное изучение организации цитоскелета в различных клетках клубеньков представляет поэтому большой интерес, однако визуальный анализ этих перестроек затруднён сложным характером распределения цитоскелетных элементов в клетке. В рамках данной работы была разработана методика количественного анализа тубулинового и актинового цитоскелета, визуализированного при помощи методов иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии. Были определены оптимальные процедуры подготовки изображений, параметры запуска программ, а также определены рассчитываемые характеристики распределения цитоскелетных элементов. Методика позволяет выделять из объёмных изображений изображения отдельных клеток (либо их областей), оценивать и сравнивать параметры, описывающие характер расположения цитоскелетных элементов в клетке, такие как их ориентация относительно продольной оси клетки (Рисунок 8), а также параметры, рассчитываемые на основе скелетизированных трёхмерных изображений (Рисунок 9): количество топологических скелетов на единицу объёма, плотность ветвей, медианное значение индекса прямизны, медианная длина ветки, отнесённое к числу ветвей количество разветвлений.

Описанные методы были применены в исследованиях различий паттернов ориентации кортикальных тубулиновых микротрубочек в неинфицированных и азотфиксирующих клетках клубеньков *P. sativum*, в изучении отличий организации эндоплазматических микротрубочек в азотфиксирующих клетках клубеньков бобовых растений нескольких видов (*Cicer arietinum* L., *Galega orientalis* Lam., *Medicago truncatula* Gaertn. и *Vicia sativa* L.) по сравнению с азотфиксирующими клетками клубеньков гороха, а также при сравнении ориентации и характера

расположения актиновых микрофиламентов в неинфицированных и азотфиксирующих клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*.

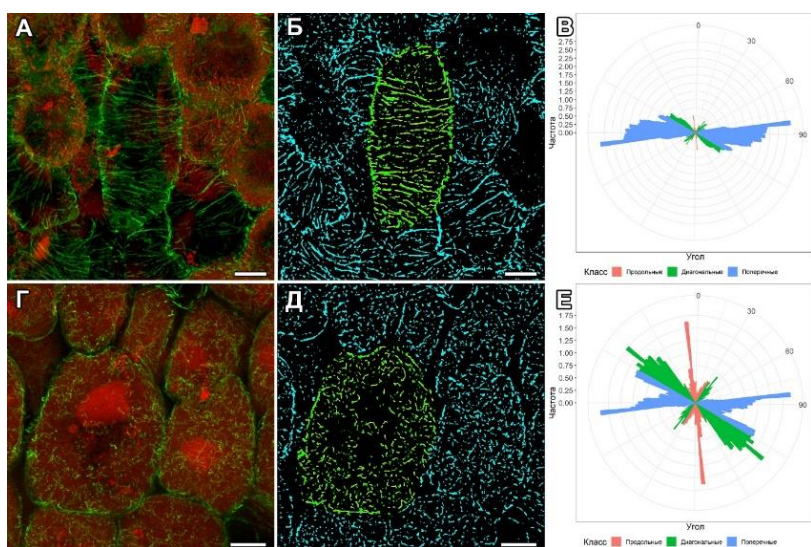


Рисунок 8.
Количественный анализ ориентации микротрубочек в неинфицированной (А–В) и азотфиксирующей (Г–Е) клетках клубенька гороха линии дикого типа SGE в программе MicroFilament Analyzer.
 (А, Г) совмещение красного (бактерии и ядра) и зелёного (тубулин) каналов. (Б, Д) результат работы MicroFilament Analyzer с предобработанным изображением; зелёным показаны анализируемые клетки, жёлтым — детектированные линии. Представлены проекции максимальной интенсивности. (В, Е) гистограммы распределения углов детектированных отрезков, скорректированные относительно продольных осей клеток. Представлены гистограммы для единичных клеток. Масштабные линейки 10 мкм.

зелёного (тубулин) каналов. (Б, Д) результат работы MicroFilament Analyzer с предобработанным изображением; зелёным показаны анализируемые клетки, жёлтым — детектированные линии. Представлены проекции максимальной интенсивности. (В, Е) гистограммы распределения углов детектированных отрезков, скорректированные относительно продольных осей клеток. Представлены гистограммы для единичных клеток. Масштабные линейки 10 мкм.

