

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

*На правах рукописи*

**Цыганова Анна Викторовна**

**Симбиотический интерфейс в развитии клубеньков Бобовых**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант  
доктор биологических наук,  
Цыганов Виктор Евгеньевич

Санкт-Петербург

2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ. Симбиотический интерфейс в клубеньках Бобовых – модификации в процессе колонизации и дифференцировки .....	3
Научная новизна.....	9
Теоретическое и практическое значение.....	11
Степень достоверности и апробация результатов .....	12
Основные научные результаты.....	14
Положения, выносимые на защиту .....	16
ГЛАВА 1. Модификация клеточных стенок и стенок инфекционных нитей в клубеньках Бобовых разных типов .....	18
ГЛАВА 2. Развитие защитных реакций при восприятии ризобий в качестве патогенов.....	35
ГЛАВА 3. Матрикс инфекционной нити — основная внеклеточная среда обитания ризобий .....	42
ГЛАВА 4. Симбиосома — временная органелла с развитым симбиотическим интерфейсом .....	49
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	61
ВЫВОДЫ.....	72
ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	75
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	79
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	80
БЛАГОДАРНОСТИ .....	104
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	106

## **ВВЕДЕНИЕ. Симбиотический интерфейс в клубеньках Бобовых – модификации в процессе колонизации и дифференцировки**

В ходе эволюции растения использовали определенные функциональные возможности микроорганизмов для расширения своего адаптивного потенциала. Так бобовые и актиноризные растения, принадлежащие к азотфиксирующей кладе FaFaCuRo и включающей четыре порядка — *Fabales*, *Fagales*, *Curcubitales* и *Rosales* [Forest, Chase, 2009], приобрели способность к развитию эндосимбиотических отношений с протеобактериями, называемыми ризобиями, и актинобактериями из рода *Frankia*, восстанавливающими атмосферный азот до аммиака [van Rhijn, Vanderleyden, 1995; Pawlowski, Sirrenberg, 2003]. Порядок *Fabales* включает важнейшие бобовые культуры, такие как соя, арахис, горох, нут, люцерна и многие другие. Бобовые культуры считаются ключевыми для развития экологически ориентированного сельского хозяйства из-за высокого содержания в них белка и низкой зависимости от минеральных азотных удобрений, из-за их способности фиксировать атмосферный азот [Considine *et al.*, 2017; Adams *et al.*, 2018]. Симбиотические бактерии фиксируют азот в реакции, катализируемой ферментом нитрогеназы, и предоставляют его растениям в обмен на источники углерода. Одной из особенностей, связанных с симбиотическим взаимодействием, является образование специализированных органов, называемых клубеньками, в которых создается благоприятная микросреда для активности бактериальной нитрогеназы [Oldroyd *et al.*, 2011]. При этом размещение бактерий внутри растительных клеток — ключ к успеху симбиоза и одна из самых уникальных черт этой мутуалистической ассоциации.

Развитие клубенька обеспечивается двумя параллельными, но взаимосвязанными процессами: органогенезом клубенька и его инфекцией (колонизацией) ризобиями [Guinel, 2009]. Во всем многообразии

симбиотических клубеньков обычно выделяют два основных типа: детерминированные и недетерминированные [Guinel, 2009]. Первый тип клубеньков характерен для тропических бобовых, а второй для бобовых умеренных широт. В процессе органогенеза недетерминированных клубеньков Nod-факторы (сигнальные липохитоолигосахариды, выделяемые ризобиями) вызывают деление клеток в перицикле и внутренней коре корня [Timmers *et al.*, 1999], в то время как при формировании детерминированных клубеньков деление клеток возобновляется во внешней коре корня [van Spronsen *et al.*, 2001].

При развитии бобово-ризобияльного симбиоза бактерии, колонизируя корни растений, следуют разными маршрутами, используя разнообразные механизмы проникновения, которые определяет растение-хозяин [Pbáñez *et al.*, 2016]. Наиболее хорошо охарактеризован процесс заражения через корневые волоски, являющийся обычным механизмом для примерно 75% всех видов бобовых растений [Sprent *et al.*, 2017]. Ризобияльная инфекция проходит, по крайней мере, в три этапа: проникновение через эпидерму, распространение между клетками коры и внутриклеточное проникновение ризобий [Brewin, 1991]. При этом процессом инфекции управляет строго регулируемая генетическая программа, которая обеспечивает контролируемую колонизацию растительных клеток [Guinel, Geil, 2002; Tsyganov *et al.*, 2002; Madsen *et al.*, 2010] и последовательную модификацию взаимодействия между растениями и ризобиями. Так, для развития клубеньков требуется синтез и распознавание сигнальных и иных молекул, которые продуцируются как бактериальным, так и растительным партнерами [Zipfel, Oldroyd, 2017]. Симбиотические взаимодействия, при которых происходит обмен веществ между растением и микроорганизмами, достигают полной функциональности благодаря развитию обширной контактной поверхности между хозяином и микросимбионтом — симбиотического интерфейса [Rich *et al.*, 2014].

Распространение инфекции от эпидермиса к коре и далее к примордию развивающегося клубенька осуществляется с помощью трубчатых структур,

так называемых инфекционных нитей [Brewin, 2004; Gage, 2004]. Инфекционные нити представляют собой уникальные инвазивные структуры растительного происхождения, которые способны пересекать клеточные границы [Tsyganova et al., 2021]. Этот процесс продолжается во многих слоях клеток в виде древовидной сети [Monahan-Giovanelli et al., 2006]. Инфекционная нить состоит из различных компонентов, как растительного (полисахариды клеточной стенки, гликопротеины межклеточного матрикса, различные ферменты, рецепторы и структурные белки плазматической мембраны), так и бактериального происхождения (полисахариды бактериальной поверхности и секретируемые белки). При этом прямое взаимодействие между растительной и бактериальной клеточными поверхностями играет важнейшую роль в формировании инфекционной нити. На каждой стадии растительно-микробная поверхность взаимодействия (симбиотический интерфейс) должна адаптироваться, чтобы бактерии смогли существовать в новой среде, а также предотвратить развитие защитных реакций растения-хозяина [Tsyganova et al., 2021].

Молекулярные механизмы роста инфекционных нитей в коре корня и в инфицированной ткани клубенька практически не описаны, и наше понимание основано на визуализации. Распределение полисахаридов и белков клеточной стенки, а также гликопротеинов матрикса инфекционных нитей в основном исследовали с использованием антител, цитохимических реагентов и ферментов [Tsyganova et al., 2021]. Используя мутанты модельных Бобовых растений с дефектами роста и развития инфекционных нитей в сочетании с моноклональными антителами, которые реагируют с компонентами симбиотического интерфейса в инфекционных нитях, стало возможным анализировать поверхностные взаимодействия между симбиотическими партнерами [Tsyganova et al., 2021].

Для роста инфекционной нити необходимо построение новой клеточной стенки, а также перестройка с локальной деградацией и последующим новым ее синтезом при прохождении инфекционной нитью клеточных стенок клеток-

хозяина. В этом процессе участвуют многочисленные бактериальные [Robledo *et al.*, 2008; Lionetti *et al.*, 2012; Pogorelko *et al.*, 2013] и растительные ферменты, модифицирующие клеточную стенку, такие как пектинметилэстеразы [Lievens *et al.*, 2002; Rodríguez-Llorente *et al.*, 2004], пектатлиазы [Xie *et al.*, 2012], полигалактуроназы [Muñoz *et al.*, 1998; Rodríguez-Llorente *et al.*, 2003] и эндо- $\beta$ -1,4-глюканазы [Sujkowska *et al.*, 2011].

В росте и развитии инфекционной нити активное участие принимают и бактериальные компоненты растительно-микробной поверхности взаимодействия [Цыганова, Цыганов, 2012]. Существует большое количество экспериментальных данных, доказывающих, что продукция экзополисахаридов (ЭПС) ризобиями, формирующими клубеньки недетерминированного типа, необходима для скручивания корневых волосков, правильного формирования инфекционных нитей, выхода бактерий, дифференцировки бактериоидов и эффективного клубенькообразования [Frayse *et al.*, 2003; Skorupska *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2014; Zgadzaj *et al.*, 2015]. Капсулярные полисахариды (КПС) могут играть роль в случае недетерминированного [Kiss *et al.*, 2001; Le Quééré *et al.*, 2006] и детерминированного клубенькообразования [Parada *et al.*, 2006]. Дефицит липополисахаридов (ЛПС) у бактерий при формировании недетерминированных клубеньков может приводить как к отсутствию эффекта (Nod<sup>+</sup>Fix<sup>+</sup>), так и к неспособности бактерий выйти из инфекционных нитей (Nod<sup>+</sup>Fix<sup>-</sup>) [Campbell *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2002; Keating *et al.*, 2002].

Завершается инфекция размещением в клетках развивающегося клубенька ризобий в процессе, морфологически напоминающем эндоцитоз, но сходным по молекулярным компонентам с клеточным экзоцитозом [Ivanov *et al.*, 2012]. Точный механизм запуска перехода ризобий из внеклеточного пространства (апопласта) к внутриклеточному существованию еще не известен, но он связан с дальнейшим ремоделированием клеточной стенки. Для этого на кончике инфекционной нити, проникшей в клетку, образуются выросты, лишенные клеточной стенки, так называемые инфекционные капли,

из которых ризобии локально высвобождаются, образуя симбиосомы, окруженные мембраной, производной от плазматической мембраны хозяйской клетки [Coba de la Peña *et al.*, 2018]. Непосредственную роль в поверхностных взаимодействиях с ризобиями могут играть гликопротеины, связанные с симбиосомными и плазматическими мембранами, такие как лектиноподобный гликопротеин у *P. sativum* NLEC1 [Kardailsky *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1997; Bolaños *et al.*, 2001; Redondo-Nieto *et al.*, 2008], подобный арабиногалактановому белку гликолипид, распознаваемым антителом MAC206 [Bolaños *et al.*, 2001; Bolaños *et al.*, 2004; Redondo-Nieto *et al.*, 2008], синаптотагмины MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3 *M. truncatula* [Gavrin *et al.*, 2017] и гликозилированные формы инозитол-содержащего фосфолипида, распознаваемого антителом JIM18 [Perotto *et al.*, 1995]. Со стороны ризобий в процессе выхода бактерий из инфекционных капель участвует ген *VacA*, который контролирует модификацию клеточной стенки бактерии, включая развитие производных липида А с длинноцепочечными жирными кислотами [Ferguson *et al.*, 2002].

После выхода ризобий в растительную клетку бактерии дифференцируются в бактериоиды внутри цитоплазмы хозяина [Oldroyd *et al.*, 2011]. При этом бактериоиды окружены мембраной растительного происхождения, обогащенной бактериальными белками [Parniske, 2008]. Бактериоиды окружены перибактероидным пространством, которое заполнено белками как макро-, так и микросимбионтов, что позволяет предположить, что это пространство является основой для симбиотической фиксации азота [Emerich, Krishnan, 2014].

В отличие от клеточных стенок, для которых предполагается участие гликопротеинов в связывании их компонентов с лежащей ниже плазматической мембраной посредством нековалентного связывания [Seifert, Roberts, 2007; Su, Higashiyama, 2018], симбиосомная мембрана не связана с компонентами стенок растительных клеток, такими как пектины, ксилоглюкан и целлюлоза. Гликопротеины симбиосомной мембраны могут

взаимодействовать с поверхностными полисахаридами внешней мембраны бактерий, в частности с ЛПС, которые вносят основной вклад в развитие симбиотического интерфейса симбиозом со стороны ризобий [Haag *et al.*, 2013; Bourassa *et al.*, 2017].

Старение клубеньков — это заключительный этап функционирования клубеньков, во время которого симбиосомы и инфицированные клетки разрушаются, и растение повторно использует питательные вещества, накопленные в клубеньках. При старении клетки обоих симбиотических партнеров разрушаются [Brewin, 1991]: повышается электронная прозрачность цитоплазмы в результате плазмолиза, наблюдается увеличение количества клеточного детрита, последними разрушаются симбиосомы [Timmers *et al.*, 2000; Van de Velde *et al.*, 2006]. Запрограммированное старение азотфиксирующих бактериоидов является неотъемлемой частью последовательности развития недетерминированных клубеньков [Vasse *et al.*, 1990], но свободноживущие ризобии всегда присутствуют внутри клубенька, и они могут сапрофитно расти в стареющих тканях [Brewin, 1991].

Несмотря на идентификацию компонентов сигнального каскада, который инициирует инфекцию, и транскрипционной сети, ответственной за репрограммирование клеток-хозяев [Mbengue *et al.*, 2020], анализ сложных компонентов клеточных стенок, таких как полисахариды и структурные белки, затруднен из-за структурной сложности этих макромолекул. Поэтому наряду с молекулярно-биологическими методами исследований, использование моноклональных антител, которые реагируют с компонентами симбиотического интерфейса, включая полисахариды клеточной стенки растений и бактерий, гликопротеины и гликолипиды, является адекватным методом его изучения [Perotto *et al.*, 1991; Brewin, 2004; Verhertbruggen *et al.*, 2017; Rydahl *et al.*, 2018].

В случае бобово-ризобияльного симбиоза взаимодействия молекул в симбиотическом интерфейсе сложны, многогранны и в большинстве своем малоизучены. Некоторые данные свидетельствуют о том, что инфицирование



тканей и клеток ризобиями активирует гены бобовых растений, которые также экспрессируются в реакциях растений на другие формы биотического и абиотического стресса. В результате, процесс колонизации, по-видимому, зависит от подавления защитных реакций хозяина, которые в противном случае остановили бы развитие инфекции, вызывая прерывание роста инфекционных нитей, отсутствие выхода ризобий в цитоплазму растительной клетки или раннее старение симбиосом.

Таким образом, **целью** данной работы являлось изучение компонентного состава симбиотического интерфейса и его изменения при развитии азотфиксирующих клубеньков Бобовых.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Проанализировать состав и распределение отдельных компонентов растительной клеточной стенки и стенки инфекционной нити в клубеньках Бобовых.
2. Выявить изменения в компонентном составе межклеточного матрикса и матрикса инфекционной нити в клубеньках Бобовых.
3. Определить маркеры развития симбиотического интерфейса симбиосом в азотфиксирующих клубеньках Бобовых.
4. Изучить модификацию компонентного состава симбиотического интерфейса у симбиотически неэффективных мутантов *Pisum sativum* и *Medicago truncatula*.
5. Выявить характерные признаки защитного ответа растения при неэффективном симбиотическом взаимодействии в клубеньках *P. sativum*.
6. Выявить роль активных форм кислорода, антиоксидантной системы, фитогормонов и везикулярного транспорта в развитии азотфиксирующего клубенька *P. sativum* на поздних стадиях.

### **Научная новизна**

Впервые с использованием иммуноцитохимического анализа проведено всестороннее изучение компонентов симбиотического интерфейса в

азотфиксирующих клубеньках нескольких видов Бобовых, формирующих клубеньки разных типов. Было показано наличие как общих, так и видоспецифических особенностей формирования и модификации растительного апопласта в клубеньках Бобовых. Так, было показано наличие высокометилэтерифицированного гомогалактуронана и рамногалактуронана I (его полисахаридного остова и арабинановой боковой цепи) во всех клеточных стенках и стенках инфекционных нитей у всех изученных видов Бобовых. К наиболее ярким особенностям симбиотического интерфейса в клубеньках недетерминированного типа можно отнести наличие линейной галактановой боковой цепи рамногалактуронана I в стенках инфекционных нитей у *P. sativum*, *Galega orientalis* и *Vavilovia formosa*. К видоспецифическим особенностям можно отнести отсутствие фукозилированного ксилоглюкана в клеточных стенках в клубеньках *P. sativum*, его наличие в клеточных стенках неинфицированных клеток в клубеньках *M. truncatula* и во всех клеточных стенках в клубеньках *V. formosa*. Наблюдались вариации локализации низкометилэтерифицированного гомогалактуронана в стенках инфекционных нитей в клубеньках *Vicia villosa*, в клеточных стенках неинфицированных клеток в клубеньках *G. orientalis* (также, как и  $\text{Ca}^{2+}$ -связанного гомогалактуронана) и во всех клеточных стенках и стенках инфекционных нитей у *V. formosa*. Неразветвленная основа рамногалактуронана I преимущественно выявлялась в меристематических клетках в клубеньках *P. sativum* и в клеточных стенках неинфицированных клеток в клубеньках *G. orientalis*. К ярким видовым особенностям симбиотического интерфейса детерминированных клубеньков (на примере *Glycine max*) следует отнести присутствие галактановой боковой цепи рамногалактуронана I в клеточных стенках неинфицированных клеток и преимущественное накопление фукозилированного ксилоглюкана в стенках инфекционных нитей.

При иммуноцитохимическом анализе симбиосомных мембран выявлена зависимость наличия и локализации арабинановых эпитопов от степени зрелости симбиосомной мембраны. Впервые выявлены видоспецифичные

маркеры созревания симбиосомных мембран в клубеньках *P. sativum* – арабиноагалактановые белки с гликозилфосфатидилинозитоловым якорем.

Выявлены новые проявления защитных реакций на поздних стадиях формирования неэффективных клубеньков. Показано усиление жесткости стенки инфекционной нити с повышенным накоплением низкометилэтерифицированного гомогалактуронана у мутантов *P. sativum* (SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*)) и *M. truncatula* (TR3 (*Mtipd3*)) по ортологичным генам ключевого транскрипционного фактора клубенькообразования CYCLOPS/IPD3, характеризующихся «запертыми» инфекционными нитями и отсутствием выхода бактерий в цитоплазму растительных клеток. Продемонстрирован патогеноподобный защитный ответ у мутанта *P. sativum* RisFixV (*Pssym42*), выражающийся в накоплении каллозы в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей и инкапсуляции дегенерирующих бактериоидов при помощи деэтерифицированного гомогалактуронана. Показано накопление материала клеточной стенки, а именно рамногалактуронана I (особенно галактановой боковой цепи), высокометилэтерифицированного гомогалактуронана и суберина вокруг вакуоли у мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), характеризующегося спорадическим выходом бактерий из инфекционных капель.

Впервые показано участие активных форм кислорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), антиоксидантной системы (глутатиона), фитогормонов (транс-зеатина рибозида и гибберелловой кислоты ГА<sub>3</sub>) и везикулярного транспорта в развитии и модификации симбиотического интерфейса в клубеньках *P. sativum* при эффективном и неэффективном взаимодействии.

### **Теоретическое и практическое значение**

Показано значение модификации симбиотического интерфейса при развитии азотфиксирующего клубенька, который играет роль, как в естественном онтогенезе инфицированных клеток, так и при активации защитных реакций при неэффективном симбиотическом взаимодействии. Разработана методология использования иммуноцитохимического анализа

для идентификации и локализации компонентов симбиотического интерфейса и позиционной информации во время инфекционного процесса. С помощью подходов сравнительной клеточной биологии бобовых растений выявлены общие и видоспецифичные признаки модификации симбиотического интерфейса, как при росте инфекционной нити, так и при формировании временных клеточных органелл микробного происхождения — симбиосом.

Изучены механизмы развития защитного ответа при неэффективном симбиотическом взаимодействии, которые могут стать теоретическими основами для создания высокоэффективных растительно-микробных взаимодействий. Предложена модель функционирования инфекционной нити в зрелом клубеньке, которая может быть использована для дальнейшего изучения бобово-ризобияльного симбиоза и создания симбиотических ассоциаций у небобовых растений. Полученные в ходе выполнения диссертации результаты могут быть использованы в курсах лекций, читаемых на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Высокая достоверность полученных результатов обеспечена использованием адекватных генетических моделей, неоднократными повторностями экспериментов, использованием современного высокоточного прецизионного оборудования, проведением статистической обработки полученных результатов. Материалы диссертации были представлены на отечественных и международных конференциях, в том числе: VI съезде ОФР (2007 г. Сыктывкар), 8-й Европейской конференции по азотфиксации (2008 г., Гент, Бельгия), 11-й Европейской конференции по азотфиксации (2014 г. Тенерифе, Испания), 3-м Международном симпозиуме по сигналингу и поведению растений (2015 г. Париж, Франция), VIII съезде ОФР (2015 г. Петрозаводск), 4-м Международном симпозиуме по сигналингу и поведению растений (2016 г. Санкт-Петербург), 20-м Международном конгрессе по азотфиксации (2017 г. Гранада, Испания), I международной конференции

«Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (PLAMIC2018) (2018 г. Уфа), 13-й Европейской конференции по азотфиксации (2018 г. Стокгольм, Швеция), Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (2019 г. Санкт-Петербург), IX съезде ОФР (2019 г. Казань), II международной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (PLAMIC2020) (2020 г. Саратов), III Международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (2022 г. Минск, Республика Беларусь), III международной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (PLAMIC2022) (2022 г. Санкт-Петербург), X съезде ОФР (2023 г. Уфа).

