

На правах рукописи



Серова Татьяна Александровна

**Молекулярно-генетические и физиологические механизмы старения
симбиотического клубенька гороха посевного (*Pisum sativum* L.)**

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт–Петербург
2019

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

Научный руководитель

доктор биологических наук,
Цыганов Виктор Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Гоголев Юрий Викторович,
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, заведующий лабораторией

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

Ведущая организация

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук


Защита состоится 13 ноября 2019 г. в 14.00 часов на заседании совета Д 002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В. Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376 Санкт–Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2, тел. (812)372-54-42, факс (812)372-54-43, dissovet.d00221102@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 (www.binran.ru).

Автореферат разослан «___»_____2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук  Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вследствие неблагоприятных экологических последствий, вызываемых применением химических удобрений, в настоящее время актуальной является задача обогащения почвы биологическим азотом, одним из источников которого является симбиоз бобовых растений с азотфиксирующими бактериями (Jensen *et al.*, 2012). Важным направлением улучшения симбиотических взаимоотношений является увеличение периода активной фиксации азота посредством отсрочки старения симбиотического клубенька Бобовых (Herridge, Rose, 2000). Старение является финальной стадией развития симбиоза, в ходе которой происходит вакуолярная гибель клеток клубенька и ремобилизация веществ, накопленных в клубеньке, в развивающиеся молодые органы растения. На первом этапе вакуолярной клеточной гибели содержимое клеток постепенно реутилизируется при образовании литических вакуолей, а затем в результате разрушения тонопласта и массового высвобождения гидролаз происходит быстрое разрушение клетки (van Doorn *et al.*, 2011). В ходе вакуолярной клеточной гибели макромолекулы расщепляются до аминокислот, сахарозы и амидов, которые затем транспортируются в развивающиеся органы растения. При старении недетерминированных клубеньков Бобовых, наступающем после цветения, у основания клубенька появляется зона старения, содержащая деградирующие клетки и постепенно распространяющаяся коническим фронтом в проксимально-дистальном направлении относительно основания клубенька с увеличением его возраста. Визуально старение проявляется в изменении окраски тканей клубенька от розового до коричневато-зеленого вследствие разрушения леггемоглобина и образования биливердина при деградации клеток клубенька. Изменение экспрессии многих генов, происходящее при старении симбиотического клубенька, контролируется на генетическом и гормональном уровнях. Масштабные процессы деградации веществ, наблюдаемые в ходе старения клубенька, сопровождаются значительным повышением активности протеолитических ферментов, многие из которых относятся к семейству цистеиновых протеаз (Van de Velde *et al.*, 2006).

Несмотря на активные исследования, в настоящее время информация о молекулярных механизмах, лежащих в основе старения симбиотического клубенька, ограничена. Так, остается малоизученной гормональная регуляция старения симбиотического клубенька (Karmarkar, 2014; Puppo *et al.*, 2005; Van de Velde *et al.*, 2010). Практически не исследованным остается старение симбиотического клубенька на клеточном и тканевом уровнях.

Удобными моделями для исследования процессов развития клубенька, в том числе и его старения, являются симбиотические мутанты гороха посевного (*Pisum sativum* L.). С использованием серии генотипов дикого типа и соответствующих мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза и характеризующихся наличием либо отсутствием морфологических признаков раннего старения симбиотических клубеньков, в данной работе были выявлены молекулярные

маркеры старения симбиотического клубенька *P. sativum*, проведен анализ активации раннего старения в неэффективных мутантных клубеньках и исследовано участие в старении симбиотического клубенька таких фитогормонов как этилен, абсцизовая кислота (АБК) и гиббереллины (ГА).

Цель и задачи работы. Целью данной работы являлось выявление молекулярно-генетических и гормональных механизмов регуляции старения симбиотического клубенька *P. sativum*.

Для выполнения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Провести анализ экспрессии генов, ассоциированных со старением, в клубеньках *P. sativum* серии генотипов дикого типа и полученных на их основе мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза.

2. Провести оптимизацию методики лазерной микродиссекции фиксированных тканей симбиотического клубенька *P. sativum* и последующий анализ экспрессии генов, ассоциированных со старением, в инфицированных клетках зоны азотфиксации и зоны старения у клубеньков генотипов дикого типа и мутантов, характеризующихся ранним старением клубеньков.

3. Провести анализ иммулокализации предшественника этилена, 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК), в клубеньках *P. sativum* серии генотипов дикого типа и полученных на их основе мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза.

4. Провести анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма ГА, и иммулокализацию гибберелловой кислоты (ГА₃) в клубеньках *P. sativum* родительской линии SGE и полученных на ее основе мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза.

5. Изучить влияние обработки экзогенной ГА₃ на морфологию и структуру клубеньков родительской линии SGE, а также экспрессию в них генов, ассоциированных со старением, и генов, кодирующих ферменты метаболизма ГА.

Научная новизна работы. В рамках данной работы в результате экспрессионного анализа генов, ассоциированных со старением, проведенного на уровне целого клубенька и его отдельных зон у генотипов дикого типа и мутантных линий *P. sativum*, блокированных на различных стадиях развития клубенька и проявляющих фенотип раннего старения, впервые была показана универсальность старения, индуцированного мутациями в геноме макросимбионта, как реакции на неэффективность симбиоза. Впервые была выявлена локализация предшественника этилена, АЦК, в клубеньках *P. sativum* генотипов дикого типа и мутантных линий и показана позитивная роль этилена в старении симбиотического клубенька *P. sativum* и функционировании его меристемы. Впервые на транскрипционном уровне показана позитивная регуляция старения симбиотического клубенька *P. sativum* АБК. Впервые выявлена локализация ГА в клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантных линий. Впервые проведен комплексный анализ влияния экзогенной ГА₃ на развитие и функционирование симбиотических клубеньков растений *P. sativum*. В результате

впервые доказана негативная роль ГА в процессе старения симбиотического клубенька и показано их участие в функционировании меристемы клубенька.

Теоретическая и практическая ценность. Результаты диссертации внесли существенный вклад в понимание молекулярно-генетических и гормональных механизмов регуляции старения симбиотического клубенька *P. sativum*. Так, продемонстрировано, что старение симбиотического клубенька является универсальной реакцией на его неэффективность, индуцированную мутациями в генах макросимбионта. Результаты данной работы являются важным шагом в разработке теоретических основ селекции бобовых культур с поздним наступлением старения симбиотического клубенька, обеспечивающим оптимальный период активной фиксации азота. В результате данной работы были выявлены гены (*PsCyp15a*, *PsTPP*, *PsATB2*, *PsGA2ox1*, *PsACO1*, *PsNCED2* и *PsAO3*), снижение экспрессии которых может привести к отсрочке старения симбиотического клубенька. Перспективной представляется разработка технологий экзогенной обработки корневых систем бобовых культур ГК₃, что может привести к продлению сроков азотфиксации клубеньков.

Положения, выносимые на защиту.

1. Гены, кодирующие цистеиновую протеазу 15a (*PsCyp15a*) и тиоловую протеазу (*PsTPP*), фактор транскрипции bZIP (*PsATB2*), ферменты биосинтеза этилена (*PsACO1*) и АБК (*PsNCED2*, *PsAO3*) и фермент деактивации биоактивной формы ГА (*PsGA2ox1*), являются адекватными молекулярными маркерами старения симбиотического клубенька *P. sativum*.

2. Индукция старения симбиотического клубенька является универсальной реакцией растения на неэффективность симбиоза, индуцированную мутациями в генах макросимбионта, что подтверждается активацией генов, ассоциированных со старением, у всех проанализированных неэффективных мутантов, на более ранней стадии развития клубенька по сравнению с диким типом, а также локализацией в клубеньках ГА₃ и АЦК.

3. Этилен и ГА вовлечены в функционирование меристемы клубенька, при этом этилен вовлечен в позитивную регуляцию старения клубенька, а ГА – в негативную.

4. Старение симбиотического клубенька *P. sativum*, индуцированное мутациями в генах макросимбионта, активируется сильнее и развивается быстрее, чем естественное старение.

Личный вклад соискателя.

Все исследования, посвященные изучению молекулярно-генетических и гормональных механизмов регуляции старения симбиотического клубенька *P. sativum*, проведены лично автором. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем работы.

Степень достоверности.

Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с

использование современных методик на высокотехнологичном оборудовании в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: II (X) Международной ботанической конференции молодых ученых (2012 г., Санкт-Петербург), 6-й Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (2012 г., Саратов), 6-м съезде ВОГиС (2014 г., Ростов-на-Дону), 18-й Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (2014 г., Пущино), Международной конференции «Генетическая интеграция про- и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии» (2015 г., Санкт-Петербург), Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» и 8-м Съезде Общества физиологов растений России (2015 г., Петрозаводск), III (XI) Международной ботанической конференции молодых ученых (2015 г., Санкт-Петербург), Годичном собрании общества физиологов растений России и Научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (2016 г., Санкт-Петербург), 4-м Международном симпозиуме по сигналингу и поведению растений (2016 г., Санкт-Петербург), 12-й Европейской конференции по азотфиксации и геномике азотфиксирующих организмов (2016 г., Будапешт, Венгрия), IV(XII) Международной ботанической конференции молодых ученых (2018 г., Санкт-Петербург), 13-й Европейской конференции по азотфиксации (2018 г., Стокгольм, Швеция).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы (306 источников), приложение. Работа изложена на 181 странице, и содержит 51 рисунок и 5 таблиц (с приложением: 55 рисунков и 6 таблиц).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы изложено описание развития симбиотического клубенька. Особое внимание уделено описанию финальной стадии развития симбиоза – старению, описано участие в нем фитогормонов и факторов транскрипции. Описан метод лазерной микродиссекции и его использование в исследованиях растительно-микробных взаимодействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе были использованы генотипы дикого типа и симбиотические мутанты *Pisum sativum* L. из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ: Sparkle (коммерческий сорт), мутант E135F (*Pssym13*) (Kneen *et al.*, 1990); лабораторная

линия SGE (Kosterin, Rozov, 1993), мутанты SGEFix⁻¹ (*Pssym40*), SGEFix⁻² (*Pssym33*) (Tsyganov *et al.*, 1998), SGEFix⁻³ (*Pssym26*) (Tsyganov *et al.*, 2000), SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*) (Цыганов *и др.*, 2012); лабораторная линия Sprint-2 (Бердников *и др.*, 1989) и мутант Sprint-2Fix⁻ (*Pssym31*) (Borisov *et al.*, 1997). Все мутанты, за исключением Sprint-2Fix⁻ (*Pssym31*) и SGEFix⁻² (*Pssym33*), характеризуются преждевременной деградацией симбиотических структур.

Штаммы бактерий. В работе были использованы штаммы клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Wang *et al.*, 1982) и *R. leguminosarum* CIAM 1026 (Safronova, Novikova, 1996).

Условия выращивания растений. В качестве субстрата при выращивании растений был использован вермикулит, дополненный безазотным питательным раствором (Fähræus, 1957). Растения были выращены в климатических камерах при контролируемых условиях. Сбор клубеньков для последующих анализов проводился через 10-й день, 2-ю (3-ю – для генотипов Sparkle и E135F (*Pssym13*)), 4-ю и 6-ю неделю после инокуляции (ДПИ, НПИ).

Количественная оценка клубенькообразования при обработке растений экзогенной ГА₃. Растения линии SGE были обработаны посредством добавления в субстрат 10⁻⁶М раствора ГА₃. Побеги корни и клубеньки контрольных и обработанных растений через 2, 4 и 6 НПИ были высушены при 42 °С и взвешены, было посчитано количество клубеньков на растение. Размер отдельных клубеньков и доля зоны старения были измерены посредством определения их площадей проекций.

Молекулярно-генетические методы. Тотальная РНК была выделена из целых клубеньков с помощью реагента PureZol Isolation Reagent (Bio-Rad) согласно протоколу производителя. ПЦР в режиме реального времени проводился с использованием iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) в автоматическом амплификаторе C1000TM Thermal Cycler, совмещенном с оптическим модулем CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad). В качестве референсного гена был использован ген *PsGapC1* (L07500.1).

Лазерная микродиссекция. Для лазерной микродиссекции использовались препараты клубеньков *P. sativum*, фиксированных в растворе метакарн (60% метанол, 30% хлороформ, 10% ледяная уксусная кислота). Вырезание целевых областей проводилось с помощью системы PALM MicroBeam (Carl Zeiss). Тотальная РНК была выделена с помощью набора PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus Engineering Inc.) амплификация РНК осуществлялась при использовании набора MessageAmp II aRNA Amplification kit (Ambion Inc.). Синтез кДНК проводился с помощью SuperScript reverse transcriptase III (Invitrogen).

Световая и лазерная конфокальная сканирующая микроскопия. Анализ гистологической организации клубеньков контрольных и обработанных ГА₃ растений проводился с помощью световой микроскопии срезов, окрашенных толуидиновым синим. Для выявления АЦК и ГА₃ срезы клубеньков были инкубированы с соответствующими первичными поликлональными антителами (Agrisera). В качестве

вторичных антител были использованы антитела к IgG, конъюгированные с Alexa-Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). ДНК ядер и бактерий была окрашена йодидом пропидия. Исследование образцов проводилось с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss). Визуализация целых клубеньков проводилась с помощью стереомикроскопа SteREO Lumar. V12 (Carl Zeiss).

Статистические методы и программное обеспечение. Статистическая обработка данных проводилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft). Лазерная микродиссекция осуществлялась с помощью PALM Robo 43 (Carl Zeiss). Для световой микроскопии и определения площади проекции клубеньков было использовано программное обеспечение ZEN 2 core SP1 (Carl Zeiss), для конфокальной микроскопии – ZEN2009 (Carl Zeiss). Визуализация целых клубеньков осуществлялась посредством программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Анализ экспрессии генов, ассоциированных со старением, в клубеньках дикого типа и мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза

В рамках данной работы были подобраны гены-кандидаты на роль молекулярных маркеров старения, и проведен анализ их экспрессии в клубеньках *P. sativum* у двух модельных систем: 1) на основе генотипов дикого типа Sparkle и Sprint-2; 2) на основе линии SGE. Анализируемые гены кодируют: цистеиновые протеазы 1 и 15a (*PsCyp1*, *PsCyp15a*), тиоловую протеазу (*PsTPP*), фактор транскрипции bZIP (*PsATB2*), ферменты биосинтеза этилена (*PsACS2*, *PsACO1*) и АБК (*PsNCED2*, *PsAO3*), фермент деактивации ГА (*PsGA2ox1*).

С увеличением возраста клубеньков генотипов дикого типа и мутантных линий *P. sativum* наблюдалось повышение уровня экспрессии анализируемых генов (Рисунок 1). В клубеньках дикого типа значительное возрастание уровня транскриптов наблюдалось только через 6 НПИ. В клубеньках рано стареющих мутантов значительное повышение уровня транскриптов было детектировано уже через 4 НПИ, на стадии, соответствующей активной фиксации азота у дикого типа. В случае мутантов, характеризующихся отсутствием выраженных морфологических признаков раннего старения клубеньков, также был отмечен высокий уровень экспрессии анализируемых генов, однако содержание большинства транскриптов в 4-х и 6-ти недельных клубеньках было ниже по сравнению с рано стареющими мутантами.

2. Анализ экспрессии генов, ассоциированных со старением, в инфицированных клетках зоны азотфиксации и зоны старения у клубеньков дикого типа и мутантов, характеризующихся ранним старением клубеньков