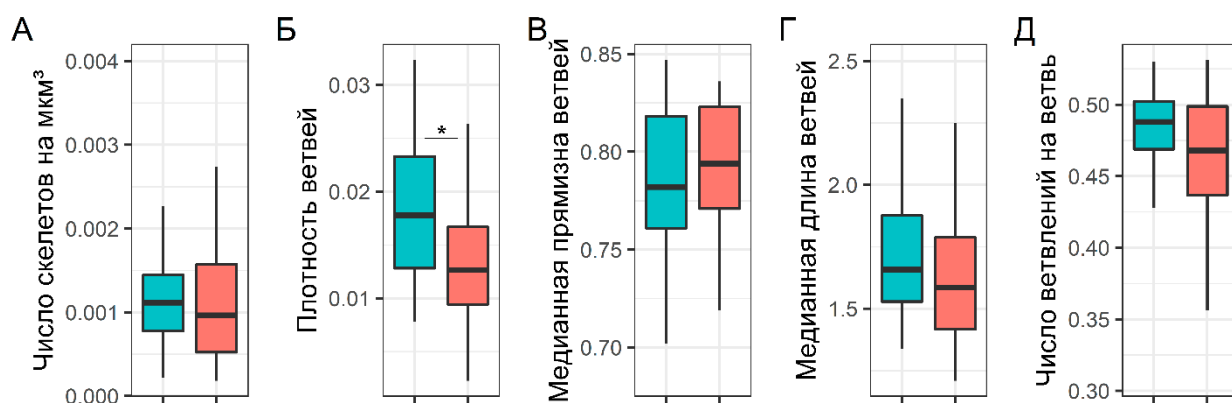


Рисунок 9. Количественный анализ распределения кортикальных тубулиновых микротрубочек в клетках клубеньков гороха линии дикого типа SGE.

(А) количество отдельных скелетов в клетке на $\mu\text{км}^3$; (Б) плотность микротрубочек (количество ветвей на $\mu\text{км}^3$); (В) медианный индекс прямизны ветвей в клетке (отношение евклидова расстояния между начальной и конечной точками каждой ветви); (Г) медианная длина ветви; (Д) количество разветвлений на одну ветвь. Синим цветом обозначены неинфицированные клетки, красным — азотфиксирующие. Количество проанализированных клеток: 30 для неинфицированных, 41 для инфицированных.

Анализ показал, что при переходе к азотфиксации в клетках гороха ориентация кортикальных микротрубочек меняется с упорядоченной на неупорядоченную, которая оказалась характерной для азотфиксирующих клеток клубеньков всех исследованных Бобовых, формирующих недетерминированные клубеньки. Остальные параметры, описывающие кортикальные микротрубочки, менялись незначительно при сравнении инфицированных и азотфиксирующих клеток гороха. Напротив, отличия в параметрах, описывающих распределение сети эндоплазматических микротрубочек, определяли различия между азотфиксирующими клетками различных видов. Отличия в организации актиновых микрофиламентов были связаны с параметрами, описывающими распределение их сети, причём значимые различия в организации актинового цитоскелета наблюдались в основном между неинфицированными и азотфиксирующими клетками внутри одного вида, при этом различия в случае азотфиксирующих клеток между двумя видами бобовых растений оказывались статистически незначимыми, демонстрируя изменения, которые претерпевает инфицированная клетка недетерминированного клубенька в ходе дифференцировки. Вероятно, наблюдаемая картина связана с различными морфотипами бактериоидов, образуемых изученными видами Бобовых.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление нового органа на корнях растений требует сложного сигнального диалога между партнёрами, а также дифференцировки клеток участников этого процесса. Несмотря на то что ранние этапы развития бобово-ризобияльного симбиоза и изменения, происходящие в растительных клетках в ходе этого, активно изучаются, молекулярные и клеточные изменения, сопровождающие дифференцировку растительных клеток при развитии зрелого клубенька, всё ещё изучены недостаточно. В данной работе были исследованы различные аспекты регуляции дифференцировки клеток симбиотического клубенька гороха посевного на уровне дифференциальной экспрессии генов, изменения уровня цитокининов, а также реорганизации цитоскелета. Результаты исследования дифференциально экспрессирующихся генов в клетках ранней зоны инфекции, поздней зоны инфекции, а также зоны азотфиксации свидетельствуют о существенных изменениях в транскрипционных профилях в ходе дифференцировки растительных клеток при развитии инфекции и переходе к азотфиксации. Получены свидетельства участия цитокининов в дифференцировке тканей клубенька и формировании симбиосом, а также их возможного влияния на процесс выхода бактерий в цитоплазму растительных клеток и их дифференцировку. Кроме того, результаты позволяют предположить, что цитокинины задействованы в негативной регуляции роста инфекционных нитей и развития инфекционных капель. Большой интерес представляет анализ изменений в распределении элементов цитоскелета в ходе развития симбиотического клубенька и дифференцировки растительных клеток, однако визуальное сравнение организации цитоскелета различных клеток зачастую

затруднено сложным характером его организации. В данной работе представлена методика количественного анализа организации тубулиновых микротрубочек и актиновых микрофиламентов, а также проведён сравнительный количественный анализ организации цитоскелета в клетках клубеньков различных Бобовых.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены существенные различия в экспрессии генов между ранней и поздней зонами инфекции; зоной поздней инфекции и зоной азотфиксации симбиотического клубенька, лежащие в основе дифференцировки инфицированных клеток. Показано, что основной вклад в уникальность транскриптомного профиля клубенька *Pisum sativum* вносят инфицированные клетки зоны азотфиксации (4 404 гена изменяют свою экспрессию при переходе клеток к фиксации молекулярного азота).

2. В процессе дифференцировки клеток клубенька гороха происходит изменение уровней экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию дифференцировки бактерий, сигнальных каскадов цитокининов и ауксина, контроля клеточного цикла и процессов транскрипции, а также динамики тубулинового цитоскелета.