Личный вклад автора состоит в планировании исследований, в постановке цели и задач, анализе и обобщении имеющихся литературных данных, определении методов исследования, непосредственном участии в сборе и обработке данных в ходе экспериментов, в статистической обработке, анализе, обобщении и интерпретации полученных данных, формулировке и интерпретации выводов, а также в написании статей, опубликованных по теме диссертационной работы, и представлении результатов на научных конференциях. Помимо этого, автором осуществлялось руководство экспериментальными работами по изучению морфологии и компонентного состава симбиотического интерфейса, использованными в диссертационном исследовании, проведенными в лаборатории молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ. Руководство заключалось в дизайне исследования, участии в проведении большинства экспериментов, обработкой и интерпретацией данных, редактировании текстов рукописей и подготовке ответов в переписке с рецензентами. Эксперименты по экспрессии генов пектинметилэстераз выполнены совместно с К. А. Ивановой и П. Г. Кусакиным, иммуноэлектронные исследования – совместно с Е. В. Селиверстовой. Детальное описание использованных методов и подходов

приведено в статьях, опубликованных по результатам работы. Исследования выполнены в центре Джона Иннеса (Норвич, Великобритания), в центре коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ и в центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

Результаты, представленные в диссертации, получены при поддержке грантов РФ (16-16-10035, 14-24-00135, 17-76-30016, 23-16-00090); РФФИ (14-04-00383-а, 13-04-40344-Н, 11-04-01675-а, 08-04-01656-а, 08-04-90051-Бел\_а, 05-04-49105-а); Совета по грантам Президента РФ (НШ-6759.2016.4, НШ-4603.2014.4, НШ-337.2012.4, НШ-3440.2010.04, НШ-5399.2008.04, НШ-9744.2006.04); ИНТАС (YSF 04-83-3196); Министерства образования и науки (02.442.11.7130, 16.552.11.7085, 16.551.11.7047, 02.740.11.0276, П290, П1301, № 8056, № 8109).

### **Основные научные результаты**

1. С помощью иммуоцитохимического метода изучен компонентный состав и модификация симбиотического интерфейса (клеточных стенок) в клубеньках *P. sativum* [Ivanova et al., 2015 (раздел «Immunocytological localisation of unesterified pectin in IT wall in the symbiotic nodules of ineffective pea mutants», рисунок 1, таблица 3); Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023b; Tsyganov, Tsyganova, 2020], *M. truncatula* [Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023b], *G. orientalis* [Tsyganova et al., 2023a], *G. max* [Tsyganova et al., 2023a]. Личный вклад составляет не менее 75%. Выявлены общие и видоспецифические изменения клеточных стенок и стенок инфекционных нитей в клубеньках изученных видов Бобовых при эффективном и неэффективном взаимодействии.

2. Изучен состав матрикса инфекционных нитей и его модификации в процессе развития и неэффективных взаимодействий у *P. sativum* [Brewin et al., 2008; Tsyganova et al., 2009; Tsyganova et al., 2019a; Tsyganova et al., 2019c; Tsyganov, Tsyganova, 2020; Tsyganova et al., 2023b], *M. truncatula* [Tsyganova et

*al.*, 2023b], *G. orientalis* [Tsyganova et al., 2023a] и *G. max* [Tsyganova et al., 2023a]. Личный вклад составляет не менее 90%.

3. Выявлены маркеры дифференцировки симбиосом [Tsyganova et al., 2018 (раздел «Differentiation of symbiosomes»)] — арабинаны в ювенильных и малодифференцированных симбиосомах в клубеньках *P. sativum* [Tsyganova et al., 2023b], *M. truncatula* [Tsyganova et al., 2023b], *G. orientalis* [Tsyganova et al., 2023a] и *G. max* [Tsyganova et al., 2023a], а арабиногалактановые белки с гликозилфосфатидилинозитоловым якорем в зрелых симбиосомах в клубеньках *P. sativum* [Tsyganova et al., 2019c]. Личный вклад составляет не менее 80%.

4. С помощью собственных исследований и литературных данных создана модель функционирования инфекционной нити в недетерминированных клубеньках Бобовых [Цыганова et al., 2011; Цыганова, Цыганов, 2012; Tsyganova, Tsyganov, 2019; Цыганова, Цыганов, 2019b; Tsyganova et al., 2021]. Личный вклад составляет не менее 80%.

5. Показаны разнообразные растительные защитные реакции в клубеньках симбиотически неэффективных мутантов *P. sativum*: усиление жесткости стенки инфекционной нити [Ivanova et al., 2015 (раздел «Immunocytological localisation of unesterified pectin in IT wall in the symbiotic nodules of ineffective pea mutants», рисунок 1, таблица 3)], отложения каллозы и суберина в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей [Ivanova et al., 2015 (раздел «Histochemical localisation of suberin and callose depositions in the symbiotic nodules of ineffective pea mutants», рисунки 2,3,4); Цыганов et al., 2012], отложение материала клеточной стенки вокруг вакуоли [Tsyganova et al., 2019b], инкапсуляция дегенерирующих бактериоидов пектинами [Ivanova et al., 2015 (раздел «Immunocytological localisation of unesterified pectin in IT wall in the symbiotic nodules of ineffective pea mutants», рисунок 1i)], дегенерация бактерий внутри «запертых» инфекционных нитей [Цыганов et al., 2010; Цыганов et al., 2012; Цыганова et al., 2019], развитие окислительного стресса [Цыганова et al., 2009; Provorov et al., 2012] и преждевременное старение

симбиотических структур [Serova et al., 2018 (раздел «Nodule histological and ultrastructural organization in mutants SGEFix<sup>-3</sup> (*sym26*) and SGEFix<sup>-7</sup> (*sym27*)»), рисунки 1,2]. Личный вклад составляет не менее 80%.

6. Изучено участие в развитии и модификации симбиотического интерфейса (стенок инфекционных нитей и симбиосом) в клубеньках *P. sativum* при эффективном и неэффективном взаимодействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Brewin et al., 2008; Цыганова et al., 2009; Provorov et al., 2012 (раздел «Host control over the population dynamics of endosymbiotic bacteria», второй абзац, рисунок 2)], глутатиона [Ivanova et al., 2022 (раздел «Immunogold localization of the reduced form of glutathione in the infection structures of wild-type and mutant nodules», рисунок 4, таблица 2)], цитокининов (транс-зеатин рибозида) [Dolgikh et al., 2020 (раздел «Immunolocalization of trans-zeatin riboside and N<sub>6</sub>-isopentenyladenosine in the wild type and mutants blocked at different stages of nodule development», рисунок 6)], гиббереллинов (GA<sub>3</sub>) [Serova et al., 2019 (раздел «Immunogold localization of GA<sub>3</sub> in nodules of wild-type SGE and mutant SGEFix<sup>-3</sup> (*sym26*)»), рисунок 5, таблица 2)] и эндоплазматического ретикулума [Цыганова, Цыганов, 2019a]. Личный вклад составляет не менее 75%.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Симбиотический интерфейс (апопласт и мембраны) является сложным и подвижным образованием в азотфиксирующих клубеньках Бобовых, которое обладает как общими, так и видоспецифичными признаками.

2. Развитие симбиотического клубенька бобовых растений сопровождается онтогенетическими модификациями симбиотического интерфейса: в клеточных стенках изменяется степень метилирования молекул гомогалактуронанов, модифицируются боковые цепи и блочный характер остова рамногалактуронана I, изменяется состав гемицеллюлоз.

3. Арабинаны и арабиногалактановые белки могут служить маркерами дифференцировки симбиосом в недетерминированных клубеньках.



4. Неэффективный характер симбиоза, обусловленный мутациями в генах *PsSym33*, кодирующем ключевой транскрипционный фактор CYCLOPS/IPD3, и *Pssym42* активируют широкий спектр защитных реакций, направленных на изоляцию микросимбионта в инфекционных нитях и инфицированных клетках с развитием преждевременного старения симбиотического клубенька *P. sativum*.

5. Пероксид водорода вовлечен в повышение жесткости стенки инфекционной нити в ходе ее роста в клубеньках *P. sativum* и развитии окислительного стресса при неэффективном взаимодействии.

Диссертация изложена на 135 стр. текста, содержит Введение, 4 главы, Заключение и Приложение, 4 рисунка в тексте и 29 рисунков в Приложении А, 10 таблиц, 198 ссылок на литературные источники.

Для лучшей ориентации в системе литературных ссылок, ссылки на использованные литературные данные даны обычным шрифтом, а ссылки на работы с участием автора, в которых опубликованы данные, являющиеся предметом диссертационного исследования, даны курсивом.

## ГЛАВА 1. Модификация клеточных стенок и стенок инфекционных нитей в клубеньках Бобовых разных типов

Клеточные стенки растений представляют собой специализированный внеклеточный матрикс, состоящий в основном из углеводных полимеров и служащий динамической опорной структурой растений [Cosgrove, 2005]. Первичная клеточная стенка, окружающая активно растущие клетки растений, состоит из целлюлозы, гемицеллюлоз, пектинов и структурных гликопротеинов, а также содержит широкий спектр ферментов и других белков, которые могут изменять структуру клеточной стенки или реагировать на внутренние и внешние стимулы [Keegstra, 2010; Anderson, 2015]. Целлюлозно-гемицеллюлозные сети действуют как основные несущие компоненты стенок растительных клеток [Wang *et al.*, 2013], пектины выполняют важные функции в архитектуре стенок, клеточном росте и морфогенезе тканей [Palin, Geitmann, 2012; Wolf, Greiner, 2012; Anderson, 2015].

Накопленные в последние годы данные свидетельствуют об изменчивости состава клеточной стенки в симбиотических клубеньках Бобовых и тонкой регуляции ее структуры [Цыганова *et al.*, 2011; Tsyganova *et al.*, 2019c; Tsyganova *et al.*, 2021; Tsyganova *et al.*, 2023a; Tsyganova *et al.*, 2023b]. Изучение клеточных стенок с использованием молекулярно-генетических подходов, в том числе иммунохимических методов, сформировало представление о динамичности структуры клеточной стенки в симбиотических клубеньках, позволило охарактеризовать ее компоненты и их модификацию в зависимости от стадии развития и пространственного расположения клеток и инфекционных структур [Цыганова *et al.*, 2011; Tsyganova *et al.*, 2021; Tsyganova *et al.*, 2023a; Tsyganova *et al.*, 2023b].

В формировании и функционировании симбиотического интерфейса в клубеньках бобовых растений наиболее изучен гомогалактуронан (ГГ)

[Цыганова, Цыганов, 2019b], что объясняется наличием высокоспецифичных моноклональных антител к этому полисахариду. Функции ГГ в клубеньках, как и в других органах растений, определяются степенью его метилирования [Wolf *et al.*, 2009; Su, 2023; Su *et al.*, 2023]. Распределение ГГ было детально изучено у различных Бобовых, инокулированных ризобияльными симбионтами. Так, в симбиотических клубеньках *P. sativum* [VandenBosch *et al.*, 1989; Rae *et al.*, 1992; Ivanova *et al.*, 2015; Tsyganova *et al.*, 2019c; Tsyganova *et al.*, 2023b], *M. truncatula* [Tsyganova *et al.*, 2019c; Tsyganova *et al.*, 2023b], *V. hirsuta* [Rae *et al.*, 1992] и *V. villosa*, *G. orientalis* [Tsyganova *et al.*, 2023a], *G. max* [Gavrin *et al.*, 2016; Tsyganova *et al.*, 2023a], *Phaseolus vulgaris* [Rae *et al.*, 1992], *Lupinus luteus* [Wilmowicz *et al.*, 2022], *Chidlowia sanguinea*, *Entada polystachya*, *Erythrophleum* spp, *Moldenhawera* spp. и *Pentaclethra macroloba* [de Faria *et al.*, 2022] и *V. formosa* наличие ГГ с различной степенью метилэтерификации было показано как в клеточных стенках, так и в стенках инфекционных и фиксирующих нитей.

Степень метилирования ГГ регулируется растением, существует тканеспецифичный и пространственно-временной паттерн их локализации [Vincken *et al.*, 2003; Anderson, 2015; Levesque-Tremblay *et al.*, 2015]. Исследования с использованием антител против высокометилэтерифицированного (JIM7 и LM20) или низкометилэтерифицированного ГГ (JIM5 и LM19) показали, что распределение ГГ с различным уровнем метилирования может сильно варьировать между соседними участками в тканях симбиотических клубеньков, что указывает на его важную роль в развитии клеток [Gavrin *et al.*, 2016; Tsyganova *et al.*, 2019c; Su *et al.*, 2023; Tsyganova *et al.*, 2023a; Tsyganova *et al.*, 2023b].

Во время клеточной дифференцировки ГГ синтезируется растительной клеткой в аппарате Гольджи, откуда транспортируется к клеточной стенке через секреторные везикулы. В процессе синтеза карбоксильные группы галактуроновой кислоты метилэтерифицируются, и именно в такой форме

(высокометилэтерифицированный ГГ) пектины интегрируются в клеточную стенку, что обеспечивает рост растительных клеток [Mohnen, 2008; Anderson, 2015]. В клубеньках Бобовых, формирующих различные типы клубеньков, высокометилэтерифицированный ГГ является преобладающим пектином во всех клеточных стенках и стенках инфекционных нитей (Рисунок А.2) и присутствует на всех стадиях развития клубеньков (Рисунок А.3А-Г) [Tsyganova et al., 2019c; Цыганова, Цыганов, 2019b; Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b], что соответствует изодиаметрически растущим клеткам. В то же время у мутантов, блокированных на разных стадиях развития инфекционных структур, в частности инфекционных нитей, наблюдались некоторые отклонения в степени метилирования ГГ. Так, у мутантов по ортологичным генам *MtEfd* и *PsSym40* в меристеме высокометилированный ГГ либо полностью отсутствовал, либо определялся в местах соединения трех клеток (Рисунок А.3Ж,З), хотя в зоне инфекции он присутствовал (Рисунок А.3И,К). У мутантов по ортологичным генам *MtIpd3* и *PsSym33* высокометилэтерифицированный ГГ не был обнаружен в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей (Рисунок А.3Д,Е). Последнее наблюдение можно объяснить аномальным утолщением стенок инфекционных нитей и клеточных стенок, характерным для этих мутантов [Tsyganov et al., 1998; Ivanova et al., 2015; Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023b]. Кроме того, с помощью мутанта *SGEFix<sup>-3</sup>* (*Pssym26*), характеризующегося ранним старением, было показано, что в зоне старения высокометилэтерифицированный ГГ исчезает из клеточных стенок деградирующих инфицированных клеток, оставаясь в клеточных стенках неинфицированных клеток (Рисунок А.3Л,М).

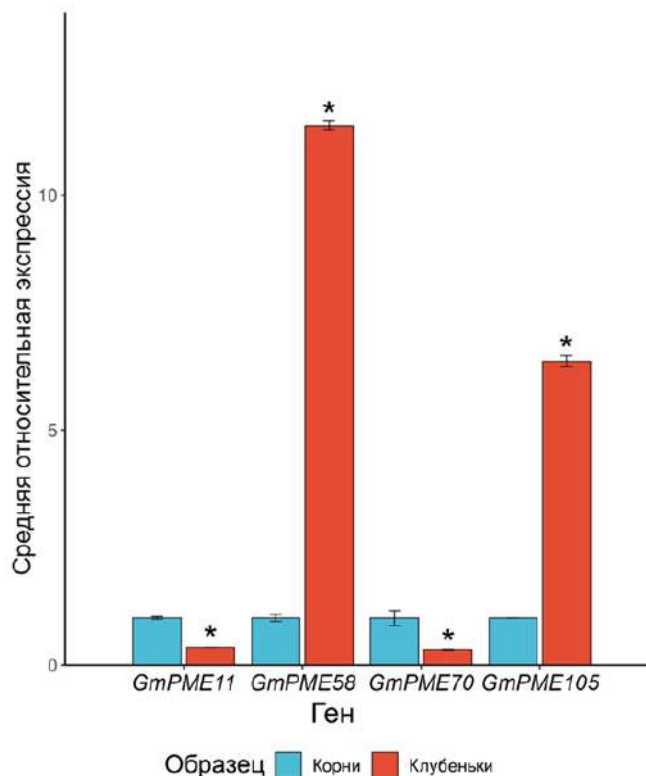
Попадая в клеточную стенку, метилированные ГГ могут подвергаться деметилэтерификации под действием пектинметилэстераз (ПМЭ) и превращаться в деэтерифицированные пектины [Palin, Geitmann, 2012; Levesque-Tremblay et al., 2015]. Активность ПМЭ может подавляться белками, называемыми ингибиторами ПМЭ [Giovane et al., 2004].

Дезтерифицированные ГГ могут либо связывать  $\text{Ca}^{2+}$  с образованием димерных структур в виде «коробки для яиц», которые способствуют жесткости клеточной стенки [Wormit, Usadel, 2018; Cao *et al.*, 2020], либо они могут расщепляться пектатлиазами и полигалактуроназами, вызывая разрыхление клеточной стенки [Wormit, Usadel, 2018].

При изучении низкометилэтерифицированного ГГ были выявлены различия в локализации и распределении данного пектина среди видов Бобовых (Рисунок А.4). Так низкометилэтерифицированный ГГ в клубеньках *V. formosa* и *G. max* локализовался повсеместно в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей (Рисунок А.4Г,Е), а в клубеньках *M. truncatula* и *V. villosa* наблюдался в основном в местах соединения трех клеток и в стенках инфекционных нитей (Рисунок А.4Б,Д) [Tsyganova *et al.*, 2019c]. В клубеньках *G. orientalis* количественный анализ выявил, что данный ГГ накапливался в большей степени в клеточных стенках неинфицированных клеток ( $82,08 \pm 7,97$  по сравнению с клеточными стенками инфицированных клеток,  $63,64 \pm 13,09$ ,  $p < 0.05$ ) (Рисунок А.4В) [Tsyganova *et al.*, 2023a]. При использовании другого антитела для выявления низкометилэтерифицированного ГГ в клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula* было показано, что полностью деметилированный ГГ в меристеме присутствовал в местах соединения трех клеток (Рисунок А.5А,Б), в зоне инфекции — в основном в стенках инфекционных нитей (Рисунок А.5А,Б), а в зоне азотфиксации — в клеточных стенках (Рисунок А.5В,Г) [Tsyganova *et al.*, 2023b].

Деметилирование ГГ осуществляется ферментами ПМЭ, широко представленными у растений [Levesque-Tremblay *et al.*, 2015]. Анализ паттернов экспрессии различных генов ПМЭ выявил несколько генов, демонстрирующих значимые уровни экспрессии в клубеньках *G. max* (*GmPME11*, *GmPME58*, *GmPME70*, *GmPME105*; Рисунок 1). При этом гены *GmPME58* и *GmPME105* показали повышение своей активности как в корнях, так и в клубеньках, однако в клубеньках их экспрессия многократно превышала таковую в образцах корней (Рисунок 1). Стоит отметить, что в

недавнем исследовании генов ПМЭ у сои сорта Williams 82 значения экспрессии некоторых генов в клубеньках и корнях отличались [Wang *et al.*, 2021]. Так, *GmPME11* был активирован преимущественно в клубеньках. Полученные различия, вероятно, связаны с использованием различных генотипов *G. max*.



Относительный уровень экспрессии генов пектинметилэстераз *GmPME11*, *GmPME58*, *GmPME70*, *GmPME105* в клубеньках и корнях *Glycine max* линии Merrill K-5892 Fiskeby V. \* – статистически значимые различия (t-тест с поправками на множественные сравнения,  $p < 0,05$ ).