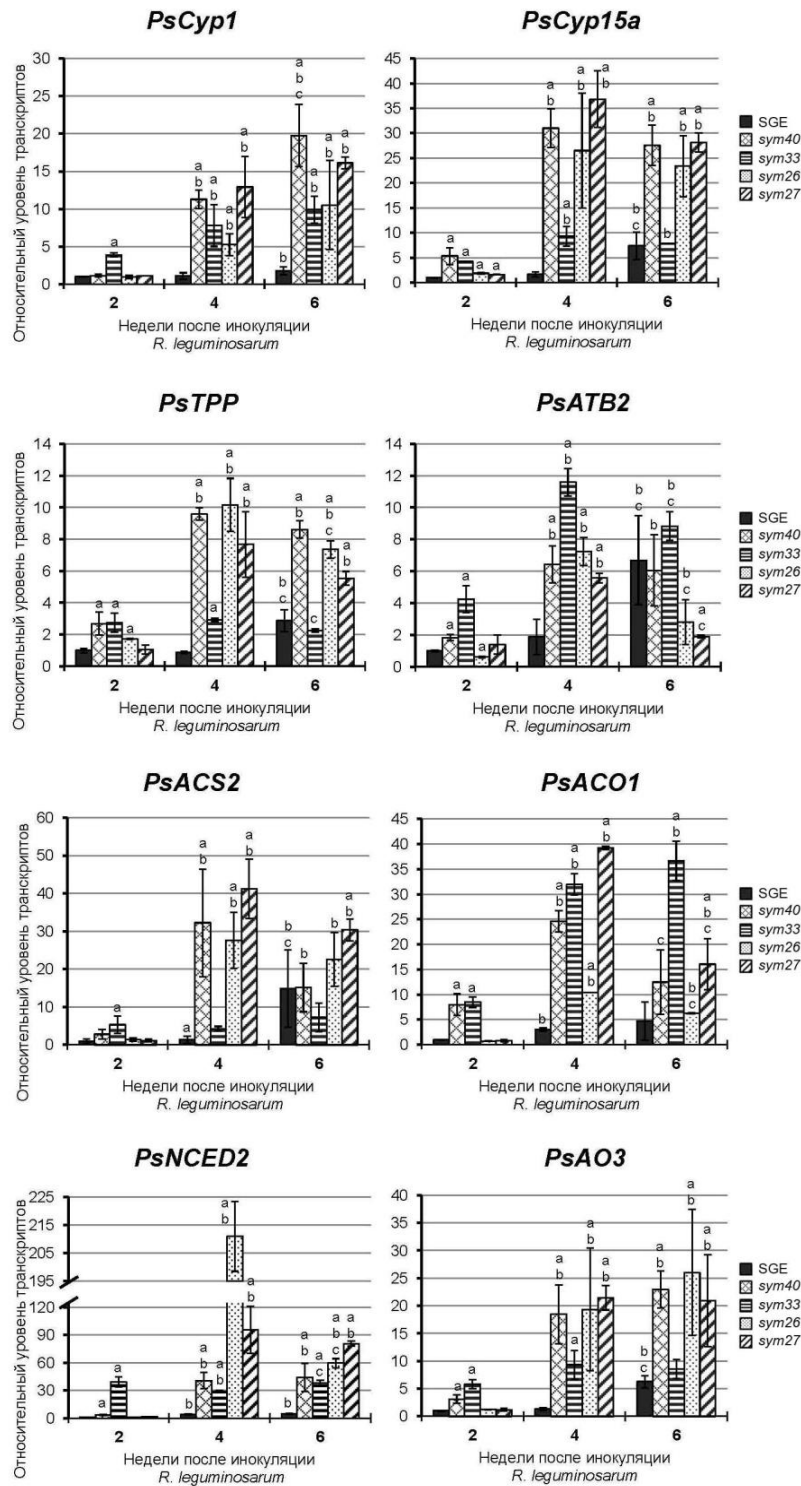


Рисунок 1. – Относительная экспрессия генов *PsCyp1*, *PsCyp15a*, *PsTPP*, *PsATB2*, *PsACS2*, *PsACO1*, *PsNCED2* и *PsAO3* в клубеньках дикого типа SGE и соответствующих мутантах (SGEFix⁻¹ (*Pssym40*), SGEFix⁻² (*Pssym33*), SGEFix⁻³ (*Pssym26*) и SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*)) через 2, 4 и 6 НИИ

Буквами обозначены статистически значимые различия ($P \leq 0,05$): а, от дикого типа SGE в пределах одной временной точки; b, при сравнении с 2-х недельными клубеньками в пределах генотипа; c, при сравнении с 4-х недельными клубеньками в пределах генотипа.

В рамках данной работы была проведена оптимизация методики подготовки препаратов для лазерной микродиссекции фиксированных симбиотических клубеньков *P. sativum* и последующего получения препаратов РНК и кДНК для анализа экспрессии генов, ассоциированных со старением, в разных тканях симбиотического клубенька *P. sativum* (Kuznetsova *et al.*, 2010).

Анализ экспрессии генов-кандидатов на роль молекулярных маркеров старения был проведен на уровне зон азотфиксации и старения в клубеньках сорта Sparkle и мутанта E135F (*Pssym13*) и линии SGE и мутанта SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*) (Рисунок 2). Уровень экспрессии большинства из анализируемых генов повышался при деградации клеток симбиотического клубенька *P. sativum* у дикого типа и рано стареющих мутантов (Рисунок 3). Невысокий уровень транскриптов *PsCyp1* был детектирован только в азотфиксирующих клетках сорта Sparkle. Содержание *PsACS2* транскриптов снижалось с увеличением степени деградации клеток у SGE и SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*).

3. Анализ иммунолокализации предшественника этилена, АЦК, в клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза

Для выявления роли этилена в старении симбиотического клубенька *P. sativum* была проведена иммунолокализация его предшественника, АЦК, в клубеньках разного возраста родительских и мутантных линий (Рисунок 4, 5). С увеличением возраста клубеньков дикого типа было отмечено возрастание содержания АЦК (Рисунок 5А–М). В молодых клубеньках мутантов уровень сигнала АЦК был выше, чем в клубеньках генотипов дикого типа (Рисунок 4). При этом наиболее высокий уровень АЦК был детектирован в клетках рано стареющих мутантов (Рисунок 4К–П).

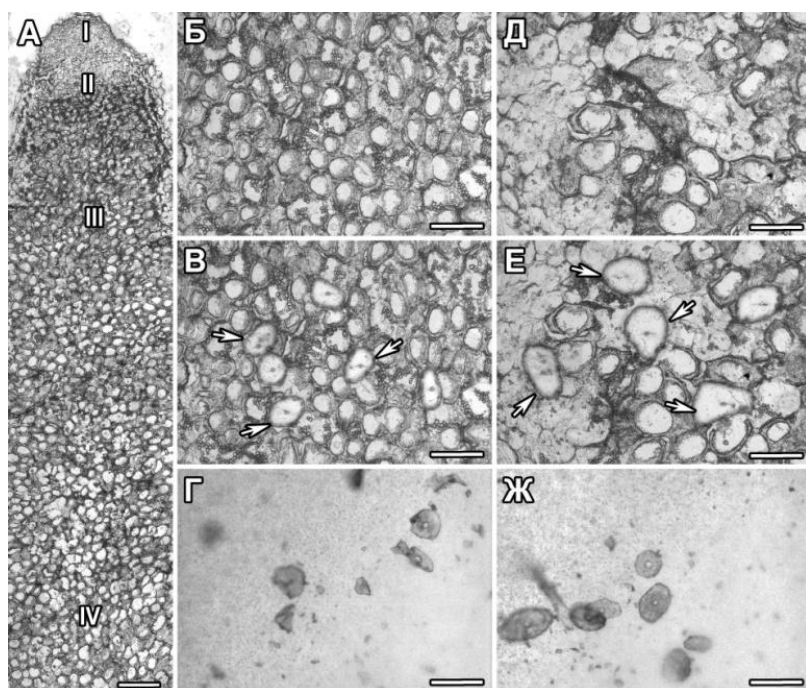


Рисунок 2. – Лазерная микродиссекция инфицированных клеток клубеньков дикого типа SGE через 4 НПИ

(А) Гистологическая организация клубенька. Инфицированные клетки зоны III (Б, В, Г) и зоны IV (Д, Е, Ж) до вырезания (Б, Д), после вырезания (В, Е), вырезанные клетки (Г, Ж). I – меристема, II – зона инфекции, III – зона азотфиксации, IV – зона старения; наконечниками стрелок обозначены области

после вырезания. Масштабная линейка = (А) 150 мкм, (Б–Ж) 75 мкм.

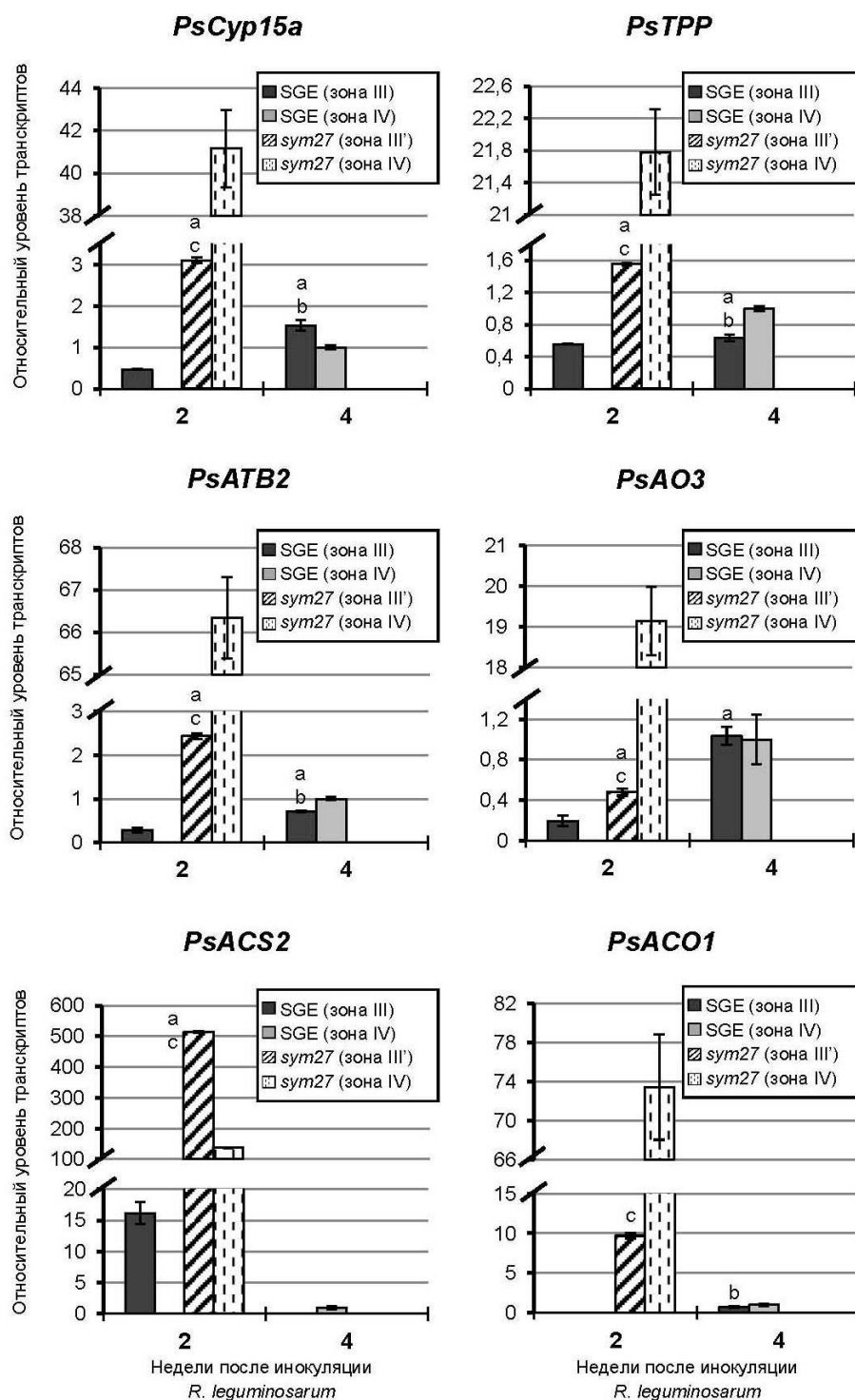


Рисунок 3. – Относительная экспрессия генов *PsCyp15a*, *PsTPP*, *PsATB2*, *PsAO3*, *PsACS2* и *PsACO1* в инфицированных клетках зон III (III') и IV клубеньков *P. sativum* дикого типа SGE и мутанта SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*) через 2 и 4 НПИ

Буквами обозначены статистически значимые различия ($P \leq 0,05$): а, от 2-х недельных клубеньков дикого типа SGE (зона III); б, между зоной III и зоной IV 4-х недельных клубеньков дикого типа SGE; с, между зоной III' и зоной IV 2-х недельных клубеньков мутанта SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*). Изменения в шкале обозначены разрывом гистограммы. III – зона азотфиксации, III' – зона, соответствующая зоне азотфиксации в клубеньках дикого типа, IV – зона старения.