3. Иммуногистохимический анализ цитокининов в клубеньках гороха дикого типа и мутантов, блокированных на различных стадиях развития клубенька, выявил позитивную регуляцию цитокининами выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки, дифференцировки бактериоидов и инфицированных клеток клубенька, а также негативную регуляцию роста инфекционных нитей и капель.

4. На основе разработанной методики количественного анализа цитоскелета выявлены показатели, численно характеризующие перестройки цитоскелета при дифференцировке азотфиксирующих клеток в клубеньках различных видов Бобовых. Так, установлено, что основные изменения в динамике цитоскелета при переходе клеток к азотфиксации связаны с изменением ориентации кортикальных микротрубочек и реорганизацией сети актиновых микрофиламентов.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., **Kusakin P.G.**, Sadovskaya A.R., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Tubulin cytoskeleton organization in cells of determinate nodules // *Frontiers in Plant Science*. — 2022. — V. 13. — P. 823183.

2. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., **Kusakin P.G.**, Sadovskaya A.R., Borisov Y.G., Tsyganov V.E. *Glycyrrhiza uralensis* nodules: histological and ultrastructural organization and tubulin cytoskeleton dynamics // *Agronomy*. — 2021. — V. 11, № 12. — P. 2508.

3. **Kusakin P.G.**, Serova T.A., Gogoleva N.E., Gogolev Y.V., Tsyganov V.E. Laser microdissection of *Pisum sativum* L. nodules followed by RNA-seq analysis revealed crucial transcriptomic changes during infected cell differentiation // *Agronomy*. — 2021. — V. 11, № 12. — P. 2504.

4. Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., Kirichek E.A., **Kusakin P.G.**, Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. General patterns and species-specific differences in the organization of the tubulin

cytoskeleton in indeterminate nodules of three legumes // *Cells*. — 2021. — V. 10, № 5. — P. 1012.

5. Dolgikh E.A.*, **Kusakin P.G.***, Kitaeva A.B., Tsyganova A.V., Kirienko A.N., Leppyanen I.V., Dolgikh A.V., Ilina E.L., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Mutational analysis indicates that abnormalities in rhizobial infection and subsequent plant cell and bacteroid differentiation in pea (*Pisum sativum*) nodules coincide with abnormal cytokinin responses and localization // *Annals of Botany*. — 2020. — V. 125, № 6. — P. 905-923.

*Авторы внесли равный вклад в работу

6. 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.

Публикации в других научных изданиях:

1. **Кусакин П.Г.**, Китаева А.Б., Цыганов В.Е. Количественный анализ организации цитоскелета в клетках симбиотического клубенька // V Всероссийская школа-конференция с международным участием для молодых учёных «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий»: сб. мат. док. (Санкт-Петербург, 6 – 8 окт. 2021 г.). — Санкт-Петербург, 2021. — С. 41.

2. **Кусакин П.Г.**, Серова Т.А., Гоголева Н.Е., Гоголев В.Ю., Цыганов В.Е. Транскриптомный анализ симбиотических клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) с использованием лазерной микродиссекции // IV школа-конференция для молодых учёных «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий»: сб. мат. док. (Санкт-Петербург, 25 дек. 2020 г.). — Санкт-Петербург, 2020. — С. 17.

3. **Кусакин П.Г.**, Серова Т.А., Гоголева Н.Е., Гоголев В.Ю., Цыганов В.Е. Транскриптомный анализ симбиотических клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) с использованием лазерной микродиссекции // PLAMIC2020 Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего: международная науч. конф.: сб. мат. док. (Саратов, 6 – 9 окт., 2020 г.). — Саратов, 2020. — С. 146.

4. **Кусакин П.Г.**, Китаева А.Б., Цыганов В.Е. Анализ паттернов актина в клубеньках *Pisum sativum* и *Medicago truncatula* // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»: тезисы докладов. (Казань, 18 – 24 сент. 2019 г.). — Казань, 2019. — С. 252.

5. **Kusakin P.G.**, Kitaeva A.B., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Immunolocalization of cytokinin in effective and ineffective pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules // 13th European nitrogen fixation conference (Stockholm, 18 – 21 Aug, 2018).

6. **Кусакин П.Г.**, Китаева А.Б., Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Иммунолокализация цитокинина в клубеньках гороха // PLAMIC2018 Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего: международная науч. конф.: сб. мат. док. (Уфа, 13 – 17 июня, 2018 г.). — Уфа, 2018. — С. 177.

7. **Кусакин П.Г.**, Китаева А.Б., Цыганов В.Е. Иммунолокализация цитокинина в клубеньках гороха // IV (XII) Международная ботаническая конференция молодых учёных в Санкт-Петербурге: сб. мат. док. (Санкт-Петербург, 22 – 28 апр. 2018 г.). — Санкт-Петербург, 2018. — С. 176.

8. **Кусакин П.Г.**, Китаева А.Б., Цыганов В.Е. Иммунолокализация цитокинина в эффективных и неэффективных клубеньках гороха // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол. уч.: сб. мат. док. (Судак, 18 – 24 сент. 2017 г.). — Судак, 2017. — С. 212.