**Рисунок 1 — Экспрессия генов пектинметилэстераз в корнях и клубеньках *Glycine max***

У мутантов, как *P. sativum*, так и *M. truncatula*, проявляющих нарушения в развитии инфекционных структур, в частности инфекционных нитей, наблюдались некоторые отклонения в локализации и распределении низкометилованного ГГ (Рисунок А.5Д-М). Например, у мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) (характеризующегося гипертрофией инфекционных капель) ГГ с низкой степенью метилирования был более обилен в клеточных стенках, чем у дикого типа (Рисунок А.5И), а у мутанта *M. truncatula* TR3 (*Mtipd3*) (с утолщенными стенками инфекционных нитей и отсутствием

выхода бактерий) данный ГГ был более представлен стенках инфекционных нитей, чем в клеточных стенках (Рисунок А.5Д),. У мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*), характеризующегося ранним старением, в стенках дегенерирующих клеток, ГГ с низкой степенью метилэтерификации был более обилен (Рисунок А.5К) [Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023b].

При электронно-микроскопическом анализе локализации ГГ с низкой степенью метилирования были показаны существенные различия в его распределении в стенках инфекционных нитей между различными генотипами *P. sativum* (Рисунок А.6) [Ivanova et al., 2015; Tsyganova et al., 2019c] и *M. truncatula* [Tsyganova et al., 2019c]. Так, в клубеньках *P. sativum* дикого типа SGE низкометилированный ГГ был равномерно распределен в стенке инфекционной нити (Рисунок А.6А,Б) [Ivanova et al., 2015]. Сходное распределение было характерно для клубеньков *P. sativum* дикого типа Finale, Sprint-2 и мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*), а его уровень у мутантов SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*) и Sprint-2Fix<sup>-</sup> (*Pssym31*) был немного снижен по сравнению с соответствующими дикими типами (Таблица 1) [Tsyganova et al., 2019c]. У одиночных и двойных мутантов *P. sativum* по гену *PsSym33* было продемонстрировано увеличение отложения низкометилированного ГГ в стенках инфекционных нитей (Рисунок А.6В-Е, Таблица 1) [Ivanova et al., 2015]. У мутанта RisFixV (*Pssym42*) метка JIM5 локализовалась в чрезмерно утолщенных стенках инфекционных нитей, но она формировала кластеры, которые располагались неравномерно (Рисунок А.6Ж,З) [Ivanova et al., 2015]. Возможно, такой характер распределения ГГ с низкой степенью метилэтерификации может быть обусловлен активацией клеточного защитного ответа у этих мутантов. Ранее сообщалось, что метилэтерификация пектина играет роль во взаимодействии растений с патогенами и влияет на устойчивость растений к болезням [Lionetti et al., 2012].

Для выяснения роли ПМЭ в регулировании метилирования ГГ у разных генотипов гороха был проведен анализ экспрессии участников мультигенного семейства ПМЭ, действующих на различных стадиях инфекционного

процесса, в симбиотических клубеньках гороха дикого типа и мутантов по генам *PsSym33* и *PsSym40* (Рисунок 2).

**Таблица 1 — Распределение низкометилэтерифицированного гомогалактуронана, меченного антителом JIM5, в стенках инфекционных нитей в 2-недельных клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum***

Генотип	Среднее значение	Стандартное отклонение
SGE (дикий тип)	139	20,6
SGEFix <sup>-</sup> -1 ( <i>Pssym40-1</i> )	112	18,8
SGEFix <sup>-</sup> -2 ( <i>Pssym33-3</i> )	506 <sup>a</sup>	25,0
RBT3 ( <i>Pssym33-3</i> , <i>Pssym40-1</i> )	569 <sup>a</sup>	39,4
RBT4 ( <i>Pssym33-3</i> , <i>Pssym42</i> )	575 <sup>a</sup>	35,7
Finale (дикий тип)	157	22,4
RisFixV ( <i>Pssym42</i> )	231 <sup>b</sup>	23,7
SGE (дикий тип)	123	6,5
SGEFix <sup>-</sup> -3 ( <i>Pssym26</i> )	93 <sup>b</sup>	8,1
Sprint-2 (дикий тип)	112	8,6
Sprint-2Fix <sup>-</sup> ( <i>Pssym31</i> )	103 <sup>г</sup>	8,3

Результаты представлены в виде количества частиц золота/мкм<sup>2</sup>. Представлены средние значения (n = 20–25). Буквы указывают на статистически значимые различия (t-критерий, значение p ≤ 0,001).

<sup>a</sup> Между диким типом SGE и соответствующим мутантом.

<sup>b</sup> Между диким типом Finale и соответствующим мутантом.

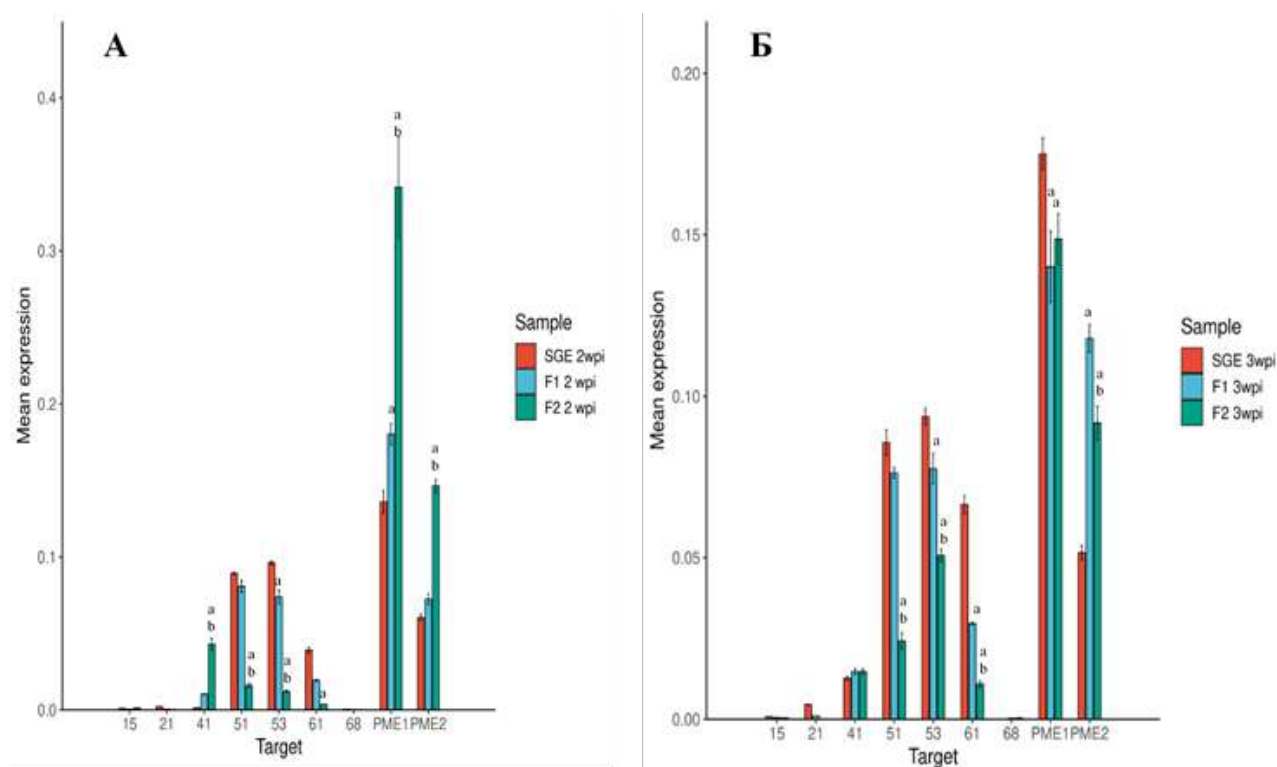
<sup>b</sup> Между диким типом SGE и соответствующим мутантом (второй эксперимент).

<sup>г</sup> Между диким типом Sprint-2 и соответствующим мутантом.

Так, в клубеньках мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-</sup>-1 (*Pssym40-1*) через две недели после инокуляции уровень экспрессии гена *PsPME53* был ниже, чем у дикого типа, а через три недели — генов *PsPME53*, *PsPME61* и *PsPME1* и, наоборот, уровни экспрессии гена *PsPME1* через две недели и *PsPME2* через



три были выше в мутантных клубеньках, по сравнению с диким типом. В клубеньках мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) через две недели после инокуляции уровень экспрессии генов *PsPME51*, *PsPME53*, *PsPME61*, через три недели — генов *PsPME51*, *PsPME53*, *PsPME61* и *PsPME1* был ниже, чем в клубеньках дикого типа и, наоборот, уровни экспрессии генов *PsPME41*, *PsPME1* и *PsPME2* через две недели и *PsPME2* — через три были выше в мутантных клубеньках.



А — двухнедельные клубеньки (2wpi). Б — трехнедельные клубеньки (3wpi). Графики демонстрируют результаты трех независимых экспериментов. Буквы указывают на достоверные различия ( $p \leq 0,05$ ): а, между клубеньками дикого типа (SGE) и мутантов; b, между клубеньками мутантов SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) (F1) и SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) (F2).

**Рисунок 2 — Относительный уровень экспрессии генов пектинметилэстераз в клубеньках *Pisum sativum* дикого типа (SGE) и мутантов SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) (F1) и SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) (F2)**

По данным транскриптомного анализа, совмещенного с методом лазерной микродиссекции, уровень экспрессии гена, кодирующего ПМЭ / ингибитор ПМЭ *PsPME41*, резко снижался, в то время как уровень экспрессии генов, кодирующих ПМЭ / ингибиторы ПМЭ *PsPME51* и

*PsPME61*, а также *PsPME53*, увеличивался в поздней зоне инфекции и в зоне азотфиксации, по сравнению с зоной ранней инфекции в клубеньках гороха дикого типа (SGE) [Kusakin *et al.*, 2021]. При изучении ранних ответов на Nod-факторы штамма *Mesorhizobium loti* R7A в корневых волосках и корнях *Lotus japonicus* среди наиболее сильно специфически индуцируемых 93 генов на сроках 1 и 3 дня после инокуляции, были идентифицированы гены ПМЭ, в том числе ген, аннотированный как ПМЭ / ингибитор ПМЭ *LjPME41* [Kelly *et al.*, 2018]. Таким образом, этот ген, вероятно, вовлечен в формирование и развитие инфекционных нитей с самых ранних этапов инфекции — в корневых волосках, и вплоть до формирования зрелого азотфиксирующего клубенька — в зоне ранней инфекции. Это коррелирует с полученными данными о том, что максимальный уровень экспрессии гена *PsPME 41* наблюдался на сроке 2 недели после инокуляции в клубеньках мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), характеризующегося развитием многочисленных разветвленных инфекционных нитей, по сравнению с клубеньками дикого типа и клубеньками мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) (Рисунок 2А). Кроме того, экспрессия генов *PsPME51*, *PsPME53*, *PsPME61* также резко снижалась в мутантных клубеньках по сравнению с клубеньками дикого типа, особенно в клубеньках мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), у которого отсутствуют поздняя зона инфекции и зона азотфиксации.

В корнях *G. max*, выращенной в условиях дефицита азота и фосфора, было показано снижение уровня экспрессии нескольких генов семейства ПМЭ [Wang *et al.*, 2020], аннотированных как ПМЭ / ингибитор ПМЭ *GmPME41*, *GmPME51* и *GmPME53* [Nezamivand-Chegini *et al.*, 2022]. Вероятно, снижение экспрессии данных генов в мутантных клубеньках *P. sativum* хотя бы частично может быть объяснено развитием неэффективного симбиоза и дефицитом такого макроэлемента, как азот. Кроме того, возможно, снижение уровня экспрессии гена *PsPME61* в клубеньках мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) связано с активацией в них защитных реакций, ассоциированных с неэффективным симбиозом [Ivanova *et al.*, 2015; Tsyganova *et al.*, 2019b].

Создаваемый ПМЭ РМЕ1 градиент рН, влияет на заряд клеточной поверхности, и, тем самым, на изменения морфологии и функции клеток, что может играть немаловажную роль в процессе развития симбиотического клубенька и дифференцировки его клеток [Collmer, Keen, 1986; Gorshkova *et al.*, 1997]. Так как клубеньки *P. sativum* дикого типа и мутантов отличаются своей морфологией, это может объяснять разницу в уровне экспрессии гена *PsPME1*. Была выявлена роль РМЕ1 в формировании клубеньков *Sesbania rostrata* при взаимодействии с ее микросимбионтом *Azorhizobium caulinodans* ORS571 [Lievens *et al.*, 2002]. Локализация транскриптов *SrPME1 in situ* в симбиотических клубеньках выявила несколько паттернов экспрессии, указывающих на роль *SrPME1* в развитии проводящих пучков, делении и росте клеток, а также в дифференцировке неинфицированных клеток клубенька [Lievens *et al.*, 2002]. Таким образом, роль ПМЭ в функционировании симбиотических клубеньков сложна, вероятно, из-за функциональной избыточности в рамках большого семейства ПМЭ.

В клубеньках мутантов *M. truncatula* наблюдалась несколько отличная картина распределения ГГ с низкой степенью метилэтерификации в стенках инфекционных нитей (Таблица 2) [Tsyganova *et al.*, 2019c]. В 2-недельных клубеньках всех проанализированных мутантных генотипов количество ГГ было снижено по сравнению с диким типом. Однако в 4-недельных клубеньках мутанта по гену *Mtlpd3*, ортологичному *PsSym33* [Ovchinnikova *et al.*, 2011], количество низкометилэтерифицированного ГГ было выше, чем у дикого типа (Таблица 2). Однако, в клубеньках *SGEfix<sup>-</sup>2 (Pssym33-3)* увеличение количества ГГ с низким уровнем метилирования было более выражено и заметно повышалось в стенках инфекционных нитей в 2-недельных клубеньках [Ivanova *et al.*, 2015]. Необходимо отметить, что удвоение количества дезэтерифицированного ГГ наблюдалось и у мутанта *M. truncatula* по гену *Mtdnf1-1* (Таблица 2), который характеризуется недифференцированными бактериоидами [Van de Velde *et al.*, 2010].

**Таблица 2 — Распределение дезтерифицированного гомогалактуронана, меченного антителом JIM5, в стенках инфекционных нитей у дикого типа и мутантов *Medicago truncatula***

Генотип	Дни после инокуляции (дпи)	Среднее значение	Стандартная ошибка
сорт Jemalong A17 (дикий тип)	13	68,4 <sup>В</sup>	4,3
	28	84,4	2,7
<i>Mtefd-1</i>	11	57,1 <sup>а</sup>	3,1
	28	59,3 <sup>б</sup>	2,3
TR3 ( <i>Mtipd3</i> )	16	47,2 <sup>ав</sup>	3,5
	28	94,8 <sup>б</sup>	4,0
<i>Mtdnf1-1</i>	13	34,5 <sup>ав</sup>	2,7
	28	64,6 <sup>б</sup>	4,2

Результаты представлены в виде количества частиц золота/мкм<sup>2</sup>. Представлены средние значения (n = 20–25). Буквы указывают на статистически значимые различия (t-критерий, значение p ≤ 0,001).

<sup>а</sup> Между диким типом A17 и соответствующими мутантными линиями на первом сроке анализа (11-16 дпи).

<sup>б</sup> Между диким типом A17 и соответствующими мутантными линиями через на втором сроке анализа (28 дпи).

<sup>В</sup> В пределах генотипа по сравнению со значением через 28 дпи.

В клубеньках всех проанализированных генотипов *P. sativum* и *M. truncatula* во всех гистологических зонах ГГ, связанный Ca<sup>2+</sup>, был обнаружен в стенках инфекционных нитей, особенно в местах их пересечения с клеточными стенками (Рисунок А.7) [Tsyganova et al., 2023b]. Однако у мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), в отличие от мутанта *M. truncatula* TR3 (*Mtipd3*), в стенках некоторых инфекционных нитей не было обнаружено Ca<sup>2+</sup>-связанного ГГ (Рисунок А.73).

Анализ локализация Ca<sup>2+</sup>-связанного ГГ в клубеньках других видов Бобовых, формирующих клубеньки разных типов, выявил некоторую видовую специфичность (Рисунок А.8). Так, в детерминированных клубеньках *G. max* этот полимер был обнаружен в клеточных стенках эндодермы (Рисунок А.8Е), а в недетерминированных клубеньках *G. orientalis* он накапливался в соединениях трех клеток в паренхиме клубеньков и отсутствовал в клеточных стенках меристематических и колонизированных клеток (Рисунок А.8Д).

Важно отметить, что все три типа ГГ были обнаружены в стенках инфекционных нитей в обоих типах клубеньков, что неудивительно, поскольку деметилированный и  $\text{Ca}^{2+}$ -связанный ГГ определяют жесткость клеточной стенки [Ivanova et al., 2015; Tsyganova et al., 2019c; de Faria et al., 2022; Wilmowicz et al., 2022].

Недавно было описано координированное действие одной из специфических для симбиоза ПМЭ (SyPME1) и пектатлиазы клубеньков (NPL) в местах проникновения инфекционных нитей и их трансклеточных ходов. Их согласованная работа способствует ограниченным в пространстве изменениям ГГ в межклеточном интерфейсе, что приводит к созданию специфического апопластического компартмента, из которого бактерии проникают в клетки хозяина. Этот процесс обеспечивает успешное внутриклеточное продвижение инфекционных нитей в клубеньках [Su et al., 2023].

Другим распространенным пектином клеточной стенки является рамногалактуронан I (РГ-I) [Цыганова, Цыганов, 2019b]. Остов РГ-I играет важную роль в целостности и функционировании клеточной стенки, поскольку деградация РГ-I под действием гидролаз приводит к ее морфологическим изменениям [Pogorelko et al., 2013]. Среди других пектинов в клубеньках *P. sativum*, *M. truncatula*, *G. orientalis*, *G. max*, *L. luteus*, *Erythrophleum* spp. и *P. macroloba* также было показано присутствие РГ-I [Tsyganova et al., 2019c; de Faria et al., 2022; Wilmowicz et al., 2022; Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b]. В клубеньках была показана локализация остова РГ-I (с помощью антитела CCRC-M36) (Рисунок А.9) [Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b], линейной галактановой боковой цепи (с помощью антитела LM5) (Рисунок А.10) [Tsyganova et al., 2019c; de Faria et al., 2022; Wilmowicz et al., 2022; Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b] и линейной арабиановой боковой цепи (с помощью антитела LM6-M) [Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b].

Локализация РГ-I с помощью антитела CCRC-M36, которое связывается, по крайней мере, с тремя неразветвленными дисахаридными повторами в

клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula*, ясно показывает, что длинноцепочечные повторы неразветвленной основы РГ-I широко распространены в клубеньках (Рисунок А.9) [Tsyganova et al., 2023b]. Этот полимер локализуется в клеточных стенках колонизированных и недавно инфицированных клеток в зоне инфекции в клубеньках *M. truncatula* и *P. sativum* (Рисунок А.9Б,Д). В клубеньках *P. sativum*, кроме того, РГ-I был также обнаружен в клеточных стенках меристематических клеток (Рисунок А.9Г), но в зоне азотфиксации метка РГ-I значительно уменьшилась, оставаясь в стенках инфекционных нитей (Рисунок А.9Е). В клубеньках *G. max* остов РГ-I локализовался в небольших количествах в клеточных стенках инфицированных клеток (Рисунок А.9З), а в недетерминированных клубеньках *G. orientalis* наблюдался в основном в клеточных стенках неинфицированных клеток (Рисунок А.9Ж) [Tsyganova et al., 2023a]. В клубеньках *V. formosa* и *V. villosa* остов РГ-I определялся в небольших количествах как в клеточных стенках, так и в стенках инфекционных нитей (Рисунок А.9И-М).

РГ-I — самый структурно неоднородный из пектинов, количество и состав боковых цепей РГ-I значительно варьируют между различными типами клеток, стадиями развития и видами [Komalavilas, Mort, 1989; Silva et al., 2016]. Арабинановые и галактановые боковые цепи РГ-I часто имеют различный характер локализации; в целом, арабинан преобладает в ювенильных клетках, в то время как растущие клетки содержат больше галактана [Willats et al., 1999; McCartney et al., 2000; McCartney et al., 2003].