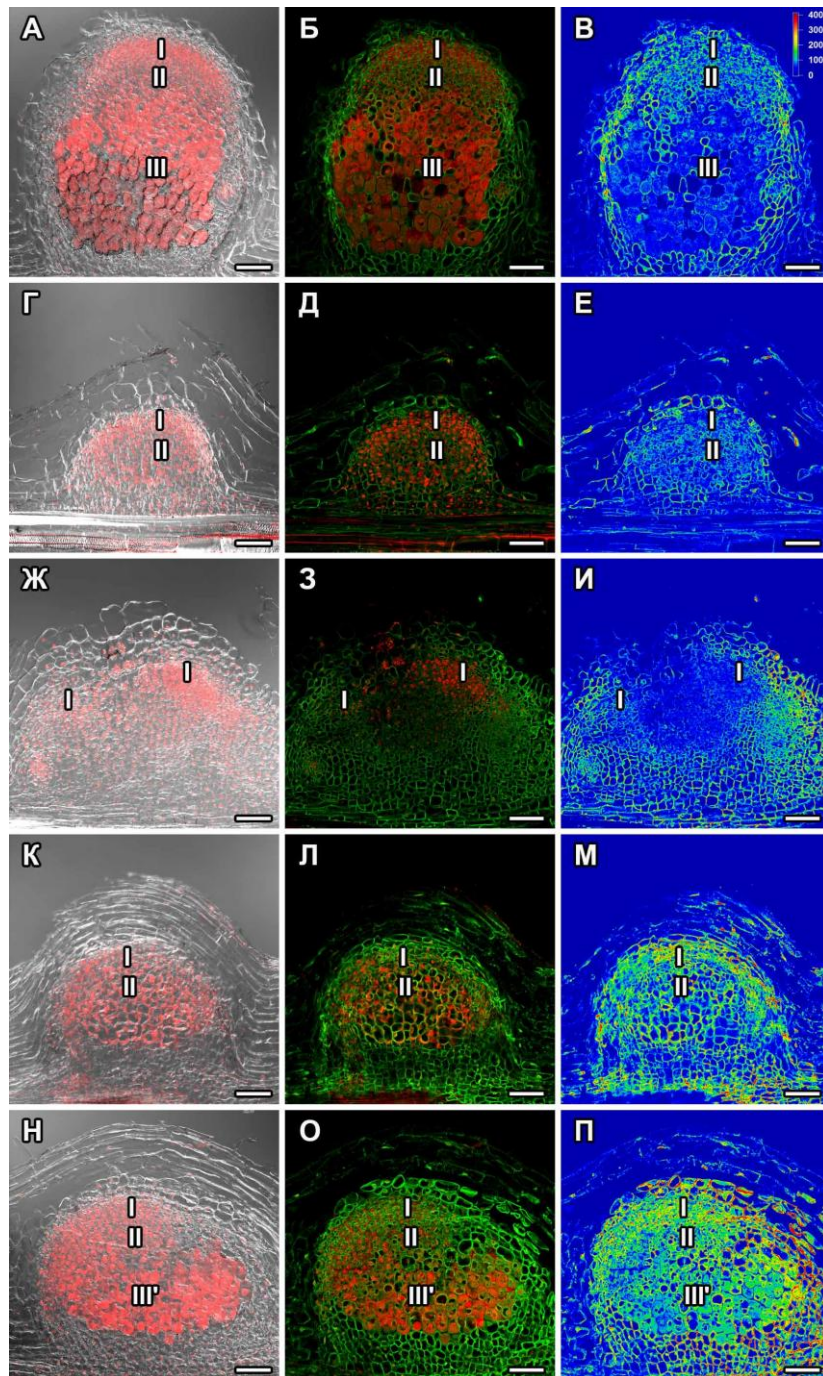


Рисунок 4. – Иммулокализация АЦК в клубеньках дикого типа (А–В) и соответствующих мутантов (SGEFix⁻¹ (*Pssym40*) (Г–Е), SGEFix⁻² (*Pssym33*) (Ж–И), SGEFix⁻³ (*Pssym26*) (К–М) и SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*) (Н–О)) через 10 ДПИ

I – меристема, II – зона инфекции, III – зона азотфиксации, III' – зона, соответствующая зоне азотфиксации в клубеньках дикого типа. Наложение дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) и красного канала (А, Г, Ж, К, Н), наложение зеленого и красного каналов (Б, Д, З, Л, О). Тепловая карта с обозначением распределения интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (В, Е, И, М, П). Зеленый канал – АЦК, красный канал – ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 100 мкм.

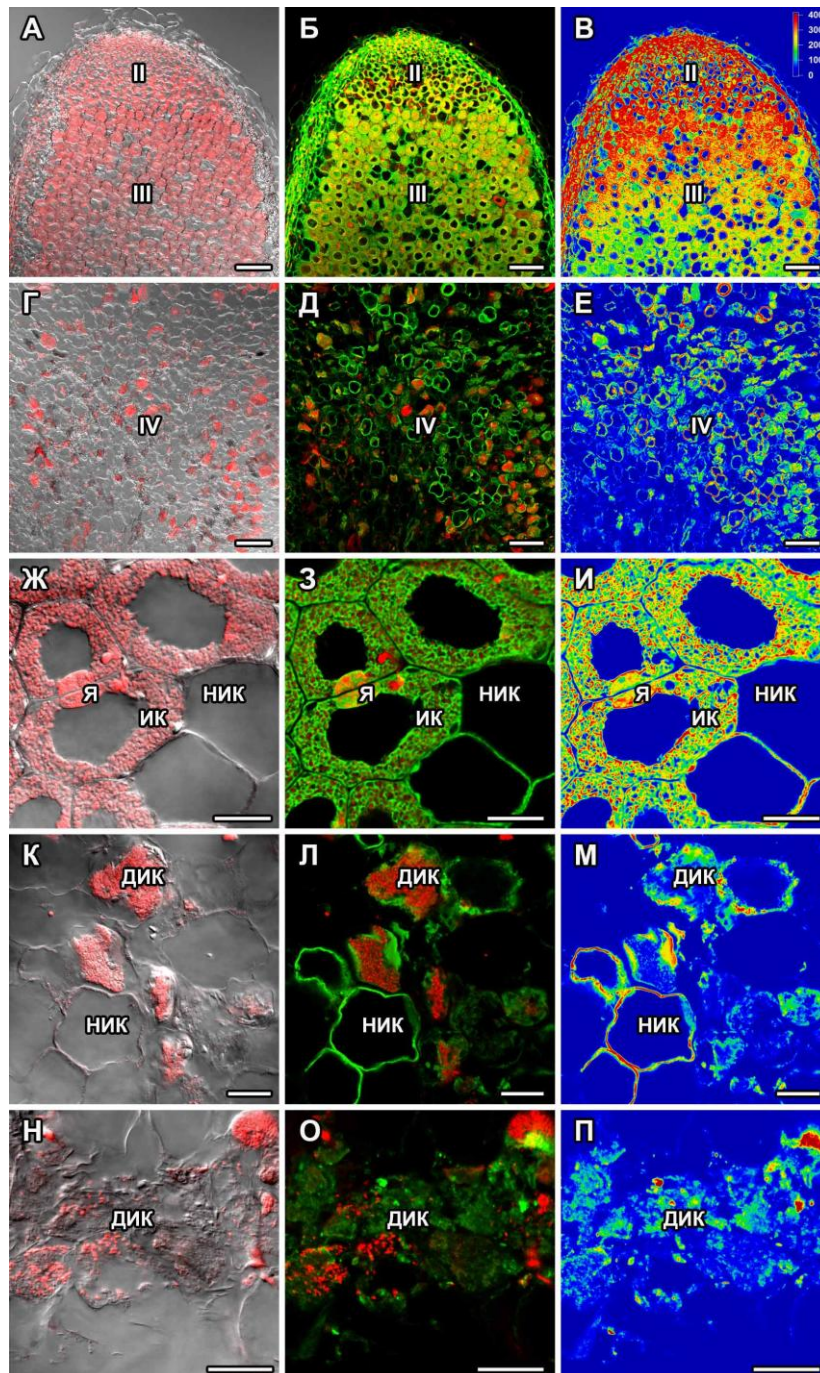


Рисунок 5. – Иммунолокализация АЦК в клубеньках дикого типа (А–М) через 6 НПИ и клетках центральной части клубеньков мутанта *SGEFix⁻³ (Pssym26)* (Н–П) через 4 НПИ

Клубеньки дикого типа: клетки зоны азотфиксации (Ж–И), клетки зоны старения (К–М). II – зона инфекции, III – зона азотфиксации, IV – зона старения. ИК, инфицированная клетка; ДИК, деградирующая инфицированная клетка; НИК, неинфицированная клетка; Я, ядро. Наложение ДИК и красного канала (А, Г, Ж, К, Н), наложение зеленого и красного каналов (Б, Д, З, Л, О). Тепловая карта с обозначением распределения интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (В, Е, И, М, П). Зеленый канал – АЦК, красный канал – ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = (А–Е) 100 мкм, (Ж–П) 20 мкм.

Высокая интенсивность сигнала была отмечена в зоне меристемы клубеньков генотипов дикого типа и мутантных линий (Рисунок 4). Метка АЦК была детектирована в цитоплазме и ядрах инфицированных и неинфицированных клеток. В зоне старения высокий уровень сигнала был отмечен в клетках, находящихся в процессе деградации (Рисунок 5К–П).

4. Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма ГА, в клубеньках *P. sativum* родительской линии SGE и полученных на ее основе мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза

Для выявления роли ГА в старении симбиотического клубенька *P. sativum* был проведен анализ экспрессии генов метаболизма ГА. С увеличением возраста клубеньков дикого типа и мутантов наблюдалось снижение уровня транскриптов гена, кодирующего один из ферментов биосинтеза ГА (*PsGA20ox1*), и повышение экспрессии гена, кодирующего фермент деактивации ГА (*PsGA2ox1*). При развитии клубеньков мутанта SGEFix⁻² (*Pssym33*) изменения в уровне транскриптов не были статистически значимы.

5. Анализ иммулокализации ГА₃ в клубеньках *P. sativum* родительской линии SGE и полученных на ее основе мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза

В дополнение к данным анализа экспрессии генов метаболизма ГА была проведена иммулокализация биоактивной формы ГА₃ в анализируемых вариантах клубеньков *P. sativum* (Рисунок 6, 7). Снижение содержания ГА₃ наблюдалось с увеличением возраста клубеньков дикого типа и мутантов (Рисунок 7). Сигнал мечения ГА₃ был детектирован в цитоплазме и ядрах инфицированных и неинфицированных клеток (Рисунок 6), и также в клетках меристемы. В зоне старения следовые количества метки ГА₃ были отмечены в неинфицированных клетках, деградирующих позже, чем инфицированные (Рисунок 7К–П).

6. Анализ влияния экзогенной обработки ГА₃ на развитие растений и клубеньков родительской линии SGE

Выявление роли биоактивных ГА в старении симбиотического клубенька *P. sativum* проводилось также путем обработки растений линии SGE экзогенной ГА₃.

Количественная оценка клубенькообразования у контрольных и обработанных ГА₃ растений дикого типа SGE

В ходе развития клубеньков контрольных и обработанных ГА₃ растений наблюдалось увеличение, как сухого веса, так и размера клубеньков (Рисунок 8А–Е, Таблица 1). При этом средний сухой вес и площадь проекции клубеньков в случае обработки ГА₃ превышали таковые у контроля. Количество клубеньков у обработанных ГА₃ растений также было ниже, чем у контрольных растений. Через 6 НПИ у растений, обработанных ГА₃, количество клубеньков без видимых признаков старения было в 2,8 раза выше по сравнению с контролем. Несмотря на наличие зоны старения, занимающей 34% площади проекции целого клубенька, большая часть клубенька у обработанных ГА₃ растений через 6 НПИ была представлена зоной

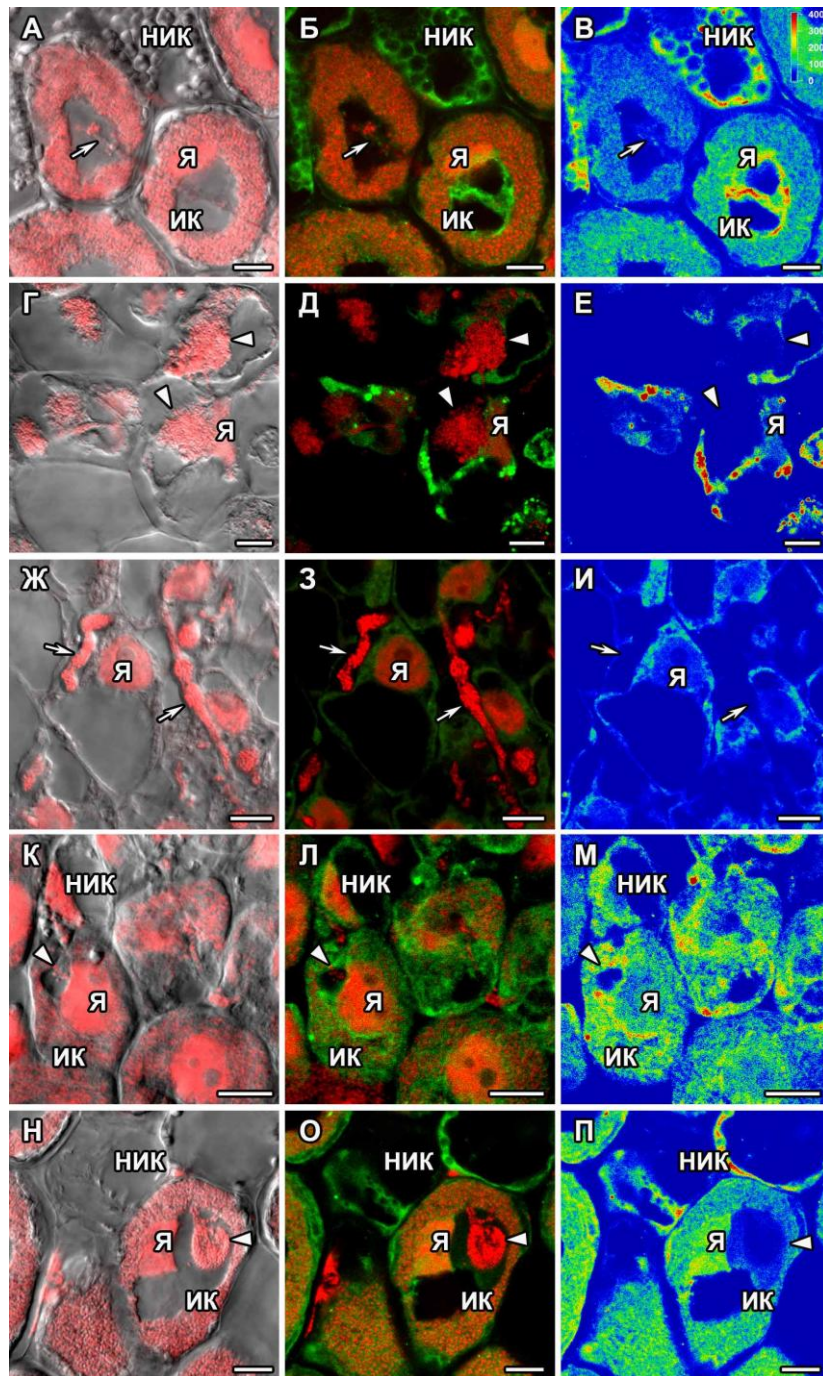


Рисунок 6. – Иммулокализация гибберелловой кислоты (ГАЗ) в клетках центральной части клубеньков дикого типа (А–В) и соответствующих мутантов (SGEFix⁻¹ (*Pssym40*) (Г–Е), SGEFix⁻² (*Pssym33*) (Ж–И), SGEFix⁻³ (*Pssym26*) (К–М) и SGEFix⁻⁷ (*Pssym27*) (Н–П)) через 2 НПИ

ИК, инфицированная клетка; НИК, неинфицированная клетка; Я, ядро. Стрелками обозначены инфекционные нити, наконечниками стрелок обозначены инфекционные капли. Наложение ДИК и красного канала (А, Г, Ж, К, Н), наложение зеленого и красного каналов (Б, Д, З, Л, О). Тепловая карта с обозначением распределения интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (В, Е, И, М, П). Зеленый канал – ГАЗ, красный канал – ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = 10 мкм.