Была показана видовая специфичность локализации и распределения линейной галактановой боковой цепи РГ-I в клубеньках *M. truncatula* и *P. sativum* [Tsyganova et al., 2019c]. Так, флуоресцентная микроскопия эпитопа линейной (1→4)-β-D-галактановой боковой цепи РГ-I показала, что этот полисахарид выявляется только в клеточных стенках меристемы (Рисунок А.10Ж), эндодермы (Рисунок А.10З) и флоэмы в симбиотических клубеньках *M. truncatula* и *P. sativum* дикого типа и мутантов. Однако в клубеньках всех генотипов *P. sativum* (Рисунок А.10А-Е), *G. orientalis* (Рисунок А.10К) и *V.*

*formosa* (Рисунок А.10И) метка галактановой боковой цепи РГ-I активно выявлялась в стенках инфекционных нитей [Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023a], а в клубеньках *G. max* (Рисунок А.10М) подобная метка была обнаружена в клеточных стенках неинфицированных клеток [Tsyganova et al., 2023a]. Напротив, боковая цепь арабинана РГ-I обнаруживалась в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей в клубеньках всех изученных видов [Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b].

Помимо пектинов в составе клеточных стенок широко распространены и играют большую роль ксиланоглюканы (КГ, гемицеллюлозы). Считается, что КГ сшивает микрофибриллы целлюлозы, а пектины, такие как ГГ и РГ-I, образуют структурно разнообразный клей, который обеспечивает гибкость или жесткость клеточных стенок в зависимости от химических модификаций [Keegstra, 2010]. Фукозилирование КГ имеет большое значение в морфогенезе растения. Так, у мутанта *Arabidopsis thaliana* с измененной клеточной стенкой *Atmur1*, который характеризуется карликовостью и сниженной прочностью стебля, было обнаружено снижение содержания фукозы в клеточных стенках до 98% [Reiter et al., 1993; Freshour et al., 2003].

В недетерминированных клубеньках *P. sativum* и *M. truncatula* была показана определенная видовая специфичность в локализации фукозилированного КГ (Рисунок А.11) [Tsyganova et al., 2023b]. Так, в клубеньках *M. truncatula* в зоне азотфиксации этот полимер был обнаружен в клеточной стенке неинфицированных клеток и в стенках колонизированных клеток и инфекционных нитей в зоне инфекции (Рисунок А.11Б), в то время как в клубеньках *P. sativum* в зоне азотфиксации метка фукозилированного КГ присутствовала только в стенках инфекционных нитей (Рисунок А.11Ж). В то же время у мутантов *M. truncatula*, заблокированных на ранних стадиях развития, повышалось содержание фукозилированного КГ в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей. А у мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), для которого характерна суберинизация клеточных стенок и стенок инфекционных нитей [Ivanova et al., 2015], фукозилированный КГ не

наблюдался в стенках некоторых инфекционных нитей [Tsyganova et al., 2023b].

В недетерминированных клубеньках *G. orientalis* локализация фукозилированного КГ была сходна с таковой в недетерминированных клубеньках *M. truncatula* (Рисунок А.11В,Г) [Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b]. В детерминированных клубеньках *G. max* фукозилированный КГ был преобладающим полисахаридом в стенках инфекционных нитей ( $154,26 \pm 38,10$  по сравнению с клеточными стенками инфицированных клеток  $73,49 \pm 12,92$ ,  $P < 0.05$ ) (Рисунок А.11З) [Tsyganova et al., 2023a]. Кроме того, у *G. max* было продемонстрировано отсутствие фукозилированного КГ в клеточных стенках неинфицированных клеток (Рисунок А.11И). В клубеньках *V. villosa* наблюдалась преимущественная локализация фукозилированного КГ в клеточных стенках инфицированных клеток (Рисунок А.11П), а в клубеньках *V. formosa*, кроме того, и в стенках инфекционных нитей (Рисунок А.11Л,М).

Помимо углеводных полимеров, клеточные стенки растений содержат структурные белки, такие как белки, богатые гидроксипролином, пролином и глицином, а также арабиногалактановые белки (АГБ), которые могут изменять свойства клеточной стенки [Showalter, Basu, 2016].

Ранее было показано, что один из АГБ клеточных стенок, распознаваемый антителом JM13, связан с организацией кортикальных микротрубочек [Nguema-Ona et al., 2007] и формированием клеточной стенки лабиринтных инвагинаций клеток-переносчиков в симбиотических клубеньках *P. sativum* [Dahiya, Brewin, 2000]. В клубеньках дикого типа и мутантов *P. sativum* и *M. truncatula* данный АГБ локализовался в эндодермальных клетках в виде двух дуг, не затрагивая меристему в верхней части клубенька (Рисунок А.12) [Tsyganova et al., 2023b]. В молодых эндодермальных клетках на границе с меристемой клубенька, в которых антиген JM13 еще не был обнаружен на уровне световой микроскопии, появление и накопление метки в везикулах вблизи плазматической мембраны было показано с помощью электронной микроскопии [Rae et al., 1991]. Наблюдаемый характер локализации эпитопа



ЛМ13 совпадает с локализацией суберина в клубеньках гороха дикого типа [Ivanova et al., 2015]. Как известно, стенки зрелых эндодермальных клеток в процессе развития суберинизируются, образуя физиологический барьер для проникновения воды и растворимых соединений. Кроме того, эндодерма служит защитой от проникновения патогенных микробов. Поэтому и суберинизация [Ivanova et al., 2015], и накопление антигена ЛМ13 в эндодермальных клетках, полностью окружающих клубеньки у мутантов *M. truncatula Mtefd-1* (Рисунок А.12З) и TR3 (*Mtipd3*) (Рисунок А.12И) и мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) (Рисунок А.12Г), а также формирование «запирающего» слоя у этого мутанта, отделяющего клетки с разросшимися и извитыми инфекционными нитями от остальной паренхимы клубенька (Рисунок А.12Д), можно отнести к защитным реакциям.

Ранее было показано участие активных форм кислорода (АФК) в модификации симбиотического интерфейса [Tsyganova et al., 2021]. Пероксидазы III класса (P<sub>rx</sub>-III), а также ризобияльные каталазы [Jamet et al., 2007] способствуют усилению жесткости стенки и матрикса инфекционной нити [Wisniewski et al., 2000]. В процессе инфицирования продукция супероксид-аниона (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> наблюдалась в инфекционных нитях и инфицированных клетках [Santos et al., 2001; Ramu et al., 2002; Rubio et al., 2004]. При этом можно проследить накопление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сначала на внутренней поверхности стенки инфекционной нити (Рисунок А.13А,Б), затем по всей ее толщине (Рисунок А.13В,Г) и далее внутри матрикса инфекционной нити и инфекционной капли (Рисунок А.13Д,Е) [Цыганова et al., 2009; Provorov et al., 2012], что, возможно, способствует его затвердеванию в результате сшивания тирозиновых остатков молекул арабиногалактанпротеин-экстенсинов (АГБ-Э) [Brewin, 2004; Brewin et al., 2008]. Таким образом, прослеженная динамика накопления пероксида водорода в растущих инфекционных нитях дала основание для высказывания предположения, что роль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при удлинении инфекционной нити связана с модификацией структуры клеточной стенки и гликопротеинов матрикса, а именно с жесткостью инфекционной нити

[Rathbun *et al.*, 2002; Rathbun, Brewin, 2009; Цыганова *et al.*, 2009; Puppo *et al.*, 2013].

## ГЛАВА 2. Развитие защитных реакций при восприятии ризобий в качестве патогенов

Клеточная стенка растения является не только системой молекулярного мониторинга [Engelsdorf, Hamann, 2014], реагирующей на многочисленные биотические и абиотические стрессы, но и интерфейсом для некоторых из самых ранних взаимодействий между растениями и широким кругом других организмов, включая насекомых, патогенов и симбионтов [Brewin, 2004; Cantu *et al.*, 2008].

Изменения клеточной стенки растений за счет нарушения или сверхэкспрессии генов, связанных с клеточной стенкой, оказывают значительное влияние на устойчивость к болезням и/или на абиотические стрессы [Bellincampi *et al.*, 2014; Miedes *et al.*, 2014]. Первоначально считалось, что фенотипы устойчивости к болезням, связанные с изменениями целостности клеточной стенки [Fagard *et al.*, 2000], проявлялись из-за неспособности некомпетентных патогенов преодолевать модифицированный состав или структуру клеточных стенок у мутантов растений. Однако было обнаружено, что у мутантов растений с изменениями клеточных стенок активируются защитные сигнальные пути [Miedes *et al.*, 2014; Houston *et al.*, 2016].

Ризобиальная инфекция имеет много общего с патогенной инфекцией, и индукция защитных реакций сопровождает оба взаимодействия, но защитные реакции при взаимодействии бобового растения с микросимбионтом успешно подавляются. Для развития эффективного симбиотического клубенька необходимо, чтобы ризобии преодолевали широкий спектр защитных реакций растений [Цыганов *et al.*, 2010; Цыганова *et al.*, 2011; Цыганова, Цыганов, 2012; Serova *et al.*, 2018]. Во время развития азотфиксирующих клубеньков синтез защитных компонентов относительно низок по сравнению с патогенезом. В результате вторгшиеся микроорганизмы не полностью

инактивируются, а защитные реакции хозяина ограничивают их размножение и локализацию в определенных компартментах, предоставляемых растением-хозяином.

Типичная реакция атакованного патогеном растения — наращивание папилл, которые представляют собой куполообразные образования между клеточной стенкой эпидермы и плазматической мембраной, синтезируемые как укрепление стенки растительной клетки рядом с местом проникновения патогена [Hückelhoven, 2007]. Основным компонентом папилл является каллоза,  $\beta$ -1,3-глюкан, но были обнаружены и другие вещества, такие как полисахариды, фенольные соединения, АФК и белки [Bestwick *et al.*, 1997; Thordal-Christensen *et al.*, 1997].

Отложение каллозы наблюдалось в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей у мутанта RisFixV (*Pssym42*), инокулированного эффективным штаммом ризобий (Рисунок А.14) [Цыганов *et al.*, 2012; Ivanova *et al.*, 2015]. Ранее отложение каллозы было описано при формировании псевдо клубеньков у *M. truncatula* мутантами *Sinorhizobium meliloti* с нарушениями в синтезе экзополисахаридов [Niehaus *et al.*, 1993]. В таких псевдо клубеньках наблюдалось отложение каллозы в стенках кортикальных клеток. Отложение каллозы также наблюдалось в инфекционных нитях в клубеньках *P. sativum*, образованных мутантами *Rhizobium* по ЛПС [Perotto *et al.*, 1991]. Ранее симбиотически неэффективные мутанты Бобовых, демонстрирующие усиленное отложение каллозы, не были описаны. ЭПС и ЛПС участвуют в подавлении защитных реакций, запускаемых ризобиями [Frayse *et al.*, 2003]; в этом контексте отложение каллозы, наблюдаемое у мутанта RisFixV (*Pssym42*), может указывать на то, что ген *PsSym42* участвует в восприятии полисахаридов или сигнальном пути их восприятия растениями. В качестве альтернативы, ген *PsSym42* может быть вовлечен в созревание мембраны симбиосомы, которое обычно сопровождается изменением состава ее эпитопов [Brewin, 2004]; в клубеньках мутанта RisFixV (*Pssym42*), возможно, неправильный состав эпитопов может приводить к отложению

каллозы. Второе предположение выглядит более предпочтительным в связи с тем, что отложение каллозы в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей происходит во время их созревания, а вокруг бактериоидов в дегенерирующих инфицированных клетках был обнаружен деэтерифицированный пектин (Рисунок А.6И) [Ivanova et al., 2015]. Такой фенотип ранее не наблюдался ни в клубеньках *P. sativum* дикого типа [Rae et al., 1992], ни у мутантов; однако причина такой инкапсуляции деградирующих бактериоидов пока неизвестна [Цыганов et al., 2012].

В клубеньках *P. sativum* дикого типа отложения суберина в эндодерме клубеньков физиологически важны для защиты клубеньков от чрезмерного обезвоживания, солевого стресса и проникновения патогенов [Schreiber et al., 1999]. Интенсивный уровень суберинизации, наблюдаемый в клубеньках мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), является примером защитной реакции растений, которая предотвращает высвобождение бактерий в цитоплазму растения и их последующую дифференциацию в бактериоиды (Рисунок А.15) [Ivanova et al., 2015].

Ранее было показано, что накопление полифенольных веществ в стенках утолщенных инфекционных нитей характерно для мутанта *M. truncatula* TE7 в гене *MtSym1* [Benaben et al., 1995]. Ген *MtSym1* является ортологом гена *PsSym33* [Ovchinnikova et al., 2011], они кодируют ключевой транскрипционный фактор CYCLOPS/IPD3, который взаимодействует с кальций-зависимой и кальмодулин-зависимой киназой CCaMK, активируя дальнейший сигнальный каскад через другой транскрипционный фактор NIN, что приводит к индукции органогенеза клубеньков [Singh et al., 2014]. Таким образом, мутация в ключевом гене *PsSym33* приводит к восприятию ризобий как патогенов, вызывая сильные защитные реакции, проявляющиеся в суберинизации клеток неэффективного клубенька [Ivanova et al., 2015].

Кроме того, в белых клубеньках мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), в которых произошел выход бактерий в цитоплазму растительной клетки, материал клеточной стенки откладывался вокруг вакуоли в

неинфицированных, колонизированных и инфицированных клетках (Рисунок А.16, Таблица 3) [Tsyganova et al., 2019b]. Более того, этот материал клеточной стенки был связан с тонопластом (Рисунок А.16В-Ж), и дальнейшие скопления материала клеточной стенки наблюдались в просвете вакуоли (Рисунок А.16З-К). Анализ состава компонентов материала клеточной стенки вокруг вакуолей в клубеньках SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) показал отложение суберина и высокометилэтерифицированного ГГ, а также линейной (1→4)-β-D-галактановой боковой цепи РГ-I, но не низкометилэтерифицированного ГГ. Эти аномалии, характерные для мутанта никогда не наблюдались в клубеньках дикого типа.

**Таблица 3 — Количественная оценка различных типов клеток в белых клубеньках с выходом бактерий у мутанта *Pisum sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*)**

Тип клетки в клубеньке	Процент различных типов клеток в клубеньке	Процент отложений клеточной стенки в каждом типе клеток
Неинфицированные клетки	35	43
Колонизированные клетки (клетки, содержащие инфекционные нити или капли)	52	75
Инфицированные клетки	13	86

Результаты основаны на подсчете 2104 клеток на 67 оптических срезах, полученных из 13 клубеньков.

Насколько известно, это первый случай, когда отложение материала клеточной стенки вокруг вакуоли было описано в неэффективных клубеньках. Это явление наблюдалось только у мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), так как он несет слабую аллель гена *PsSym33*, формируя наряду с белыми розоватые клубеньки. При этом в некоторых белых клубеньках в отдельных клетках и в розоватых клубеньках происходит выход бактерий в цитоплазму растительных клеток [Tsyganov et al., 1998; Ovchinnikova et al., 2011]. Две другие аллели, *Pssym33-1* (у мутанта RisFixU) и *Pssym33-2* (у мутанта SGEFix<sup>-5</sup>), были описаны как сильные аллели, демонстрирующие только белые клубеньки с заблокированными инфекционными нитями и без выхода

бактерий [Voroshilova *et al.*, 2001; Ovchinnikova *et al.*, 2011; Цыганова *et al.*, 2019; Tsyganov, Tsyganova, 2020]. Таким образом, представляется маловероятным, что у этих мутантов будет наблюдаться эктопическое накопление материала клеточной стенки в связи с бактериальной инфекцией. В то же время для мутанта SGEFix<sup>-5</sup> (*Pssym33-2*) было характерно наличие некоторых инфекционных нитей, в которых бактерии не расходятся после деления, формируя кластеры и подвергаясь в дальнейшем полной деградации (Рисунок А.17). Данный фенотип можно объяснить активацией сильных защитных реакций со стороны растения, которые затрагивают бактерии внутри инфекционных нитей [Цыганова *et al.*, 2019].

Также у мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) яркой особенностью белых клубеньков с выходом бактерий является наличие гипертрофированных инфекционных капель, меченных антителом JIM7 (высокометилэтерифицированный ГГ) (Рисунок А.16Л,М) [Tsyganova *et al.*, 2019b]. Ранее образование инфекционных капель наблюдалось в розоватых клубеньках этого мутанта [Tsyganov *et al.*, 1998], а также в некоторых белых клубеньках [Цыганов *et al.*, 2010]. Однако гипертрофия инфекционных капель ранее была описана только для другого мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) [Tsyganov *et al.*, 1998].

Таким образом, отложение суберинизированного материала клеточной стенки вокруг вакуолей и формирование пектинового геля (идентифицированного антителом LM5 к линейной (1→4)-β-D-галактановой боковой цепи РГ-I) в матриксе инфекционных нитей (Рисунок А.16Н,О) являются признаками патогеноподобного защитного ответа у мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) [Tsyganova *et al.*, 2019b]. В целом, это позволяет предположить, что важной функцией транскрипционного фактора CYCLOPS/IPD3 является подавление защитной реакции при установлении бобово-ризобиального симбиоза.

Остановка развития симбиотического клубенька во время дифференциации бактериоидов в мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*)

также свидетельствует о неправильном восприятии микросимбионта как потенциального патогена растений. Весь клубенек становится топологически изолированным от остальной части растения посредством «круговой» зоны суберинизации эндодермы клубенька [Ivanova et al., 2015]. Ранее подобный фенотип наблюдался у двух мутантов *M. truncatula* — *Mtsymb* [Tirichine et al., 2000] и у РНКи-мутанта *MtHAP2-1* [Combier et al., 2006]. Для обоих мутантов также характерна ранняя остановка меристемы клубенька, что связано с круговым закрытием эндодермы клубенька, но причина такой корреляции пока неизвестна [Guinel, 2009]. Ген *PsSym40* является ортологом гена *MtEFD* *M. truncatula*, кодирующего транскрипционный фактор, который является негативным регулятором цитокининового сигнального каскада [Vernié et al., 2008; Tsyganov, Tsyganova, 2020]. Нарушение работы гена *PsSym40* приводит к многочисленным аномалиям в развитии клубеньков, включая ранний арест меристемы [Voroshilova et al., 2009], гипертрофированные инфекционные капли, массовый выход бактерий в цитоплазму клетки хозяина и преждевременную деградацию симбиотических структур [Tsyganov et al., 1998]. Широкий спектр отклонений в клубеньках, наблюдаемый у этого мутанта, позволяет предположить, что *PsSym40* имеет большое значение для клубенькообразования, поскольку нарушение работы гена, очевидно, вызывает сильный защитный ответ.

Также в клубеньках мутанта *P. sativum* *SGEFix<sup>-1</sup>* (*Pssym40-1*) наблюдается избыточное накопление перекиси водорода в инфекционных нитях (Рисунок А.18А), инфекционных каплях (Рисунок А.18Б) и ювенильных бактериоидах (Рисунок А.18В,Г) [Цыганова et al., 2009; Provorov et al., 2012]. В результате у мутанта *SGEFix<sup>-1</sup>* (*Pssym40-1*) происходит усиление окислительного стресса по сравнению с диким типом, что проявляется в чрезмерном накоплении  $H_2O_2$ . Сильное повышение уровня экспрессии гена *Ps7RA84*, кодирующего пероксидазу, в клубеньках мутанта *SGEFix<sup>-1</sup>* (*Pssym40-1*) [Ivanova et al., 2015], также можно объяснить развитием окислительного стресса, аналогичного тому, который возникает при



несовместимом патогенном взаимодействии [Hancock *et al.*, 2002]. Усиление окислительных процессов приводит к тому, что бактериоды *R. leguminosarum* bv. *viceae* становятся неспособны преодолеть этот стресс, и процесс дифференцировки идет неправильно, на что указывает наличие аномальных бактериодов (Рисунок А.18В,Г) в цитоплазме инфицированных клеток клубеньков и их раннее старение [Цыганова *et al.*, 2009; Provorov *et al.*, 2012].

### ГЛАВА 3. Матрикс инфекционной нити — основная внеклеточная среда обитания ризобий

Продукция и секреция различных соединений, входящих в состав межклеточного матрикса, стимулируются в ответ на ризобиальную инфекцию. Большая часть этих соединений накапливается в просвете инфекционной нити. По некоторым оценкам, для гороха и других бобовых растений, которые формируют недетерминированные клубеньки, объем материала матрикса в просвете инфекционной нити примерно в пять раз превышает объем ризобий, находящихся внутри [Brewin, 1991], в детерминированных клубеньках, напротив, стенка инфекционных нитей плотно прижата к заполняющим ее бактериям и материал матрикса редуцирован или почти полностью отсутствует [Rae *et al.*, 1992]. Основным компонентом межклеточного матрикса и матрикса внутри просвета инфекционной нити являются гликопротеины растений, которые являются чрезвычайно динамичными компонентами поверхности растений [Cassab, 1998; Brewin, 2004]. Причем в симбиотических клубеньках Бобовых синтезируется тканеспецифичный набор АГБ [Цыганова *et al.*, 2011; Tsyganova *et al.*, 2021], являющихся сложными кополимерами арабиногалактанпротеин-экстенсина (АГБ-Э), который содержит чередующиеся мотивы арабиногалактановых белков (АГБ) и экстенсина [Goodrum *et al.*, 2000; Rathbun *et al.*, 2002; Brewin, 2004; Nguema-Ona *et al.*, 2013; Showalter, Basu, 2016].

АГБ-Э в результате высокого содержания углеводов растворимы в большей степени, чем обычные экстенсины. Эти гликопротеины, или скорее протеогликаны, массой 95 кДа, распознаются моноклональными антителами MAC265, MAC204 и MAC236 [Bradley *et al.*, 1988; VandenBosch *et al.*, 1989]. Молекулы АГБ-Э сочетают биофизические свойства растворимых камедей (характерные для АГБ) со структурными и защитными свойствами экстенсины (которые обычно служат для упрочнения стенок растительных клеток в ответ

на атаку патогенов или механический стресс). Из-за очень высокого содержания остатков тирозина было высказано предположение, что макромолекулы АГБ-Э могут поперечно сшиваться и переводиться в нерастворимую форму в окислительных условиях и условиях с высоким содержанием пероксида водорода. Это перекрестное сшивание может играть роль в регулировании роста инфекционных нитей в результате постепенного перехода жидкого состояния АГБ-Э в твердое в матриксе инфекционной нити, тем самым контролируя инфекционный процесс [Wisniewski *et al.*, 2000; Rathbun *et al.*, 2002; Brewin, 2004; Gucciardo *et al.*, 2005; Rathbun, Brewin, 2009; Reguera *et al.*, 2010].

В клубеньках растений дикого типа и мутантов *P. sativum* антитела MAC265, MAC204 и MAC236 распознавали как инфекционные структуры в зоне инфекции, так и зрелые инфекционные нити в зоне азотфиксации (Рисунок А.19; Рисунок А.20; Рисунок А.21) [Brewin *et al.*, 2008; Tsyganova *et al.*, 2009; Tsyganova *et al.*, 2019a]. Морфометрический анализ локализации и распределения АГБ-Э, несущих метку MAC204 и MAC236, показал, что у мутанта *P. sativum* с гипертрофированными инфекционными каплями SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) наблюдалось увеличенное по сравнению с исходной линией количество метки обоих эпитопов в инфекционных каплях, а у мутанта с «запертыми» инфекционными нитями и отсутствием выхода ризобий в цитоплазму растительной клетки SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) наблюдалось максимальное увеличение количества метки обоих эпитопов в инфекционных нитях (Таблица 4) [Tsyganova *et al.*, 2019a]. При количественной оценке распределения различных эпитопов АГБ-Э в инфекционных нитях и инфекционных каплях у одиночных и двойного мутантов *P. sativum*, несущих аллели *Pssym33-3* и *Pssym40-1* было показано, что у двойного мутанта RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*) количество метки обоих эпитопов было промежуточным между родительскими мутантными генотипами SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) и SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*). Полученные результаты могут свидетельствовать о комплементации мутаций *Pssym33-3* и *Pssym40-1* в

отношении признака количество АГБ-Э, выявляемых антителами MAC204 и MAC236 в матриксе инфекционных нитей. Таким образом, хотя мутация *Pssym33-3* эпистатирует над мутацией *Pssym40-1* в отношении структурной организации клубеньков [Цыганов *et al.*, 2010], гены *PsSym33* и *PsSym40* могут участвовать в независимых путях, задействованных в формировании матрикса инфекционных нитей и инфекционных капель.

**Таблица 4 — Распределение эпитопов арабиногалактанпротеин-экстензинов, распознаваемых моноклональными антителами MAC204 и MAC236, в инфекционных структурах 2-недельных клубеньков *Pisum sativum* дикого типа и неэффективных мутантов**

Генотип	Инфекционные нити		Инфекционные капли	
	MAC204	MAC236	MAC204	MAC236
SGE (дикий тип)	5.10 ± 0.34 <sup>б</sup>	5.57 ± 0.25 <sup>аб</sup>	8.52 ± 1.16 <sup>в</sup>	7.20 ± 0.55 <sup>в</sup>
SGEFix <sup>-</sup> 1 ( <i>Pssym40-1</i> )	14.38 ± 0.45 <sup>г</sup>	4.78 ± 0.13 <sup>а</sup>	24.42 ± 1.08	13.03 ± 0.91 <sup>г</sup>
SGEFix <sup>-</sup> 2 ( <i>Pssym33-3</i> )	28.05 ± 0.92	22.09 ± 0.95	nd	nd
RBT3 ( <i>Pssym33-3</i> , <i>Pssym40-1</i> )	20.65 ± 0.73	9.18 ± 0.52	nd	nd

Результаты представлены как количество частиц золота в 1 мкм<sup>2</sup>. Приведено среднее значение ± стандартная ошибка (n = 20-25). Средние значения, обозначенные одинаковыми буквами в столбце (а) и в строчке (б-г) не имеют достоверных различий при P < 0,05 на основе теста Данна.

nd — не определялось

Кроме того, у одиночных и двойных мутантов *P. sativum* по гену *PsSym33* была выявлена неоднородность накопления АГБ-Э, несущего метку MAC265: в некоторых инфекционных нитях метка отсутствовала (Рисунок А.19Д,Е; Рисунок А.20В). В подобных инфекционных нитях наблюдались признаки деградации бактерий в просвете с лизисом бактериальных клеток. Отсутствие метки АГБ-Э может быть связано с перекисным сшиванием молекул АГБ-Э посредством пероксида водорода [Wisniewski *et al.*, 2000; Brewin, 2004]. Кроме того, у мутанта *P. sativum* RisFixV (*Pssym42*) наблюдалось отсутствие метки MAC265 в части матрикса некоторых инфекционных нитей (Рисунок А.20Е). Вероятно, это является следствием

прорастания новой инфекционной нити по руслу старой, что может свидетельствовать о том, что рост и развитие инфекционных структур у симбиотически неэффективных мутантов — сложный и неравномерный процесс [Tsyganova et al., 2009].

У мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) было обнаружено нарушение направленной секреции АГБ-Э, распознаваемых антителом MAC265, что приводило к накоплению в большом количестве метки в межклеточном пространстве (Рисунок А.19Г; Рисунок А.20Б) и сопровождалось изменением направления движения везикул, несущих метку, от стенки инфекционной нити к клеточной стенке в просвет инфекционной нити [Tsyganova et al., 2009]. У мутанта *P. sativum* по гену *Pssym40* аномальная секреция в межклеточное пространство была обнаружена в отношении эпитопа АГБ-Э, распознаваемого антителом MAC236, тогда как эпитоп АГБ-Э, распознаваемый MAC204 пропитывал как матрикс межклеточного пространства, так и клеточную стенку [Tsyganova et al., 2019a]. У мутанта по гену *Pssym33* эпитоп, распознаваемый антителом MAC204, был выявлен в стенках инфекционных нитей. У двойного мутанта RBT3 (*Pssym33-1*, *Pssym40-1*) небольшие транспортные везикулы, несущие метки MAC265 (Рисунок А.20Г), MAC204 (Рисунок А.22Б) и MAC236 (Рисунок А.22Д), были хорошо различимы вблизи плазматической мембраны и мембраны инфекционной нити [Tsyganova et al., 2009; Tsyganova et al., 2019a]. Кроме того, у двойного мутанта RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*) была обнаружена метка MAC204 в составе клеточных стенок и стенок инфекционных нитей (Рисунок А.22А,В), так же как в стенках инфекционных нитей у мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) и в клеточных стенках у мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) [Tsyganova et al., 2019a]. Полученные результаты указывают комплементацию мутаций *Pssym33-3* и *Pssym40-1* в отношении признака локализации АГБ-Э, выявляемых антителами MAC204 и MAC236. Появление избыточного количества АГБ-Э в межклеточном пространстве может быть связано с изменением направленной секреции АГБ-Э в результате нарушения нормального развития

инфекционных нитей [Brewin *et al.*, 2008; Tsyganova *et al.*, 2009; Tsyganova *et al.*, 2019a].

Выявленные нарушения направленной секреции АГБ-Э могут быть связаны с неправильной доставкой транспортных везикул, которая предположительно осуществляется белками семейства PUMILIO. Ранее было показано, что 3' нетранслируемый район (3' UTR) мРНК гена, кодирующего АГБ-Э, крайне консервативен у *P. sativum* по сравнению с таковым у ортологичного гена *M. truncatula MtN12* [Rathbun *et al.*, 2002]. При этом на 3' UTR мРНК *MtN12* находятся многочисленные UGUA сайты, которые являются канонической последовательностью, называемой PUMILIO response element (PRE) [Prasad *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2021]. Эти белки вовлечены в обеспечение полярности клеток, например, у почкующихся дрожжей [García-Rodríguez *et al.*, 2007]. Можно предположить, что белки PUMILIO участвуют в полярном апикальном росте инфекционных нитей. Таким образом, у мутантов с аномальным развитием инфекционных нитей может быть нарушен направленный везикулярный транспорт, осуществляемый этими белками.

Точный способ функционирования АГБ-Э в росте и развитии инфекционных структур, особенно инфекционных нитей, неизвестен, поскольку эти гликопротеины имеют сложную структуру. Также неизвестно, полностью вся молекула АГБ-Э или определенные последовательности в этой молекуле ответственны за ее биологическую активность [Brewin, 2004; Nguema-Ona *et al.*, 2013]. Моноклональные антитела MAC204, MAC236 и MAC265 распознают в инфекционных нитях разные эпитопы на макромолекулах АГБ-Э с молекулярной массой 95 кДа [VandenBosch *et al.*, 1989]. Эпитопы, распознаваемые MAC236 и MAC265, являются взаимоисключающими, а MAC204 распознает чувствительный к периодату эпитоп, общий как для кислой, так и для нейтральной формы макромолекулы 95кДа [VandenBosch *et al.*, 1989]. Оба эпитопа присутствовали в равных количествах в инфекционных нитях и инфекционных каплях в клубеньках *P. sativum* дикого типа SGE. В то же время у мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) и

двойного мутанта RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*) эпитоп, узнаваемый антителом MAC204, накапливался в большем количестве, чем эпитоп, узнаваемый антителом MAC236 (Таблица 4), что может указывать на то, что мутация в гене *Pssym40-1* может приводить к возникновению различий в накоплении эпитопов АГБ-Э [Tsyganova et al., 2019a]. Существующая вариация в количестве трех различных эпитопов, связанных с АГБ-Э, в матрице инфекционных нитей и инфекционных капель, предполагает, что специфические последовательности макромолекулы АГБ-Э могут играть различную роль в развитии симбиотических клубеньков.

Экстенсины представляют собой белки клеточной стенки, относящиеся к суперсемейству богатых гидроксипролином гликопротеинов, и они, как известно, участвуют во многих процессах во время роста и развития растений. Кроме того, эти белки вовлечены во взаимодействия растений как с патогенами [Bellincampi et al., 2014], так и с муталистическими микроорганизмами [Brewin, 2004; Rich et al., 2014]. Сообщалось, в том числе, о потенциальном участии экстенсинов бобово-ризобияльном симбиозе [Dahiya, Brewin, 2000; Sujkowska-Rybkowska, Borucki, 2014]. При изучении симбиотического взаимодействия *P. sativum* с *R. leguminosarum* было показано, что антитела LM1 и LM3 [Smallwood et al., 1995], которые распознают эпитопы экстенсинов, метят матрикс инфекционных нитей так же сильно, как MAC265 [Dahiya, Brewin, 2000; Sujkowska-Rybkowska, Borucki, 2014]. Участие эпитопа JIM11 было ранее выявлено в микоризном симбиозе орхидного растения *Dendrobium officinale* [Li et al., 2018].

Экстенсин, распознаваемый антителом JIM11, в клубеньках дикого типа *P. sativum* SGE и *M. truncatula* A17 откладывался в межклеточных пространствах паренхимы клубенька рядом с эндодермой (Рисунок А.23Б,З), в матрице инфекционных нитей и инфекционных капель (Рисунок А.23А,В-Д,Ж,И,К,М) [Tsyganova et al., 2023b], в отличие от экстенсина LM1, который также откладывался в клеточных стенках коры клубенька и в клеточных стенках паренхимы [Sujkowska-Rybkowska, Borucki, 2014]. Метка LM1 была

непрерывной во всем клубеньке, от зрелого основания до зоны инфекции, граничащей с меристемой. Однако, метка отсутствовала в меристематических и инфицированных клетках [Sujkowska-Rybkowska, Worucki, 2014]. При воздействии алюминия количество экстенсинов, распознаваемых антителом LM1, также резко возрастало, особенно в матриксе инфекционных нитей и в межклеточном пространстве [Sujkowska-Rybkowska, Worucki, 2014]. Однако, при развитии неэффективного симбиоза, экстенсины (метка LM11) появляются в клеточных стенках клеток коры клубеньков у мутантов *M. truncatula* с отсутствием выхода бактерий в растительные клетки TR3 (*Mtipd3*) (Рисунок А.23Л) и накапливаются в межклеточном пространстве у мутантов *P. sativum* и *M. truncatula* с малодифференцированными симбиосомами Sprint2Fix<sup>-</sup> (*Pssym31*) и *Mtdnf1-1* (Рисунок А.23Е,М соответственно) [Tsyganova *et al.*, 2023b]. В отношении других Бобовых было показано, что АГБ-Э (меченые антителом MAC265) и экстенсины (меченые антителом LM11) являются преобладающими гликопротеинами матрикса инфекционных нитей в недетерминированных клубеньках *G. orientalis* (Рисунок А.24А,Б), тогда как в детерминированных клубеньках *G. max* эти полимеры обнаруживаются в основном в межклеточном пространстве клубеньковой паренхимы (Рисунок А.24Г,Д) [Tsyganova *et al.*, 2023a]. Отсутствие АГБ-Э в детерминированных клубеньках было подтверждено иммунолокализацией с антителом MAC265 у *P. vulgaris*, которая показала полное отсутствие мечения, связанного с инфекционными нитями, хотя метка наблюдалась в некоторых межклеточных пространствах в центральной инфицированной области клубенька [Rae *et al.*, 1992]. У этих Бобовых также было показано наличие небольшого количества экстенсина, связывающихся с антителом LM19 (Рисунок А.24В,Е), что может свидетельствовать о разнообразии этих белков в составе симбиотического интерфейса [Tsyganova *et al.*, 2023a].



#### ГЛАВА 4. Симбиосома — временная органелла с развитым симбиотическим интерфейсом

Точный механизм, запускающий переход ризобий из внеклеточного пространства (апопласта) во внутриклеточное существование, пока не известен, но он связан с дальнейшим ремоделированием клеточной стенки [Tsyganova *et al.*, 2018]. Гликопротеины, связанные с симбиосомными и плазматическими мембранами, такие как лектиноподобный гликопротеин *P. sativum* PsNLEC1 [Kardailsky *et al.*, 1996; Redondo-Nieto *et al.*, 2008], арабиногалактаноподобный гликолипидный белок, распознаваемый антителом MAC206 [Bolaños *et al.*, 2001; Bolaños *et al.*, 2004; Redondo-Nieto *et al.*, 2008], синаптотагмины MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3 *M. truncatula* [Gavrin *et al.*, 2017] и гликозилированные формы инозитол-содержащего фосфолипида, распознаваемые антителом JIM18 [Perotto *et al.*, 1995], могут играть непосредственную роль в поверхностных взаимодействиях с ризобиями.

Ризобии, высвобождающиеся из бесстеночной инфекционной капли в цитоплазму клетки хозяина, окружены растительной мембраной, источником которой изначально является плазматическая мембрана клетки хозяина [Roth, Stacey, 1989; Coba de la Peña *et al.*, 2018; Fedorova, 2023]. В недетерминированных клубеньках дифференциация симбиосом — это постепенный процесс [Tsyganov *et al.*, 2003], который зависит как от дифференцировки бактерий в бактериоиды, так и от созревания мембраны симбиосом и ремоделирования симбиотического интерфейса.

Анализ мембранных маркеров выявил промежуточную идентичность мембран симбиосом [Варауме, Reinhardt, 2012]. Специфическая локализация синтаксина MtSYP132 на мембранах симбиосом *M. truncatula* идентична таковой на плазматической мембране, т.е. бактериоиды, по сути, находятся во «внутриклеточном домене апопласта» [Catalano *et al.*, 2004; Limpens *et al.*, 2009]. Недавно было показано, что арабинановые эпитопы со степенью

полимеризации 2-7, выявляемые с помощью антитела LM6-M [Pedersen *et al.*, 2012], маркируют не только клеточную стенку, но и симбиосомную мембрану ювенильных симбиосом в зоне инфекции недетерминированных клубеньков *P. sativum* (Рисунок А.25А; Рисунок А.26А), *M. truncatula* (Рисунок А.25В) [Tsyganova *et al.*, 2023b] и *G. orientalis* (Рисунок А.25Г) [Tsyganova *et al.*, 2023a], а также симбиосомную мембрану в детерминированных клубеньках *G. max* (Рисунок А.25Е) [Tsyganova *et al.*, 2023a].

С началом нитрогеназной активности в зрелых дифференцированных бактериоидах мембрана симбиосомы приобретает ГТФазу Rab7 [Clarke *et al.*, 2015], маркер поздних эндосомальных или ранних вакуолярных мембран. Следовательно, мембрана симбиосомы проходит фазу перехода между плазматической и вакуолярной мембранами [Limpens *et al.*, 2009]. Так, в зрелых симбиосомах в клетках зоны азотфиксации у всех изученных видов с недетерминированными клубеньками метка арабинана исчезает (Рисунок А.25Б,Д; Рисунок А.26В; Таблица 5) [Tsyganova *et al.*, 2023a; Tsyganova *et al.*, 2023b].

**Таблица 5 — Распределение арабинанов рамногалактуронана I и арабиногалактанового белка в симбиосомах инфицированных клеток в клубеньках *Galega orientalis* и *Glycine max***

Антитела	<i>Galega orientalis</i> , ювенильные симбиосомы	<i>Galega orientalis</i> , зрелые симбиосомы	<i>Glycine max</i> , симбиосомы
LM6-M	7.03±1.08	0.67±0.21 <sup>a</sup>	2.59±0.41 <sup>ab</sup>
LM2	9.87±0.95	1.01±0.11 <sup>a</sup>	2.42±0.25 <sup>ab</sup>

Результаты представлены в виде количества частиц золота в 1мкм<sup>2</sup>. Приведено среднее значение ± стандартная ошибка (n = 100–150). Буквы указывают на статистически значимые различия (t-критерий, p < 0.05):

<sup>a</sup> От ювенильных симбиосом *Galega orientalis*

<sup>b</sup> От зрелых симбиосом *Galega orientalis*

При изучении симбиотически неэффективных мутантов *P. sativum* и *M. truncatula* наблюдалась та же закономерность: метка арабинана была связана в основном с симбиосомами, содержащими ювенильные (Рисунок А.26Б) и малодифференцированные (Рисунок А.26Г) бактериоиды. В

мультибактероидных симбиосомах, которые формируются в инфицированных клетках в клубеньках некоторых мутантов количество метки зависело от степени дифференцировки бактериоидов (Рисунок А.26Д). На симбиосомах с аномальными или дегенерирующими бактериоидами количество метки арабинана резко снижалось (Рисунок А.26Е) [Tsyganova et al., 2023b].