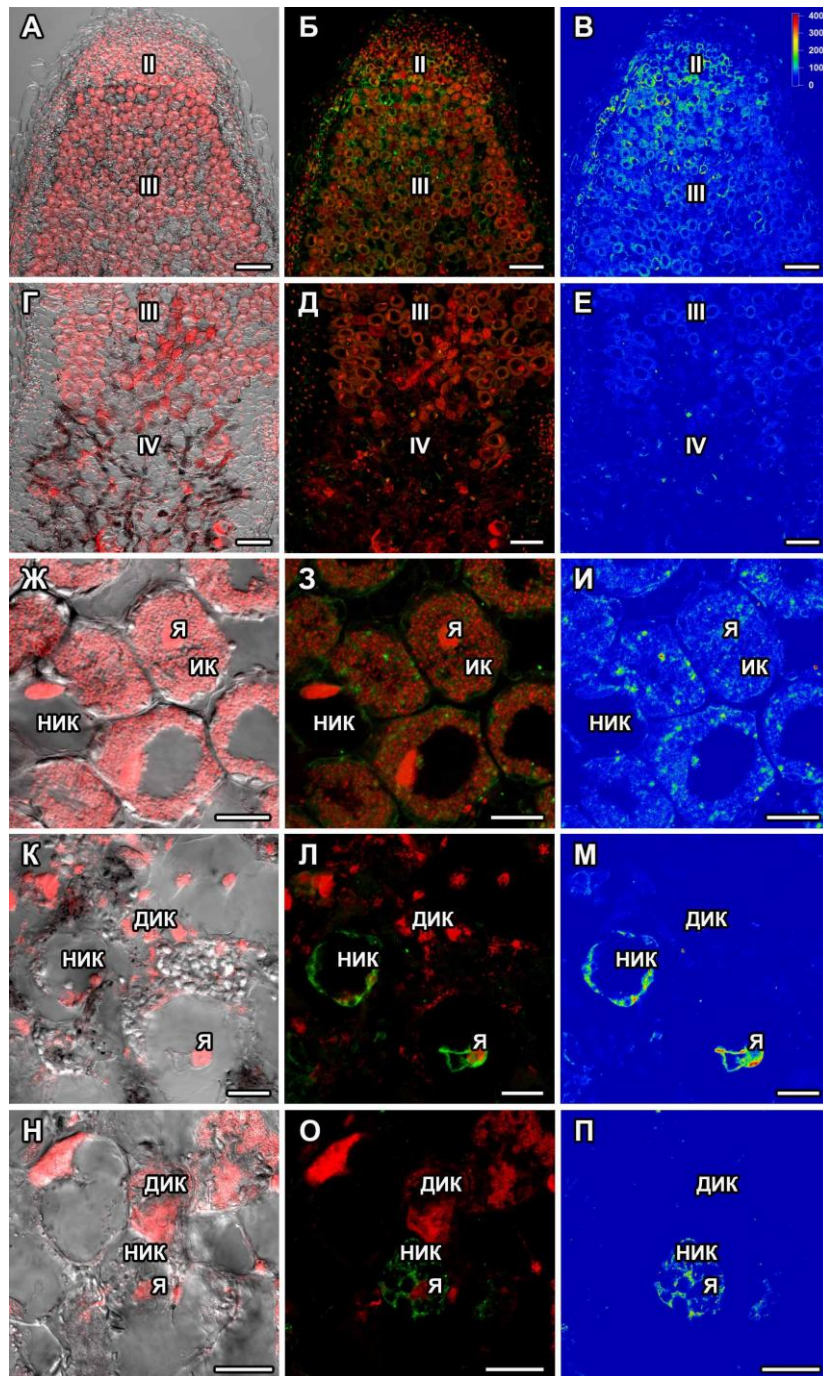


Рисунок 7. – Иммунолокализация гибберелловой кислоты (GA₃) в клубеньках дикого типа (А–М) через 6 НПИ и клетках центральной части клубенька мутанта SGEFix⁻³ (*Pssym26*) (Н–П) через 4 НПИ

Клубеньки дикого типа: клетки зоны азотфиксации (Ж–И), клетки зоны старения (К–М). II – зона инфекции, III – зона азотфиксации, IV – зона старения. ИК, инфицированная клетка; ДИК, деградирующая инфицированная клетка; НИК, неинфицированная клетка; Я, ядро. Наложение ДИК и красного канала (А, Г, Ж, К, Н), наложение зеленого и красного каналов (Б, Д, З, Л, О). Тепловая карта с обозначением распределения интенсивности флуоресцентного сигнала зеленого канала (В, Е, И, М, П). Зеленый канал – GA₃, красный канал – ДНК ядер и бактерий/бактероидов. Масштабная линейка = (А–Е) 100 мкм, (Ж–П) 20 мкм.

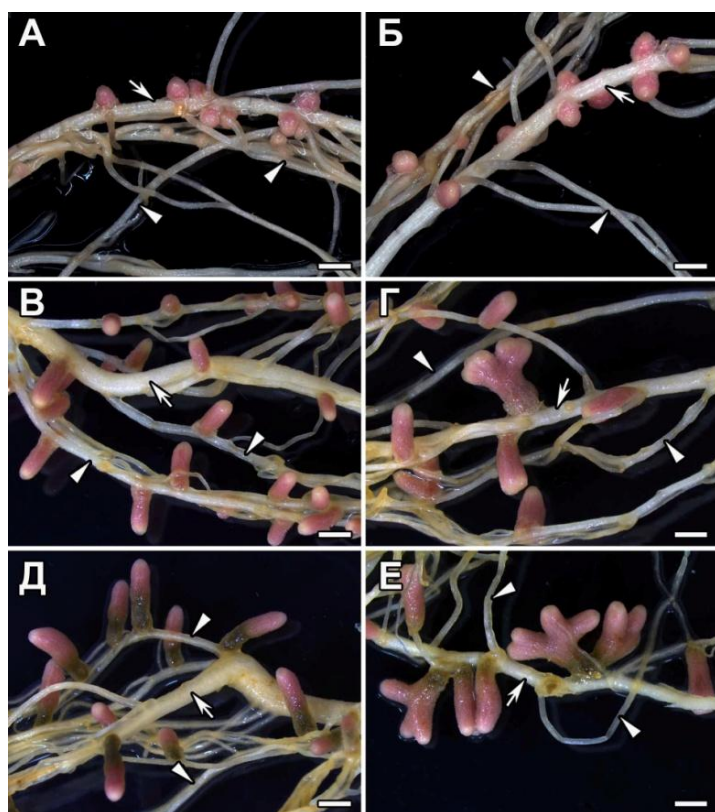


Рисунок 8. – Корни контрольных (А, В, Д) и обработанных экзогенной ГА₃ (Б, Г, Е) растений *P. sativum* дикого типа SGE, несущие симбиотические клубеньки, через 2, 4 и 6 НПИ

Стрелками обозначены главные корни; наконечниками стрелок обозначены боковые корни. Масштабная линейка = 2 мм.

Таблица 1. Количественная оценка клубенькообразования у контрольных и обработанных ГА₃ растений линии SGE через 2, 4 и 6 НПИ

Вариант	НПИ	Средний вес одного клубенька, мг	Доля клубеньков с несколькими меристемами, %	Доля клубеньков без зоны старения, %	Площадь проекции целого клубенька, мм ² *	Доля зоны старения, % от площади проекции целого клубенька*
SGE	2	0,1±0,008	НД	НД	0,91±0,05	НД
	4	0,27±0,012 ^b	9,13±1,91	НД	2,82±0,12 ^b	НД
	6	0,28±0,016 ^b	3,63±0,74	13,92±2,34	3,56±0,17 ^{b c}	62,37±2,47
SGE + 10 ⁻⁶ М ГА ₃	2	0,21±0,018 ^a	НД	НД	1,63±0,07 ^a	НД
	4	0,67±0,085 ^{a b}	32,52±4,86 ^a	НД	5,48±0,35 ^{a b}	НД
	6	0,64±0,15 ^{a b}	23,01±4,57 ^a	40,26±3,96_a	5,84±0,76 ^{a b}	33,98±3,08^a

Результаты представлены в виде среднего ± SE (n = 9-16), * ± SEM (n = 8-13). Буквами обозначены статистически значимые различия (P ≤ 0,01): а, от необработанных контрольных растений; b, от 2-х недельных клубеньков; с, от 4-х недельных клубеньков. НД – нет данных.

азотфиксации. В 6-ти недельных клубеньках контрольных растений преобладала зона старения, занимающая 62% площади проекции клубенька. При обработке ГА₃ у 4-х и 6-ти недельных клубеньков было отмечено выраженное ветвление клубеньков вследствие формирования нескольких меристем, превышавшее таковое у контроля.

Анализ гистологической организации клубеньков у контрольных и обработанных ГА₃ растений дикого типа SGE

У контрольных и обработанных ГА₃ клубеньков наблюдалась зональность, характерная для недетерминированных клубеньков. Зона старения у 6-ти недельных клубеньков контрольных растений занимала большую часть клубенька и содержала полость, сформированную вследствие лизиса старых клеток. Клубеньки растений, обработанных экзогенной ГА₃, характеризовались наличием обширной зоны азотфиксации и, меньшей по сравнению с контролем, зоны старения.

Анализ экспрессии генов, ассоциированных со старением, в клубеньках контрольных и обработанных экзогенной ГА₃ растений дикого типа SGE

Для исследования роли ГА в процессе старения клубенька на уровне транскрипции был проведен анализ экспрессии генов, ассоциированных со старением, в клубеньках контрольных и обработанных ГА₃ растений. При развитии клубеньков контрольных растений наблюдалось повышение уровня экспрессии генов, ассоциированных со старением. В случае обработки ГА₃ возрастание уровня транскриптов было менее выраженным, и в 6-ти недельных клубеньках содержание мРНК анализируемых генов было ниже по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе были подобраны молекулярные маркеры старения симбиотического клубенька *P. sativum*, использованные для сравнения разных генотипов дикого типа и соответствующих мутантов, характеризующихся как ранним старением клубеньков, так и отсутствием морфологических признаков деградации симбиотических структур. Данные маркеры представляют собой гены, продукты которых задействованы в различных процессах, проходящих на финальной стадии развития бобово-ризобияльного симбиоза. На протяжении старения симбиотического клубенька наиболее активно экспрессируемыми являются гены, кодирующие цистеиновые протеазы, которые осуществляют масштабную деградацию белка (Kardailsky, Brewin, 1996; Van de Velde *et al.*, 2006). В данной работе с увеличением возраста исследуемых генотипов дикого типа и мутантных линий *P. sativum* в симбиотических клубеньках наблюдалось повышение уровня транскриптов генов *PsCyp1*, *PsCyp15a*, кодирующих цистеиновые протеазы, и гена *PsTPP*, кодирующего тиоловую протеазу. При анализе клеток, вырезанных из различных зон клубеньков дикого типа и рано стареющих мутантов, было показано возрастание содержания транскриптов *PsCyp15a* и *PsTPP*, но не *PsCyp1*, что может свидетельствовать о более важной роли цистеиновой протеазы 15a и тиоловой протеазы в процессе старения симбиотического клубенька *P. sativum*. Многие процессы в развитии растений, в том

числе и симбиотические взаимодействия с азотфиксирующими бактериями, регулируются на уровне транскрипции, в основном при участии транскрипционных факторов (D'haeseleer *et al.*, 2010; de Zélicourt *et al.*, 2012; Karmarkar, 2014). Ранее при развитии клубеньков люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.) было показано повышение экспрессии гена *MtATB2*, кодирующего фактор транскрипции bZIP, активируемого сахарозой (D'haeseleer *et al.*, 2010). В данной работе было показано повышение уровня экспрессии гена *PsATB2* при развитии клубеньков от 2 до 4 НПИ у всех исследуемых генотипов *P. sativum*, а также при протекании активных процессов деградации в клетках рано стареющих мутантов. Однако через 6 НПИ в клубеньках мутантов наблюдалось снижение уровня транскриптов *PsATB2*, что, вероятно, связано с низким содержанием сахарозы на стадии глубокой деградации тканей клубенька.

Старение симбиотического клубенька находится под контролем различных фитогормонов (Purro *et al.*, 2005; Van de Velde *et al.*, 2006; Guinel, 2015). В данной работе исследовано участие в финальной стадии развития симбиоза этилена, АБК и ГА. С увеличением возраста клубеньков исследуемых генотипов *P. sativum* было отмечено возрастание экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза АБК, *PsNCED2* и *PsAO3*, что свидетельствует о возможном участии АБК в финальной стадии развития симбиоза. Возрастание уровня транскриптов также наблюдалось при деградации клеток родительских линий и рано стареющих мутантов. Ранее была предложена гипотеза (Purro *et al.*, 2005), согласно которой уменьшение пула антиоксидантов и повышение азот/углеродного соотношения внутри клубенька может способствовать его старению. Эти изменения могут восприниматься и передаваться посредством сигнального пути, ассоциированного с АБК, мобилизующей протеолитическую активность в стареющем симбиотическом клубеньке.

В данной работе было показано повышение экспрессии генов ключевых ферментов биосинтеза этилена (АЦК синтазы и АЦК оксидазы), *PsACS2* и *PsACO1*, при развитии симбиотического клубенька *P. sativum* (Рисунок 9А, Б). С увеличением возраста клубеньков дикого типа было отмечено повышение содержания предшественника этилена, АЦК (Рисунок 9А). Однако в клубеньках мутантов максимальный уровень сигнала АЦК, превосходящий таковой в клубеньках дикого типа, был детектирован в молодых и зрелых клубеньках, с последующим спадом через 4 НПИ, что может быть связано с более интенсивными процессами деградации в случае нарушения симбиоза (Рисунок 9Б). Позитивная роль этилена в старении симбиотического клубенька ранее также была продемонстрирована при анализе транскриптома клубеньков *M. truncatula* (Van de Velde *et al.*, 2006). Предполагается, что этилен совместно с АБК может участвовать в регуляции процесса старения, играя роль индуктора ремобилизации веществ, а АБК при этом способствует защите клубенька от патогенов на протяжении его старения, участвуя в индукции синтеза стрессовых белков и активации защитных реакций растения (Purro *et al.*, 2005). Высокое содержание АЦК в клетках меристемы также свидетельствует о важной роли

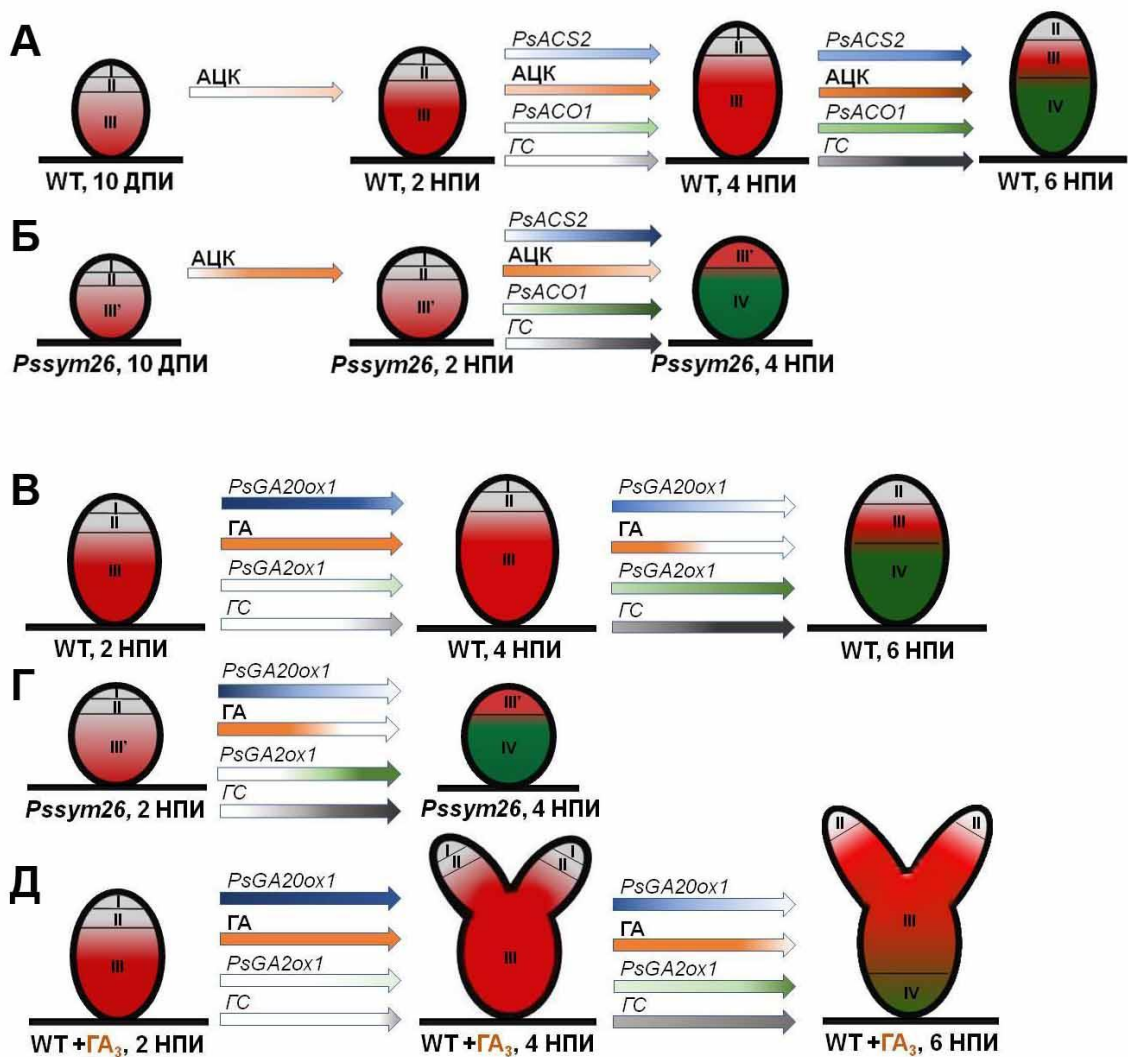


Рисунок 9. – Схема влияния этилена (А–Б) и эндогенных ГА на старение (В, Г) клубеньков дикого типа (А, В) и мутанта *SGEFix⁻³ (Pssym26)* (Б, Г) и влияние экзогенного гиббереллина ГА₃ на старение и формирование нескольких меристем клубеньков дикого типа (Д)

I – меристема (серый цвет), II – зона инфекции (серый цвет), III – зона азотфиксации (красный цвет), III' – зона, соответствующая зоне азотфиксации в клубеньках дикого типа (красный цвет), IV – зона старения (зеленый цвет). Возрастающее интенсивности окрашивания стрелок обозначает повышение уровней экспрессии генов, снижение интенсивности окрашивания обозначает понижение уровня экспрессии генов. Увеличение интенсивности оранжевого окрашивания обозначает повышение содержания АЦК/ГА. Мутант *SGEFix⁻³ (Pssym26)* представлена в схеме в качестве примера рано стареющего мутанта. ГС, гены, ассоциированные со старением, WT – дикий тип.