В клубеньках обоих типов наблюдалась аналогичная картина распределения АГБ, идентифицированного с помощью антитела LM2 (Рисунок А.25Ж-И; Таблица 5). Недавно аналогичный АГБ (меченый антителом LM2) был обнаружен в фиксирующих нитях *Erythrophleum* sp. и на мембране симбиосом в клубеньках *P. macroloba* [de Faria et al., 2022]. Количество метки как арабианов РГ-1, так и АГБ в симбиосомах детерминированных клубеньков *G. max* было практически одинаковым, но выше, чем в зрелых симбиосомах *G. orientalis* (Таблица 5) [Tsyganova et al., 2023a].

Возможность закрепления АГБ на плазматической мембране через ГФИ-якорь указывает на их возможную роль в ремоделировании клеточной стенки во время развития и модификации симбиотического интерфейса [Sherrier et al., 1999]. Ранее было показано наличие АГБ с ГФИ-якорем, узнаваемого антителом JIM1, на симбиосомной мембране в клубеньках *P. sativum* (Рисунок А.27Б) в отличие от *M. truncatula* (Рисунок А.27А) [Tsyganova et al., 2019c]. Увеличение количества метки JIM1 в симбиосомах 4-недельных клубеньков по сравнению с 2-недельными позволяет предположить, что данный АГБ участвует в созревании симбиосом в клубеньках *P. sativum* дикого типа (Рисунок А.27В; Таблица 6) [Tsyganova et al., 2019c].

Мутант *P. sativum* Sprint-2Fix<sup>-</sup> (*Pssym31*), характеризующийся недифференцированными бактериоидами [Borisov et al., 1997], демонстрировал преимущественную локализацию заякоренного АГБ на плазматической мембране (Рисунок А.27Г) и постоянный низкий уровень в симбиосомах, что подтверждает сниженный уровень дифференцировки симбиосомной

мембраны у этого мутанта (Таблица 6) [Tsyganova et al., 2019c]. Развитие симбиосом мутанта Sprint-2Fix<sup>-</sup> (*Pssym31*) было ранее изучено с помощью антитела JIM18, которое распознавало гликолипидный компонент плазматической мембраны у ювенильных симбиосом [Perotto et al., 1995]. У этого мутанта метка JIM18 была равномерно распределена по всем инфицированным клеткам клубенька, что подтверждает наличие только ювенильной формы симбиосомной мембраны в клубеньках данного мутанта [Sherrier et al., 1997; Dahiya et al., 1998].

**Таблица 6 — Распределение арабиногалактонового белка с гликозилфосфатидилинозитоловым якорем в симбиосомах инфицированных клеток в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum***

Генотип	Недели после инокуляции (нпи)	Среднее значение	Стандартная ошибка
SGE (дикий тип)	2	4,10 <sup>e</sup>	0,40
	4	6,13	0,71
SGEFix <sup>-</sup> -1 ( <i>Pssym40-1</i> )	2	3,28 <sup>ae</sup>	0,35
	4	1,09 <sup>b</sup>	0,25
SGEFix <sup>-</sup> -2 ( <i>Pssym33-3</i> )	2	7,38 <sup>ae</sup>	0,79
	4	4,65 <sup>b</sup>	0,49
SGEFix <sup>-</sup> -3 ( <i>Pssym26</i> )	2	11,46 <sup>ae</sup>	0,66
	4	2,04 <sup>b</sup>	0,33
Sprint-2 (дикий тип)	2	4,50 <sup>e</sup>	0,46
	4	6,54	0,52
Sprint-2Fix <sup>-</sup> ( <i>Pssym31</i> )	2	1,07 <sup>c</sup>	0,35
	4	1,11 <sup>d</sup>	0,26

Результаты представлены в виде количества частиц золота в 1 мкм<sup>2</sup>. Представлены средние значения (n = 100–150). Буквы указывают на статистически значимые различия (t-критерий, значение P ≤ 0,001).

<sup>a</sup> Соответствующие мутанты от дикого типа SGE на 2 нпи.

<sup>b</sup> Соответствующие мутанты от дикого типа SGE на 4 нпи.

<sup>c</sup> Соответствующий мутант от дикого типа Sprint-2 на 2 нпи.

<sup>d</sup> Соответствующий мутант от дикого типа Sprint-2 на 4 нпи.

<sup>e</sup> В пределах генотипа по сравнению с 4 нпи.

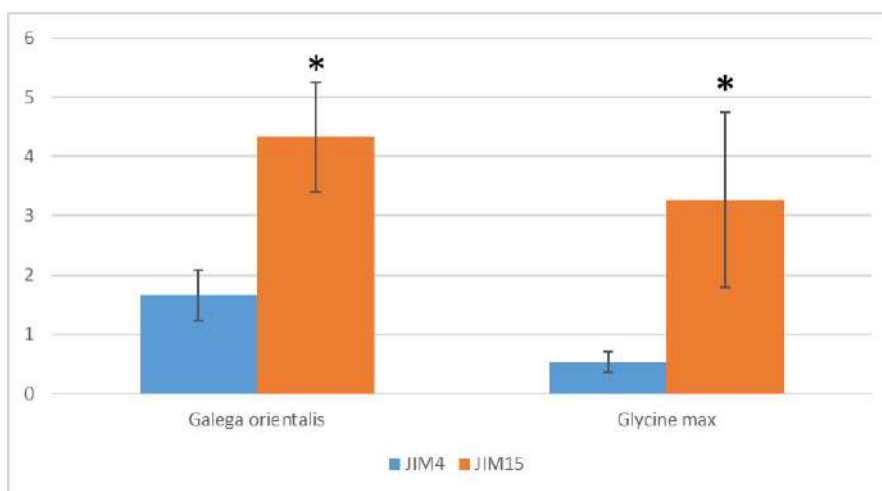
Мутант *P. sativum* SGEFix<sup>-</sup>-3 (*Pssym26*), имеющий фенотип раннего старения, демонстрировал значительно большее количество АГБ с ГФИ-якорем в 2-недельных клубеньках, чем в клубеньках дикого типа, при этом в

4-недельных клубеньках у этого мутанта количество АГБ резко снижалось (Рисунок А.27Е; Таблица 6) [Tsyganova et al., 2019c]. Аналогичная картина наблюдалась у другого мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*), для которого был характерен периодический выход ризобий в некоторые клетки отдельных клубеньков [Voroshilova et al., 2001]. У мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*), образующего клубеньки с бактериоидами аномальной формы [Tsyganov et al., 1998], количество заякоренного АГБ также было снижено в 4-недельных клубеньках по сравнению с 2-недельными, но при этом через 2 недели после инокуляции количество АГБ с ГФИ-якорем в клубеньках данного мутанта и в клубеньках дикого типа не отличалось (Таблица 6) [Tsyganova et al., 2019c]. Наблюдаемые различия в распределения АГБ с ГФИ-якорем в клубеньках мутантов *P. sativum* *Pssym33-3*, *Pssym26* и *Pssym40-1* и общее резкое снижение их количества в 4-недельных клубеньках может свидетельствовать об активации раннего старения в клубеньках этих мутантов [Serova et al., 2018]. Таким образом, предполагается, что связанный с мембраной АГБ может быть маркером созревания симбиосом и/или играть роль в дифференцировке симбиосом [Tsyganova et al., 2019c].

Ранее было показано, что гликопротеины симбиосомной мембраны несут онтогенетически регулируемые антигены в зависимости от стадии развития клубенька. В частности, был идентифицирован ряд эпитопов, связанных с гликопротеиновыми и гликолипидными компонентами симбиосомной мембраны (антитела классов I-III) [Perotto et al., 1991]. АГБ, распознаваемые антителами I класса (MAC207), по-видимому, устойчиво связаны с симбиосомными мембранами в зоне инфекции и ранней азотфиксации, но их количество снижается в поздней зоне азотфиксации. Гликопротеины и гликолипиды, распознаваемые антителами II класса (MAC255), были обнаружены в зоне азотфиксации. Мембранные антигены и растворимые компоненты перибактероидной жидкости, распознаваемые антителами III класса (MAC266, PsNLEC-1), были связаны со зрелыми азотфиксирующими и стареющими клетками [Kardailsky et al., 1996]. Кроме

того, на симбиосомной мембране в клубеньках *G. orientalis* и *G. max* было обнаружено значительное количество АГБ (Рисунок 3; Рисунок А.1), функция которых в настоящее время неизвестна [Tsyganova et al., 2023a].

В начале старения появление SNARE-маркеров SYP22 и VTI11 на мембране симбиосомы указывает на переход к литической вакуоли, в которой утилизируются бактериоды [Limpens et al., 2009]. Таким образом, мембрана симбиосомы является уникальной, сочетая в себе черты плазматической мембраны, тонопласта и специфического, присущего только симбиотическому компартменту, идентичного периарбускулярной мембране [Pumplin, Harrison, 2009; Serova et al., 2018; Tsyganova et al., 2018], а арабинаны (сшитые с РГ-I и входящие в состав АГБ), по-видимому, играют важную роль в развитии инфекционных структур, в частности симбиосом.



Данные представлены в виде количества золотых частиц в  $1\mu\text{m}^2$ . Звездочками отмечены статистически значимые отличия от мечения JIM4 (двухвыборочный t-тест,  $p < 0,05$ ;  $n = 28-46$ ), вертикальные столбики представляют стандартное отклонение.

**Рисунок 3 — Распределение арабиногалактановых белков, распознаваемых антителами JIM4 и JIM15, в симбиосомах инфицированных клеток в клубеньках *Galega orientalis* и *Glycine max***

При формировании симбиосом индукция у ризобий генов *nif* и *fix*, необходимых для азотфиксации, контролируется кислородом, а не азотным статусом [Dixon, Kahn, 2004], поэтому в клубеньках с помощью леггемоглобина поддерживается очень низкое парциальное давление

кислорода, что предотвращает инактивацию нитрогеназы. Точная регулировка окислительно-восстановительного состояния и наличие антиоксидантной системы при этом имеет решающее значение для устойчивости бактериоидов [Иванова, Цыганов, 2017; Matamoros, Vecana, 2020]. В клубеньках описаны различные механизмы защиты от АФК, которые включают ферменты, такие как супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза и неферментативные молекулы аскорбат и глутатион [Santos *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001; Matamoros *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2004; Frendo *et al.*, 2013; Ivanova *et al.*, 2022].

В клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантов большое количество метки глутатиона было показано в симбиосомах со зрелыми бактериоидами в клетках в зоне азотфиксации и ее уменьшение в стареющих бактериоидах (Таблица 7) [Ivanova *et al.*, 2022]. Эти данные подтверждают наблюдение, что наибольшее количество как восстановленной, так и окисленной формы глутатиона наблюдалось в бактериоидах зрелых клубеньков *P. sativum*, однако в стареющих клубеньках его количество было заметно снижено [Matamoros *et al.*, 2013]. Недавно было продемонстрировано, что дефицит глутатиона у *S. meliloti* 2011 (*gshB*) не влияет на дифференцировку бактериоидов, однако вызывает раннее старение клубеньков [Yang *et al.*, 2020], что указывает на то, что содержание глутатиона в бактериоидах необходимо для их правильного функционирования.

В бактериях в инфекционных нитях в клубеньках *P. sativum* дикого типа количество глутатиона было достаточно низким (Таблица 7). Однако наиболее интенсивное мечение наблюдалось в бактериях в некоторых «запертых» инфекционных нитях мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) и ювенильных бактериоидах мутантов SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) и SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) [Ivanova *et al.*, 2022]. Эти эффекты можно объяснить активацией сильных защитных реакций у этих мутантов, включая суберинизацию стенок инфекционных нитей в клубеньках SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) [Ivanova *et al.*, 2015] и накопление перекиси водорода вокруг ювенильных бактериоидов в клубеньках SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) [Цыганова *et al.*, 2009]. Это позволяет

предположить, что ризобии используют глутатион для смягчения стресса, вызванного активацией защитных реакций растений у этих мутантов.

**Таблица 7 — Распределение глутатиона в инфекционных структурах в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum***

Генотип	Тип	Бактероиды	Перибактероидное пространство	Инфекционные нити/капли	Цитоплазма
SGE (дикий тип)	ювенильные	4,71 ± 0,41	6,3 ± 0,63 <sup>&amp;</sup>	3,93 ± 0,23	8,94 ± 0,43
	зрелые	78,59 ± 5,74 <sup>a</sup>	3,42 ± 0,28 <sup>a,&amp;</sup>		8,74 ± 0,73
	стареющие	7,52 ± 0,83 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,58 <sup>&amp;</sup>		7,9 ± 0,51
SGEFix <sup>-1</sup> ( <i>Pssym40-1</i> )	ювенильные	24,71 ± 0,8 <sup>a,b,c</sup>	8,07 ± 0,4 <sup>b,c,&amp;</sup>	7,37 ± 0,31 <sup>a</sup>	14,03 ± 0,91 <sup>a,b,c</sup>
	аномальные	6,25 ± 0,33 <sup>b,d</sup>	7,89 ± 0,41 <sup>b,c,&amp;</sup>		
SGEFix <sup>-2</sup> ( <i>Pssym33-3</i> )	аномальные	10,59 ± 0,48 <sup>b,d</sup>	7,59 ± 0,33 <sup>b,c,&amp;</sup>	4,08 ± 0,22 <sup>d</sup>	24,12 ± 1,01 <sup>a,b,c,d</sup>

Результаты представлены в виде количества частиц золота в 1мкм<sup>2</sup>. Приведено среднее значение ± стандартная ошибка. Буквы указывают на статистически значимые различия (t-критерий с поправкой на множественные сравнения, *padj* < 0,05).

<sup>a</sup> От значения в области ювенильных клеток дикого типа (или от значения в той же области клетки у дикого типа).

<sup>b</sup> От значения в области зрелых клеток дикого типа.

<sup>c</sup> От значения в области стареющих клеток дикого типа.

<sup>d</sup> От значений в области ювенильных клеток *Pssym40-1* (или от значения в той же области клетки у *Pssym40-1*);

<sup>&</sup> От значения у бактериоида того же типа и генотипа.

Фитогормональная регуляция оказывает большое влияние на развитие симбиотических клубеньков [Цыганова, Цыганов, 2015; Долгих *et al.*, 2016a; Долгих *et al.*, 2016b; Цыганова, Цыганов, 2018; Mathesius, 2020]. Важную роль фитогормоны играют и в формировании и модификации симбиотического интерфейса в клубеньках, особенно в дифференцировке симбиосомной мембраны и становлении перибактероидного пространства.

В клубеньках *P. sativum* дикого типа было продемонстрировано наличие транс-зеатина рибозида в матриксе инфекционных капель и в экзополисахаридной капсуле бактерий (Рисунок А.29А), в симбиосомах, как в перибактероидном пространстве, так и внутри бактериоидов (Рисунок А.29Б),



а также в везикулах, которые были связаны с симбиосомами, и значительное уменьшение его количества в стареющих симбиосомах [Dolgikh et al., 2020]. Кроме того, у мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) количество метки транс-зеатин рибозида в инфекционных нитях возрастало (Рисунок А.29В), а в гипертрофированных инфекционных каплях в клубеньках мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) цитокинин не был обнаружен, но в больших количествах наблюдался в мультибактериальных симбиосомах, формируемых данным мутантом (Рисунок А.29Г). В инфекционных нитях мутанта *P. sativum* RisFixV (*Pssym42*) с пропитанными каллозой стенками транс-зеатин рибозида отсутствовал в матриксе, но встречался в небольших количествах в утолщенных стенках (Рисунок А.29Д). Наблюдаемое распределение транс-зеатин рибозида может указывать на то, что в зрелых клубеньках некоторые формы цитокининов участвуют в негативной регуляции инфекции, ограничивая рост инфекционных нитей и, в частности, развитие инфекционных капель. Следует отметить, что в клубеньках мутантов SGEFix<sup>-5</sup> (*Pssym33-2*) и SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) инфекционные нити сильно разветвлены [Voroshilova et al., 2009; Цыганова et al., 2019], вероятно, из-за снижения уровня цитокининов и отсутствия их отрицательного эффекта на рост инфекционных нитей [Dolgikh et al., 2020].

Высокое количество гиббереллина (ГА<sub>3</sub>) было обнаружено в инфицированных клетках в зоне азотфиксации, где он был связан в основном с цитоплазмой и симбиосомами, как в клубеньках *P. sativum* дикого типа SGE, так и у рано стареющего мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*) [Serova et al., 2019]. При этом в ювенильных симбиосомах количество метки было больше, чем в зрелых и стареющих симбиосомах (Таблица 8). Необходимо отметить, что количество гиббереллина было меньше в симбиосомах мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*) по сравнению с клубеньками дикого типа (Таблица 8), что вероятно связано с ранним старением симбиотических структур у этого мутанта, т.е. с увеличением возраста клубеньков дикого типа и рано стареющего мутанта количество гиббереллина в симбиосомах снижалось. Стоит отметить, что

недавно было обнаружено, что гиббереллин способствуют функционированию азотфиксирующих клубеньков [McAdam *et al.*, 2018]. Однако точная функция гиббереллина в развитии инфицированных клеток и симбиосом требует выяснения. Ранее было выявлено негативное влияние гиббереллина на развитие инфекционной нити [McAdam *et al.*, 2018]. Действительно, количество гиббереллина в инфекционных нитях было ниже, чем в симбиосомах (Таблица 8). Однако гиббереллин был обнаружен в стенках инфекционных нитей [Serova *et al.*, 2019]. Функция гиббереллина в развитии инфекционных нитей в настоящее время неизвестна. Интересно отметить, что недавно было высказано предположение об участии гиббереллина в облегчении выхода бактерий из инфекционных нитей [Tatsukami, Ueda, 2016], а также о его роли в задержке старения клубеньков. Снижение регуляции генов, связанных со старением, уменьшение зоны старения и увеличение зоны азотфиксации в клубеньках растений дикого типа *P. sativum*, обработанных экзогенным ГА<sub>3</sub>, подтверждает негативную регуляцию гиббереллином старения клубеньков и участие ГА<sub>3</sub> в функционировании зрелого клубенька [Serova *et al.*, 2019].

**Таблица 8 — Распределение гиббереллина (ГА<sub>3</sub>) в 2-недельных клубеньках *Pisum sativum* дикого типа SGE и мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*)**

Генотип	Локализация	Среднее значение	Стандартная ошибка
SGE (дикий тип)	Ювенильные симбиосомы	61,25 <sup>a,d</sup>	2,73
	Зрелые симбиосомы	43,03 <sup>b,d</sup>	2,46
	Стареющие симбиосомы	19,90 <sup>c,d</sup>	2,94
	Инфекционные нити и инфекционные капли	11,15 <sup>f</sup>	2,78
SGEFix <sup>-3</sup> ( <i>Pssym26</i> )	Ювенильные симбиосомы	40,95 <sup>a,e</sup>	6,29
	Зрелые симбиосомы	32,28 <sup>b,e</sup>	3,38
	Стареющие симбиосомы	24,85 <sup>c,e</sup>	2,98
	Инфекционные нити и инфекционные капли	15,36 <sup>f</sup>	2,23

Результаты представлены в виде количества частиц золота/мкм<sup>2</sup>. Представлены средние значения (n = 30–60). Буквы указывают на

статистически значимые различия, выявленные с помощью теста диапазона Тьюки (значение  $P \leq 0,001$ ).

<sup>a</sup> Между ювенильными симбиосомами дикого типа и мутантом.

<sup>b</sup> Между зрелыми симбиосомами дикого типа и мутантом.

<sup>c</sup> Между стареющими симбиосомами дикого типа и мутантом.

<sup>d</sup> Между ювенильными, зрелыми и стареющими симбиосомами дикого типа.

<sup>e</sup> Между ювенильными, зрелыми и стареющими симбиосомами мутанта.

<sup>f</sup> Между инфекционными нитями и инфекционными каплями у дикого типа и мутанта.