этилена в развитии клубеньковой меристемы. Вероятно, этилен может способствовать переходу от митотического цикла к эндоредупликации и снижению пролиферации клеток, происходящем в зоне инфекции симбиотического клубенька (Mergaert *et al.*, 2006; Street *et al.*, 2015). При развитии клубеньков дикого типа и рано стареющих

мутантов было показано снижение экспрессии гена биосинтеза ГА, *PsGA20ox1*, и возрастание экспрессии гена деактивации ГА, *PsGA2ox1* (Рисунок 9В–Д). Повышение уровня транскриптов *MtGA2ox* ранее также наблюдалось при старении клубеньков *M. truncatula* (Van de Velde *et al.*, 2006). Результатам экспрессионного анализа соответствуют данные анализа иммунолокализации биоактивной формы ГА₃, согласно которым ее содержание снижалось при старении клубеньков *P. sativum* дикого типа и мутантов (Рисунок 9В, Г). Высокий уровень мечения ГА₃ был отмечен в клетках зоны азотфиксации у молодых клубеньков дикого типа, что может свидетельствовать об участии ГА в функционировании азотфиксирующего клубенька, что также было показано в недавнем исследовании (McAdam *et al.*, 2018). При развитии клубеньков мутанта SGEFix⁻² (*Pssym33*), характеризующегося отсутствием выхода бактерий, статистически значимых изменений в экспрессии генов метаболизма ГА детектировано не было, и также наблюдалось низкое содержание ГА₃. Полученные результаты могут подтверждать участие ГА в выходе бактерий, что было показано ранее (Tatsukami, Ueda, 2016), и свидетельствовать о необходимости ГА для развития инфицированных клеток клубенька. В работе также было продемонстрировано снижение экспрессии генов, ассоциированных со старением, замедление формирования зоны старения и развитие обширной зоны азотфиксации в клубеньках линии SGE, обработанных экзогенной ГА₃ (Рисунок 9Д). Таким образом, ГА могут принимать участие в задержке старения симбиотического клубенька *P. sativum*. Одним из механизмов, посредством которого ГА участвуют в задержке старения клубенька, может быть подавление экспрессии генов ответа на жасмонаты, активируемых в ходе защитных реакций, вследствие деградации белков DELLA (Hou *et al.*, 2010). В случае обработки экзогенной ГА₃ также было отмечено выраженное ветвление клубеньков вследствие формирования нескольких меристем, что, совместно с данными по иммунолокализации ГА₃, полученными в данной работе, а также результатами предыдущих исследований (Achard *et al.*, 2009; Ferguson *et al.*, 2005, 2011), позволяет предположить участие ГА в функционировании меристемы клубенька. Следует отметить, что закладка нескольких меристем также может способствовать замедлению формирования зоны старения клубенька.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов старения симбиотического азотфиксирующего клубенька является актуальной задачей при создании растительно-микробных систем с оптимальным периодом активной фиксации азота, что может способствовать повышению содержания азота в бобовых культурах, а также насыщению почвы симбиогенным азотом на фоне сниженных доз агрохимикатов. Результаты данного исследования вносят вклад в более глубокое понимание процесса старения симбиотического клубенька *P. sativum* и роли ряда фитогормонов в его регуляции. В результате данной работы были выявлены гены (*PsCyp15a*, *PsTPP*, *PsATB2*, *PsGA2ox1*, *PsACO1*, *PsNCED2* и *PsAO3*), снижение экспрессии которых может

способствовать продлению сроков азотфиксации клубеньков *P. sativum*. Активация процессов старения у мутантов, как с признаками раннего старения симбиотического клубенька, так и с отсутствием морфологических признаков деградации симбиотических структур, указывает на то, что старение является общей реакцией растения на неэффективность симбиоза, вызванную мутациями в генах макросимбионта. Было показано, что АБК, этилен и ГА участвуют в регуляции старения симбиотического клубенька *P. sativum*.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизирована методика лазерной микродиссекции фиксированных тканей симбиотического клубенька *P. sativum* и проведения экспрессионного анализа полученного материала.
2. Экспрессия генов, кодирующих цистеиновую протеазу 15а (*PsCyp15a*) и тиоловую протеазу (*PsTPP*), фактор транскрипции bZIP (*PsATB2*), ферменты биосинтеза этилена (*PsACO1*) и АБК (*PsNCED2*, *PsAO3*) и фермент деактивации активной формы ГА (*PsGA2ox1*), повышается с увеличением возраста и деградации клеток клубеньков родительских линий и рано стареющих мутантов *P. sativum*. Данные гены могут являться адекватными молекулярными маркерами старения симбиотического клубенька *P. sativum*.
3. С помощью иммулокализации предшественника этилена, АЦК, и экспрессионного анализа генов ферментов биосинтеза этилена, показано, что этилен способствует старению симбиотического клубенька *P. sativum* и участвует в функционировании меристемы клубенька.
4. С помощью иммулокализации биоактивной формы ГА₃, экспрессионного анализа генов ферментов метаболизма ГА и анализа влияния экзогенной обработки ГК₃ на развитие клубеньков, было показано, что ГА способствуют задержке старения симбиотического клубенька *P. sativum* и участвуют в функционировании меристемы клубенька.
5. Индукция старения симбиотического клубенька является универсальной реакцией растения на неэффективность симбиоза, вызванную мутациями в генах макросимбионта.
6. Старение симбиотического клубенька *P. sativum*, индуцированное мутациями в генах макросимбионта, активируется сильнее и развивается быстрее, чем естественное старение.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Serova T.A.**, Tsyganova A.V., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Gibberellins inhibit nodule senescence and stimulate nodule meristem bifurcation in pea (*Pisum sativum* L.) // *Frontiers in Plant Science*. 2019. V. 10: 285.
2. **Serova T.A.**, Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages // *Protoplasma*. 2018. P.1-17.
3. **Serova T.A.**, Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization // *Journal of Plant Physiology*. 2017. V. 212. P. 29–44.
4. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Старение симбиотического клубенька у бобовых растений: молекулярно-генетические и клеточные аспекты // *Сельскохозяйственная биология*. 2014. Т.5. С.3-15.

Научно-методические рекомендации:

1. Цыганов В.Е., **Серова Т.А.** Научно-методические рекомендации по лазерной микродиссекции отдельных клеток или их групп из симбиотических структур бобовых, а также выделение из них нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) для дальнейшего анализа // ГНУ ВНИИСХМ РАСХН. 2013. 24 с.

Тезисы конференций:

1. **Serova T.**, Tsyganova A., Tikhonovich I., Tsyganov V. Gibberellins inhibit nodule senescence and stimulate nodule meristem bifurcation in *Pisum sativum*. 13th European nitrogen fixation conference. 18-21 August, 2018, Stockholm, Sweden. P. 165.
2. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Анализ негативной регуляции старения симбиотических клубеньков гиббереллинами у гороха (*Pisum sativum* L.). IV(XII) Международная ботаническая конференция молодых ученых. 22-28 апреля 2018, Санкт-Петербург, Россия. С. 183-184.
3. **Serova T.**, Tsyganov V. Molecular-genetic and physiological analysis of senescence of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules. 12th European nitrogen fixation conference and the genomics of nitrogen-fixing organisms. 25-28 August, 2016, Budapest, Hungary. P. 285.
4. **Serova T.A.**, Tsyganov V.E. Analysis of expression of marker “senescence genes” and localization of gibberellins in pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules. 4th International Symposium on Plant Signaling and Behavior. 19-23 June, 2016, St.-Petersburg, Russia. P. 151.
5. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Анализ экспрессии маркерных «генов старения» и локализации гиббереллинов в симбиотических клубеньках гороха (*Pisum sativum* L.). Годичное собрание общества физиологов растений России и Научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма». 21-24 июня, 2016, Россия, Санкт-Петербург. С. 380-381.
6. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Молекулярные и клеточные аспекты старения симбиотических клубеньков у серии неэффективных мутантов гороха (*Pisum sativum* L.).

III(XI) Международная ботаническая конференция молодых ученых. 4-9 октября, 2015, Санкт-Петербург, Россия. С. 82.

7. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Молекулярно-генетический анализ старения симбиотических клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.). Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» и VIII Съезд Общества физиологов растений России. 21-26 сентября, 2015, Петрозаводск, Россия. С. 482.

8. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Молекулярно-генетический анализ старения симбиотических клубеньков у серии неэффективных мутантов гороха (*Pisum sativum* L.). Международная конференция «Генетическая интеграция про- и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии», 25-27 июня, 2015, Санкт-Петербург, Россия.

9. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Исследование характера экспрессии маркерных «генов старения» в эффективных и неэффективных клубеньках гороха (*Pisum sativum* L.). VI всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». 24-28 сентября, 2012, Саратов, Россия. С. 127.

10. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Анализ экспрессии маркерных «генов старения» в азотфиксирующих клубеньках у серии симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.). II (X) Международная ботаническая конференция молодых ученых. 11-16 ноября, 2012, Санкт-Петербург, Россия. С. 69-70.

11. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Молекулярно-генетические механизмы старения симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.). 18-ая международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». 21-25 апреля, 2014, Пущино, Россия. С. 277.

12. **Серова Т.А.**, Цыганов В.Е. Выявление молекулярно-генетических механизмов старения симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.). VI Съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы. 15-20 июня, 2014, Ростов-на-Дону, Россия. С. 203.