При формировании компартментов, заселяемых как симбиотическими бактериями и грибами, так и патогенными, происходит перестройка и реструктуризация мембран [Wang, Dong, 2011]. При этом требуется значительная перестройка не только мембранных систем, но и цитоскелета растительной клетки [Kitaeva *et al.*, 2016]. Важную роль в этой перестройке играет эндоплазматический ретикулум (ЭПР) [Цыганова, Цыганов, 2019a]. Он тесно связан с инфекционными структурами. Так, каналцы гранулярного ЭПР тесно контактируют со стенкой инфекционной нити (Рисунок А.30А), а везикулы гладкого или агранулярного ЭПР находятся вблизи инфекционных капель и содержат материал, по электронной плотности сходный с матриксом инфекционных капель (Рисунок А.30Б). Подобные везикулы активно участвуют в высвобождении бактерий из инфекционных капель, доставляя к плазматической мембране мембранный материал (Рисунок А.30В,Ж) [Цыганова, Цыганов, 2019a]. Кроме того, везикулярный транспорт задействован в доставке к симбиосомам фитогормонов: гиббереллина (Рисунок А.30Д,З) [Serova *et al.*, 2019] и транс-зеатина рибозида (Рисунок А.30Г) [Dolgikh *et al.*, 2020], а также глутатиона, что может косвенно подтвердить наличие транспорта растительного глутатиона в бактериоиды (Рисунок А.30Е) [Ivanova *et al.*, 2022].

Симбиотически неэффективные мутанты *P. sativum* демонстрируют изменения в характере и направлении везикулярного транспорта соотносящиеся с их фенотипами [Tsyganova *et al.*, 2009; Serova *et al.*, 2019; Tsyganova *et al.*, 2019a; Dolgikh *et al.*, 2020; Ivanova *et al.*, 2022]. Так, у мутанта

SGEFix<sup>-6</sup> (*Pssym40-2*) наблюдалось увеличенное количество везикул, доставляющих мембранный материал к гипертрофированным инфекционным каплям, свойственных этому мутанту (Рисунок А.30Ж). У мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) везикулярный транспорт вовлечен в аномальную секрецию транс-зеатин рибозида в вакуоль, что хорошо соотносится с ранее полученными данными о сниженном уровне этого фитогормона в клубеньках мутанта [Dolgikh et al., 2020]. У мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*), характеризующегося морфологически дифференцированными бактериоидами, претерпевающими быструю деградацию, наблюдались везикулы, доставляющие ГА<sub>3</sub> к симбиосомам (Рисунок А.30З), сходным образом с диким типом [Serova et al., 2019]. У мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) было выявлено нарушение транспорта гликопротеинов матрикса инфекционной нити в межклеточное пространство (Рисунок А.19Г; Рисунок А.20Б) [Tsyganova et al., 2009]. Кроме того, у двойного мутанта RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*) были обнаружены транспортные везикулы, транспортирующие АГБ-Э, меченные антителами MAC265 (Рисунок А.20Г), MAC204 (Рисунок А.22Б) и MAC236 (Рисунок А.22Д), не только к инфекционной нити, но и к межклеточному пространству, что демонстрирует нарушение транспорта у этого мутанта [Tsyganova et al., 2009; Tsyganova et al., 2019a].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе развития бобово-ризобиального симбиоза процесс интернализации ризобий зависит от модификации растительно-микробных поверхностей (симбиотического интерфейса) и, в первую очередь, от изменения состава и соотношения его компонентов в клеточных стенках как растительных клеток, так и инфекционных нитей. Различные компоненты симбиотического интерфейса играют важную роль в обеспечении позиционной информации во время ризобиальной инфекции и развития клубеньков. Дифференцировка инфицированных клеток и последовательные изменения их морфологии соответствуют последовательным изменениям молекулярного состава апопласта и поверхностных мембранных структур (плазмалеммы и симбиосомной мембраны). Проведенные исследования симбиотического интерфейса позволили выявить его общие и видоспецифичные признаки у растений, формирующих разные типы клубеньков (Таблица 9) [Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b].

**Таблица 9 — Видоспецифические особенности симбиотического интерфейса в клубеньках Бобовых**

Вид	Клеточная стенка				Стенка инфекционной нити
	Меристематическая клетка	Колонизированная клетка	Инфицированная клетка	Неинфицированная клетка	
<i>Pisum sativum</i>	остов РГ-I	Ca <sup>2+</sup> -связанный ГГ	*	*	галактан РГ-I
<i>Medicago truncatula</i>	галактан РГ-I	КГ	*	КГ Ca <sup>2+</sup> -связанный ГГ	Ca <sup>2+</sup> -связанный ГГ
<i>Galega orientalis</i>	галактан РГ-I	КГ	КГ	НМ ГГ остов РГ-I	галактан РГ-I

## Продолжение таблицы 9

<i>Vavilovia formosa</i>	КГ, НМ ГГ	КГ, НМ ГГ	КГ, НМ ГГ	КГ	галактан РГ-I
<i>Vicia villosa</i>	*	НМ ГГ	галактан РГ-I	*	НМ ГГ
<i>Glycine max</i>	—	—	НМ ГГ, Са <sup>2+</sup> - связанный ГГ	галактан РГ-I	КГ

Приведены только основные компоненты по данным флуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии. \* — в состав клеточных стенок входят общие для всех изученных видов и типов клеток: высокометилэтерифицированный ГГ и РГ-I (остов и арабинановая боковая цепь). НМ ГГ — низкометилэтерифицированный ГГ, галактан — линейная (1→4)-α-L-галактановая боковая цепь. Прочерк указывает на отсутствие данного типа клеток в детерминированных клубеньках *G. max*. Другие сокращения приведены в соответствии с основным текстом.

Для всех изученных видов Бобовых было характерно наличие высокометилэтерифицированного ГГ и РГ-I (его полисахаридного остова и арабинановой боковой цепи) во всех клеточных стенках и стенках инфекционных нитей, что соответствует изодиаметрически растущим клеткам [Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b]. К наиболее ярким видовым особенностям симбиотического интерфейса в клубеньках недетерминированного типа можно отнести наличие линейной галактановой боковой цепи РГ-I в стенках инфекционных нитей у *P. sativum*, *G. orientalis* и *V. formosa*, в отличие от клубеньков *M. truncatula* и *V. villosa*, относящихся к той же кладе с отсутствием инвертированных повторов (IRLC) [Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b]. Также к видоспецифическим особенностям можно отнести отсутствие фукозилированного КГ в клеточных стенках в клубеньках *P. sativum*, его наличие в клеточных стенках колонизированных и неинфицированных клеток в клубеньках *M. truncatula*, в клеточных стенках всех типов клеток в клубеньках *V. formosa*. Наблюдаются вариации локализации и ГГ, особенно низкометиленного — он присутствует в стенках инфекционных нитей в клубеньках *V. villosa*, в клеточных стенках неинфицированных клеток в

клубеньках *G. orientalis* и в клеточных стенках всех типов клеток *V. formosa*.  $\text{Ca}^{2+}$ -связанный ПГ был характерен для клеточных стенок колонизированных клеток *P. sativum*, неинфицированных клеток *M. truncatula*, а также стенок инфекционных нитей *M. truncatula*. Неразветвленная основа РГ-I преимущественно выявлялась в меристематических клетках в клубеньках *P. sativum* и в клеточных стенках неинфицированных клеток в клубеньках *G. orientalis* [Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b]. В отличие от клубеньков недетерминированного типа, ведущих свое происхождение от клеток перицикла и внутреннего слоя коры корня, в клубеньках детерминированного типа, происходящих от клеток внешнего слоя клеток коры корня, состав и соотношение компонентов апопласта в этих клубеньках могут отличаться от такового в недетерминированных. К ярким видовым особенностям симбиотического интерфейса детерминированных клубеньков (на примере *G. max*) можно отнести присутствие галактановой боковой цепи РГ-I в клеточных стенках неинфицированных клеток и преимущественное накопление фукозилированного КГ в стенках инфекционных нитей [Tsyganova et al., 2023a].

Выявленные видоспецифические различия в компонентах симбиотического интерфейса кажутся интригующими, учитывая, что изученные виды принадлежат к одной и той же кладе с отсутствием инвертированных повторов (IRLC). Основа этих различий может быть связана с образованием у *P. sativum*, *G. orientalis*, *V. villosa* и *M. truncatula* симбиозов с ризобиями, принадлежащими к разным родам: *Rhizobium* и *Sinorhizobium* (*Ensifer*). В то же время ризобии в клубеньках этих Бобовых существенно различаются по морфологии азотфиксирующих бактериоидов. Ранее были выявлены различия между *P. sativum* и *M. truncatula* в организации тубулинового цитоскелета [Kitaeva et al., 2016]. Наблюдаемые различия в составе симбиотического интерфейса еще раз указывают на необходимость изучения каждого отдельного вида Бобовых. Результаты, полученные в

многочисленных исследованиях модельного вида *M. truncatula*, не всегда могут быть применимы к другим видам Бобовых.

При изучении симбиотического интерфейса симбиосом также была выявлена некоторая видовая специфичность (Таблица 10). Так, в клубеньках *P. sativum* был обнаружен АГБ с ГФИ-якорем, который маркировал не только плазматическую мембрану, как было продемонстрировано в клубеньках *M. truncatula*, но и симбиосомную мембрану, особенно в симбиосомах со зрелыми азотфиксирующими бактериоидами [Tsyganova et al., 2019c]. При изучении растительно-микробной поверхности взаимодействия в симбиосомах в клубеньках недетерминированного типа *P. sativum*, *G. orientalis* и *M. truncatula* было показано наличие арабинана, содержащего от 2 до 7 арабинановых остатков и сшитого с арабинановой боковой цепью РГ-I, и мембранного АГБ в симбиосомах с ювенильными бактериоидами и их отсутствие в симбиосомах со зрелыми бактериоидами [Tsyganova et al., 2023a; Tsyganova et al., 2023b]. При этом в клубеньках детерминированного типа *G. max* арабинаны встречались во всех симбиосомах в инфицированных клетках в постоянном количестве (Рисунок А.25Е,И; Таблица 5) [Tsyganova et al., 2023a].

**Таблица 10 — Видовая специфичность симбиотического интерфейса симбиосом в клубеньках Бобовых**

Вид	Симбиосомы с		
	ювенильными бактериоидами	зрелыми бактериоидами	малодифференцированными бактериоидами
<i>Pisum sativum</i>	арабинан РГ-I	АГБ с ГФИ-якорем	—
<i>Medicago truncatula</i>	арабинан РГ-I	—	—
<i>Galega orientalis</i>	арабинан РГ-I, АГБ	—	—
<i>Glycine max</i>	—	—	арабинан РГ-I, АГБ

Приведены только основные компоненты по данным флуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии. арабинан — линейная (1→5)- $\alpha$ -L-



арабиановая боковая цепь (антитело LM6-M). Другие сокращения приведены в соответствии с основным текстом.

Наиболее полно были описаны онтогенетические изменения симбиотического интерфейса в клубеньках недетерминированного типа у *P. sativum* [Tsyganova et al., 2009; Tsyganova et al., 2019a; Tsyganova et al., 2019c; Tsyganova et al., 2023b]. Клубеньки недетерминированного типа характеризуются наличием постоянно действующей меристемы и выраженной зональностью [Newcomb, 1976; Guinel, 2009], поэтому в таких клубеньках можно проследить градиент дифференцировки клеток при заражении их ризобиями. Клеточные стенки подвергаются изменениям в процессе инфицирования растительных клеток. Так, на начальных этапах инфицирования в клеточных стенках появляются фукозилированные КГ, перекрестно связанные ионами  $\text{Ca}^{2+}$  молекулы ГГ и молекулы РГ-I с блочным характером ветвления, что может быть связано с усилением защитных реакций и повышением жесткости клеточных стенок. С дальнейшим развитием инфекции фукозилированный КГ исчезает из клеточных стенок, но увеличивается содержание низкометилэтерифицированного ГГ, которое достигает максимума в стареющих инфицированных клетках с дегенерирующими симбиосомами. Как состав стенок, так и матрикса инфекционных нитей практически не меняются в зрелом клубеньке вне зависимости от гистологической зоны: в матриксе определяются АГБ-Э и экстенсины, в стенках — ГГ с разной степенью метилирования, а в молекулах РГ-I арабиановые боковые цепи сменяются галактановыми. При выходе бактерий из инфекционных нитей (ювенильные симбиосомы) в симбиосомах распространены арабинаны, схожие с арабиановыми боковыми цепями РГ-I, при созревании симбиосом и дифференцировке бактериоидов в симбиосомах арабинаны исчезают, но увеличивается количество АГБ с ГФИ-якорем, которые можно считать маркером зрелости симбиосомных мембран.

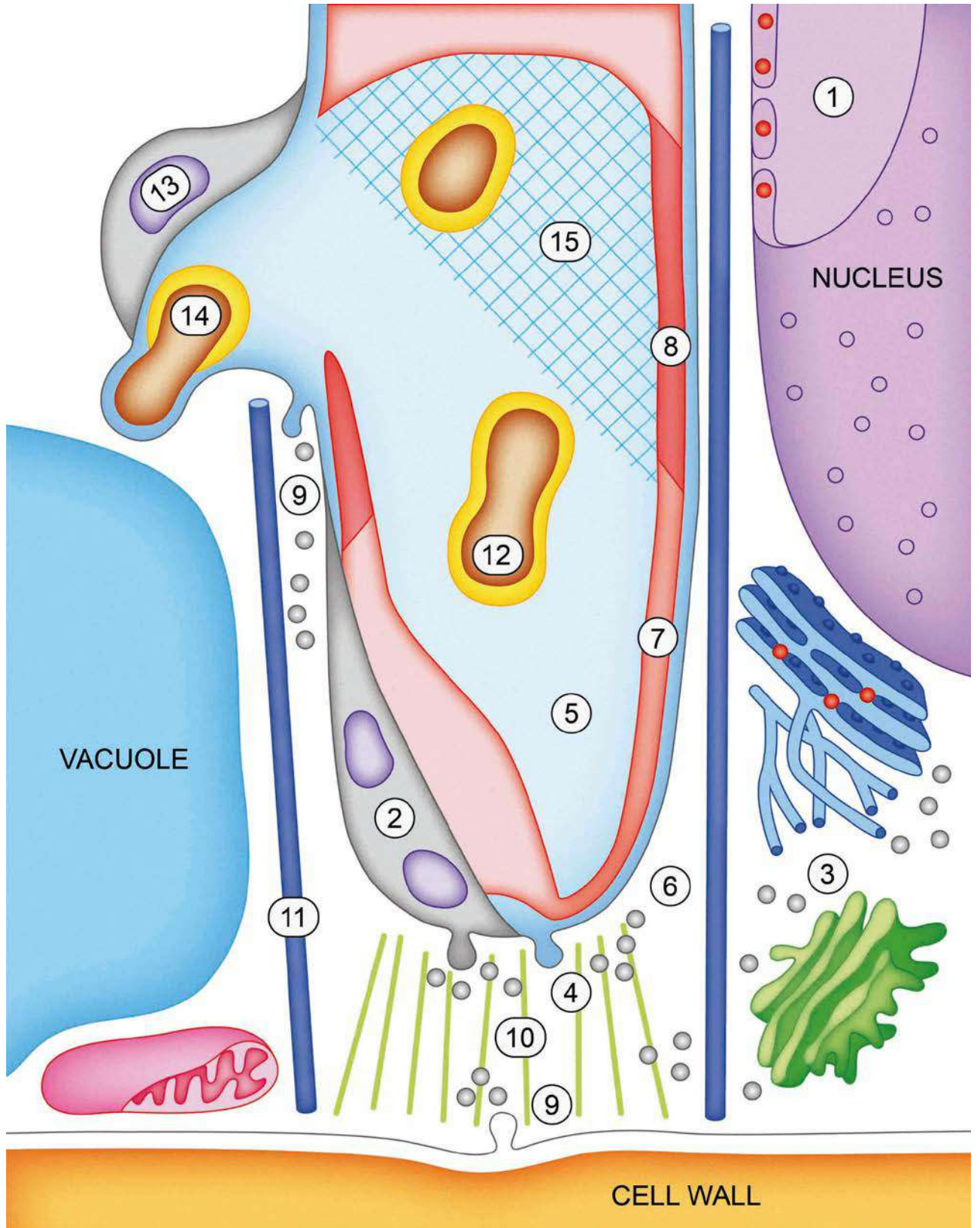
Некоторые различия в характере распределения полисахаридов и белков клеточной стенки между клубеньками дикого типа и мутантами можно

объяснить активацией защитных реакций или преждевременным старением у мутантов. Так, у мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) наблюдаются интенсивные защитные реакции, такие как суберинизация клеточных стенок и стенок инфекционных нитей, отложение дезэтерифицированного пектина в стенках инфекционных нитей и увеличение уровня экспрессии гена, кодирующего пероксидазу [Ivanova et al., 2015]. Образование суберинизированного материала клеточной стенки вокруг вакуоли и образование пектинового геля (идентифицированного с помощью антитела LM5) в матриксе инфекционных нитей являются дополнительными признаками патогеноподобного защитного ответа на бактериальную инфекцию у этого мутанта [Tsyganova et al., 2019b]. У мутанта SGEFix<sup>-5</sup> (*Pssym33-2*), несущего строгую аллель гена *PsSym33*, защитные реакции приводят к деградации ризобий внутри инфекционных нитей [Цыганова et al., 2019]. В целом это предполагает, что важной функцией транскрипционного фактора CYCLOPS/IPD3 является подавление защитной реакции во время установления бобово-ризобиального симбиоза. У другого мутанта *P. sativum* SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) развивается окислительный стресс, который приводит к аномальной дифференцировке бактериоидов [Цыганова et al., 2009; Provorov et al., 2012]. Мутант *P. sativum* RisFixV (*Pssym42*), характеризующийся преждевременным старением инфекционных структур, демонстрирует другую реакцию на ризобиальную инфекцию: синтез и накопление каллозы в клеточных стенках инфицированных клеток и инфекционных нитей, кроме того в дегенерирующих клетках происходит инкапсуляция бактериоидов низкометилированным пектином [Ivanova et al., 2015].

Была предпринята попытка создания модели функционирования инфекционной нити в клубеньках Бобовых — универсального апопластического компартмента, служащего для доставки ризобий внутрь корня и симбиотического клубенька [Цыганова, Цыганов, 2012; Tsyganova, Tsyganov, 2019; Tsyganova et al., 2021].

У большинства растений есть два типа клеток, растущих кончиком: пыльцевые трубки и корневые волоски [Carol, Dolan, 2002; Cameron, Geitmann, 2018]. Инфекционные нити представляют собой третий тип роста клеточной стенки кончиком. Инфекционная нить — это растущая внутрь трубка, в которой полярный (апикальный) рост топологически инвертирован по сравнению с ростом кончика корневых волосков или пыльцевых трубок. Предложенная модель обобщает основные концепции роста инфекционной нити (Рисунок 4) [Tsyganova et al., 2021].

Инициация и рост инфекционной нити являются следствием обмена сигналами с инфицирующими бактериями *Rhizobium* и изменения транскрипционной активности в ядре клетки-хозяина. Помимо прочего, это приводит к синтезу и отложению новых белков в микродоменах плазматической мембраны инфекционной нити. Везикулы, происходящие из ЭПР и АГ, сливаются с плазматической мембраной на кончике инфекционной нити, высвобождая свое содержимое в стенку и внеклеточный матрикс. Целенаправленная секреция из везикул (наряду с ростом и делением бактерий в матриксе просвета инфекционной нити) является движущей силой, способствующей росту инфекционной нити. Гликопротеины, белки и полисахаридные компоненты матрикса инфекционной нити представлены АГБ-Э, белками, богатыми гидроксипролином, ENOD2/11, липооксигеназами, диаминооксидазами и РГ-II. Кроме того,  $H_2O_2$ , вероятно, играет роль в сшивании молекул АГБ-Э и изменении биофизических свойств матрикса инфекционной нити. Везикулы, происходящие из АГ, также содержат целлюлозосинтазы, КГ и пектины (ГГ, РГ-I и РГ-II). ГГ синтезируется в высокометилэтерифицированной форме и может транспортироваться вместе с комплексами ПМЭ/ингибитор ПМЭ. Все эти компоненты и другие ферменты ремоделирования клеточной стенки высвобождаются в апопласт.



(1) Факторы транскрипции изменяют ход развития клетки-хозяина. (2) Растительные белки и гликопротеины локализуются в микродоменах плазматической мембраны инфекционной нити. (3 и 4) Везикулы, происходящие из эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, направляются к плазматической мембране на кончике инфекционной нити, высвобождая свое содержимое в стенку и внеклеточный матрикс. Этот секреторный механизм является движущей силой роста инфекционной нити в сочетании с ростом и делением бактериальных клеток в просвете матрикса. (5) Гликопротеины, белки и полисахариды влияют на биофизические свойства стенки и матрикса в просвете инфекционной нити. (6) Белки клеточной стенки и полисахариды переносятся в везикулах из аппарата Гольджи. (7) В формирующейся стенке инфекционной нити имеется слой кристаллической целлюлозы, и ГГ преимущественно находится в сильно метилэтерифицированной форме. (8) Зрелая стенка инфекционной нити содержит целлюлозу, КГ и ГГ с уменьшающейся степенью метилэтерификации. Это создает более жесткую структуру, усиленную мостиковыми связями с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Также присутствуют РГ-I и РГ-II (в форме димеров с ионом  $\text{V}^+$ ), экстенсины, АГБ и экспансины. (9) Во время развития инфекционной капли ферменты участвуют в модификации и деградации клеточной стенки. (10) Актиновый цитоскелет участвует в организации полярного роста. (11) Тубулиновый цитоскелет образует туннель для ориентации роста инфекционной нити. (12) Полисахариды и белки клеточной стенки и капсулы бактерий играют важную роль в развитии инфекции. (13) Симбиосомная мембрана содержит новый набор белков, связанных с азотфиксирующим эндосимбиозом. (14) Внутри симбиосом клетки ризобий теряют экзополисахаридную капсулу, и структура ЛПС изменяется. (15)  $\text{H}_2\text{O}_2$  играет роль в перекрестном сшивании АГБ-Э и уплотнении матрикса инфекционной нити. ГГ — гомогалактуронан, РГ-I — рамногалактуронан I, РГ-II — рамногалактуронан II. Зеленые линии — микрофиламенты актина, синие линии — микротрубочки, ● —  $\text{Ca}^{2+}$ , светло-голубой внеклеточный матрикс жидкий, заштрихованный синий матрикс гелеобразный, розовая клеточная стенка синтезируется заново, красная клеточная стенка является зрелой или модифицированной. Объекты не масштабируются [Tsyganova et al., 2021].

**Рисунок 4 — Модель роста и развития бобово-ризобияльного симбиотического интерфейса в инфекционных нитях Бобовых (на примере *Pisum sativum*)**

В зарождающейся стенке инфекционной нити целлюлозосинтазы встраиваются в мембрану и синтезируют кристаллическую целлюлозу. На этой стадии основным компонентом стенки инфекционной нити является высокометилэтерифицированный ГГ. На зрелой стадии основными полисахаридными компонентами являются: целлюлоза, КГ и ГГ с различной

степенью метилэтерификации. ГГ с низким уровнем метилэтерификации связывается ионами  $\text{Ca}^{2+}$  между собой, увеличивая тем самым свою жесткость. В стенке инфекционной нити присутствует РГ-I, а также РГ-II в виде димеров с ионом бора. Стенка инфекционной нити также содержит экстенсины, АГБ и экспансины. Кроме того, каллоза и фенольные соединения, такие как суберин, могут накапливаться как часть защитных реакций в ответ на неэффективный симбиоз.

Многие ферменты участвуют в модификации и деградации клеточной стенки во время роста инфекционной нити и формирования инфекционной капли. Полярный рост инфекционной нити опосредован актиновым цитоскелетом, а расположение микротрубочек создает ограничительный туннель для роста инфекционной нити. Внутри просвета важную роль играют бактериальные полисахариды: ЭПС, КПС, ЛПС, циклический  $\beta$ -глюкан, RosR и пероксидазы, индуцируемые ризобиями (Rip1-10).

После выхода бактериальных клеток из инфекционной капли несколько растительных белков ассоциируются с симбиосомной мембраной. К ним относятся: лектиноподобный гликопротеин (PsNLEC1), синаптотагмин (MtSyt1/2/3), синтаксин (MtSYP132), инозитолсодержащий фосфолипид (антиген LM18), АГБ с ГФИ-якорем (антиген LM1) и арабинаны (либо в составе РГ-I (антиген LM6), либо в составе АГБ (антиген LM2)). Внутри симбиосомы ризобии дифференцируются в азотфиксирующие бактериоды: они теряют свою экзополисахаридную капсулу, а структура липида-A и O-антигенных групп ЛПС модифицируется, отчасти под действием белка VasA.

Клеточная стенка, окружающая инфекционную нить, представляет собой динамичную и постоянно меняющуюся систему, выполняющую как структурные, так и защитные функции [Tsyganova et al., 2021]. Ее структура на ранней стадии в корневом волоске или клетке коры корня может сильно отличаться от структуры клетки хозяина, находящейся глубоко в ткани созревающего клубенька. Динамичность инфекционной нити осложняет ее изучение.

С эволюционной точки зрения природа симбиотического взаимодействия Бобовых и ризобий становится все более интимной и сложной. С одной стороны, она включает в себя новые аспекты клеточного морфогенеза, в частности, инфекционную нить и симбиосомные компартменты. С другой стороны, существует точная система подавления защитных реакций хозяина. Задача дальнейших исследований будет заключаться в использовании генетики, геномики и цитологических исследований для интеграции многих параметров, вовлеченных в развитие инфекционных нитей, начиная от передачи сигналов и транспорта белков и заканчивая отложением и ремоделированием клеточной стенки растения.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что как недетерминированные, так и детерминированные клубеньки характеризуются универсальным характером распределения высокометилэтерифицированного гомогалактуронана и неразветвленного остова рамногалактуронана I в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей, что связано с изотропным ростом инфицированных клеток.

2. Выявлены видоспецифичные особенности формирования и модификации клеточных стенок и стенок инфекционных нитей: наличие линейной галактановой боковой цепи рамногалактуронана I в стенках инфекционных нитей у *P. sativum*, *G. orientalis* и *V. formosa*, наличие в клеточных стенках неинфицированных клеток фукозилированного ксилоглюкана у *M. truncatula* и низкометилэтерифицированного гомогалактуронана у *G. orientalis*, а также вариации локализации фукозилированного ксилоглюкана и деэтерифицированного гомогалактуронана в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей изученных видов Бобовых, формирующих недетерминированные клубеньки. В детерминированных клубеньках (на примере *G. max*) было выявлено наличие галактановой боковой цепи рамногалактуронана I в стенках неинфицированных клеток и фукозилированного ксилоглюкана в стенках инфекционных нитей.

3. Показана вариация в распределении и количестве различных эпитопов арабиногалактанпротеин-экстензинов в матриксе инфекционных нитей и инфекционных капель в клубеньках дикого типа и неэффективных мутантов *P. sativum*, что предполагает различную роль специфических последовательностей макромолекулы арабиногалактанпротеин-экстензина в развитии симбиотических клубеньков.



4. Выявлены новые маркеры дифференцировки симбиосом в клубеньках *P. sativum*, *M. truncatula*, *G. orientalis* и *G. max*. Так, заякоренный в мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитолового якоря арабиногалактановый белок может быть маркером созревания симбиосом в клубеньках *P. sativum*, а арабинаны с длиной цепи 2-7 остатков (как в составе арабиановой боковой цепи рамногалактуронана I, так арабиногалактановых белков) участвуют в дифференцировке симбиосом на ранних стадиях.

5. Выявлено, что мутанты *P. sativum* и *M. truncatula* по ортологичным генам *PsSym33* и *PsIPD3* характеризуются различными проявлениями защитных реакций, приводящих к увеличению жесткости клеточной стенки. При этом мутантная аллель *Pssym33-3* приводит к формированию суберинизированного материала клеточной стенки вокруг вакуоли и образованию пектинового геля в матриксе инфекционных нитей в клубеньках *P. sativum*. Это указывает на то, что важной функцией ключевого транскрипционного фактора CYCLOPS/IPD3 является подавление защитных реакций во время развития бобово-ризобиального симбиоза.

6. Обнаружено отложение пектина (деэтерифицированного гомогалактуронана) вокруг стареющих бактериоидов и каллозы вокруг инфекционных нитей, инфицированных клеток и дегенерирующих бактериоидов в клубеньках мутанта *P. sativum* RisFixV (*Pssym42*). Таким образом, ген гороха *PsSym42* (чья последовательность на данный момент еще не идентифицирована) также вовлечен в подавление защитных реакций, активируемых ризобиальной инфекцией.

7. Прослежена динамика накопления пероксида водорода и определены паттерны его локализации в клубеньках *P. sativum* при эффективном и неэффективном взаимодействии, на основе которых выявлена роль  $H_2O_2$  в росте инфекционной нити, связанная с повышением жесткости стенки инфекционной нити, и в развитии окислительного стресса у симбиотически неэффективного мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*).

8. Продемонстрировано, что антиоксидантная система (на примере глутатиона) и фитогормоны (на примере транс-зеатина рибозида и гибберелловой кислоты ГА<sub>3</sub>) участвуют в функционировании и модификации симбиотического интерфейса симбиосом в клубеньках *P. sativum* при эффективных и неэффективных взаимодействиях.

9. Предложена модель функционирования инфекционной нити в недетерминированных клубеньках, которая показывает участие различных компонентов симбиотического интерфейса в построении стенки и матрикса инфекционной нити, а также их участие в формировании инфекционной капли и последующего выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки.

**ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Tsyganova A. V., Seliverstova E. V., Gorshkov A. P., Tsyganov V. E. Analysis of *Glycine max* and *Galega orientalis* nodules revealed specific features of symbiotic interface organization in determinate and indeterminate nodules. // Russian Journal of Plant Physiology. 2023. 70: 192. doi: [10.1134/S1021443723602495](https://doi.org/10.1134/S1021443723602495)
2. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Tsyganov V.E. Comparison of the formation of plant–microbial interface in *Pisum sativum* L. and *Medicago truncatula* Gaertn. nitrogen-fixing nodules. // International Journal of Molecular Sciences. 2023. 24: 13850. doi: [10.3390/ijms241813850](https://doi.org/10.3390/ijms241813850)
3. Ivanova K.A., Chernova E.N., Kulaeva O.A., Tsyganova A.V., Kusakin P.G., Russkikh I.V., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. The regulation of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodule infection and defense responses by glutathione, homoglutathione, and their ratio // Frontiers in Plant Science. 2022. 13: 843565. doi: [10.3389/fpls.2022.843565](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.843565)
4. Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Structure and development of the legume-rhizobial symbiotic interface in infection threads (review) // Cells. 2021. 10: 1050. doi: [10.3390/cells10051050](https://doi.org/10.3390/cells10051050)
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. 125 (6): 905-923. doi: [10.1093/aob/mcaa022](https://doi.org/10.1093/aob/mcaa022)
6. Tsyganov V.E., Tsyganova A.V. Symbiotic regulatory genes controlling nodule development in *Pisum sativum* L. (review) // Plants. 2020. 9 (12): 1741. doi: [10.3390/plants9121741](https://doi.org/10.3390/plants9121741)

7. 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. 10: 285. doi: [10.3389/fpls.2019.00285](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00285)
8. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Comparative analysis of remodelling of the plant–microbe interface in *Pisum sativum* and *Medicago truncatula* symbiotic nodules // *Protoplasma*. 2019. 256 (4): 983-996. doi: [10.1007/s00709-019-01355-5](https://doi.org/10.1007/s00709-019-01355-5)
9. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Bacterial release is accompanied by ectopic accumulation of cell wall material around the vacuole in nodules of *Pisum sativum sym33-3* allele encoding transcription factor PsCYCLOPS/PsIPD3 // *Protoplasma*. 2019. 256 (5): 1449-1453. doi: [10.1007/s00709-019-01383-1](https://doi.org/10.1007/s00709-019-01383-1)
10. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Растительная клеточная стенка в симбиотических взаимодействиях. Пектины (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. 2019. 54 (3): 446-457. doi: [10.15389/agrobiology.2019.3.446rus](https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.3.446rus)
11. Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Analysis of epitope distribution of arabinogalactan protein-extensins in pea (*Pisum sativum*) nodules of wild-type and mutants impaired in infection thread growth // *Экологическая генетика*. 2019. 17 (3): 5-12. doi: [10.17816/ecogen1735-12](https://doi.org/10.17816/ecogen1735-12)
12. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Организация эндоплазматического ретикулула в клетках эффективных и неэффективных клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) // *Экологическая генетика*. 2019. 17 (4): 5-14. doi: [10.17816/ecogen1745-14](https://doi.org/10.17816/ecogen1745-14)
13. Цыганова А.В., Иванова К.А., Цыганов В.Е. Гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков мутанта гороха (*Pisum sativum*) SGEFix<sup>-5</sup> по гену *Sym33*, кодирующему транскрипционный фактор PsCYCLOPS/PsIPD3 // *Экологическая генетика*. 2019. 17 (1): 65-70. doi: [10.17816/ecogen17165-70](https://doi.org/10.17816/ecogen17165-70)

14. Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Plant genetic control over infection thread development during legume-*Rhizobium* symbiosis (review) // In: Symbiosis (Ed. Rigobelo, E.C.), IntechOpen: London, UK. 2018. P. 23-52. doi: [10.5772/intechopen.70689](https://doi.org/10.5772/intechopen.70689)
15. 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. 255 (5): 1443-1459. doi: [10.1007/s00709-018-1246-9](https://doi.org/10.1007/s00709-018-1246-9)
16. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Tsyganov V.E. Cell differentiation in nitrogen-fixing nodules hosting symbiosomes (review) // Functional Plant Biology. 2018. 45: 47–57. doi: [10.1071/FP16377](https://doi.org/10.1071/FP16377)
17. Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations *sym40* (*PsEFD*), *sym33* (*PsIPD3/PsCYCLOPS*) and *sym42* // Protoplasma. 2015. 252: 1505–1517. doi: [10.1007/s00709-015-0780-y](https://doi.org/10.1007/s00709-015-0780-y)
18. Provorov N.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E., Vorobyov N.I. Evolution of symbiotic bacteria within the extra- and intracellular plant compartments: experimental evidence and mathematical simulation (Mini-review) // Symbiosis. 2013. 58: 39–50. doi: [10.1007/s13199-012-0220-0](https://doi.org/10.1007/s13199-012-0220-0)
19. Цыганова В.А., Цыганов В.Е. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями (обзор) // Успехи современной биологии. 2012. 132(2): 211–222.
20. Цыганов В.Е., Цыганова А.В., Ворошилова В.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Анализ взаимодействия симбиотических генов гороха (*Pisum sativum* L.) *Sym33* и *Sym42*, мутации в которых приводят к аномалиям в развитии инфекционных нитей // Экологическая генетика. 2012. X (4): 50–55. doi: [10.17816/ecogen10450-55](https://doi.org/10.17816/ecogen10450-55)

- 21.Цыганова А.В., Китаева А.Б., Бревин Н.Дж., Цыганов В.Е. Клеточные механизмы развития симбиотических клубеньков у бобовых растений (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2011. 3: 34–40.
- 22.Цыганов В.Е., Селиверстова Е.В., Ворошилова В.А., Цыганова А.В., Павлова З.Б., Лебский В.К., Борисов А.Ю., Бревин Н. Дж., Тихонович И.А. Анализ двойных мутантных линий для определения последовательности функционирования генов гороха (*Pisum sativum* L.) *Sym13*, *Sym33* и *Sym40* во время развития симбиотического клубенька // Экологическая генетика. 2010. VIII (2): 3–8. doi: [10.17816/ecogen823-8](https://doi.org/10.17816/ecogen823-8)
- 23.Цыганова А.В., Цыганов В.Е., Финдли К.К. Борисов А.Ю., Тихонович И.А., Бревин Н. Дж. Распределение арабиногалактанпротеинов–экстензинов в клубеньках мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) с нарушениями в развитии инфекционной нити // Цитология. 2009. 51(1): 53–62. doi: [10.1134/S1990519X09010131](https://doi.org/10.1134/S1990519X09010131)
- 24.Цыганова А.В., Цыганов В.Е., Борисов А.Ю., Тихонович И.А., Бревин Н. Дж. Сравнительный цитохимический анализ распределения перекиси водорода у неэффективного мутанта гороха *SGEfix<sup>-1</sup>* (*sym40*) и исходной линии *SGE* // Экологическая генетика. 2009. VII (3): 3–9. doi: [10.17816/ecogen733-9](https://doi.org/10.17816/ecogen733-9)
- 25.Brewin N., Khodorenko (Tsyganova) A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Rathbun E. Legume AGP-extensins in *Rhizobium* infection // In: Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. Eds. F. D. Dakora et al., Springer Science + Business Media B.V., 2008. P. 185-187. doi: [10.1007/978-1-4020-8252-8\\_70](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8252-8_70)

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

CCRC-M	Антитела из серии «Complex Carbohydrate Research Center-Monoclonal»
JIМ	Антитела из серии «John Innes Monoclonal»
LM	Антитела из серии «Leeds Monoclonal»
MAC	Моноклональные антитела из серии ECACC («European collection of authenticated cell cultures»)
SNARE	Растворимые N-этилмалеимид-чувствительные белки-рецепторы (soluble NSF attachment receptor)
АГБ	Арабиногалактановый белок
АГБ-Э	Арабиногалактанпротеин-экстенсин
АФК	Активные формы кислорода
ГГ	Гомогалактуронан, полигалактуроновая кислота
ГФИ	Гликозилфосфатидилинозитол
КГ	Ксилоглюкан
нпи	Неделя после инокуляции
КПС	Капсулярный полисахарид
ЛПС	Липополисахарид
РГ-I	Рамногалактуронан I
ЭПР	Эндоплазматический ретикулум
ЭПС	Экзополисахариды

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams M.A., Buchmann N., Sprent J., Buckley T.N., Turnbull T.L. Crops, nitrogen, water: are legumes friend, foe, or misunderstood ally? // Trends in Plant Science. — 2018. — V. 23, № 6. — P. 539-550.
2. Anderson C.T. We be jammin': an update on pectin biosynthesis, trafficking and dynamics // Journal of Experimental Botany. — 2015. — V. 67, № 2. — P. 495-502.
3. Bapaume L., Reinhardt D. How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza // Frontiers in Plant Science. — 2012. — V. 3.
4. Bellincampi D., Cervone F., Lionetti V. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions // Frontiers in Plant Science. — 2014. — V. 5. — P. 228.
5. Benaben V., Duc G., Lefebvre V., Huguet T. TE7, an inefficient symbiotic mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong // Plant Physiology. — 1995. — V. 107, № 1. — P. 53-62.
6. Bestwick C.S., Brown I.R., Bennett M.H., Mansfield J.W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* // The Plant Cell. — 1997. — V. 9, № 2. — P. 209-221.
7. Bolaños L., Cebrián A., Redondo-Nieto M., Rivilla R., Bonilla I. Lectin-like glycoprotein PsNLEC-1 is not correctly glycosylated and targeted in boron-deficient pea nodules // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2001. — V. 14, № 5. — P. 663-670.
8. Bolaños L., Redondo-Nieto M., Rivilla R., Brewin N.J., Bonilla I. Cell surface interactions of *Rhizobium* bacteroids and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2004. — V. 17, № 2. — P. 216-223.



9. Borisov A.Y., Rozov S.M., Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. Sequential functioning of *Sym-13* and *Sym-31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L) // Molecular and General Genetics. — 1997. — V. 254, № 5. — P. 592-598.
10. Bourassa D.V., Kannenberg E.L., Sherrier D.J., Buhr R.J., Carlson R.W. The lipopolysaccharide lipid A long-chain fatty acid is important for *Rhizobium leguminosarum* growth and stress adaptation in free-living and nodule environments // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2017. — V. 30, № 2. — P. 161-175.
11. Bradley D.J., Wood E.A., Larkins A.P., Galfre G., Butcher G.W., Brewin N.J. Isolation of monoclonal antibodies reacting with peribacteroid membranes and other components of pea root nodules containing *Rhizobium leguminosarum* // Planta. — 1988. — V. 173, № 2. — P. 149-160.
12. Brewin N., Khodorenko A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Rathbun E. Legume AGP-extensins in *Rhizobium* infection // Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture / Dakora F. D. et al., 2008. — P. 185-187.
13. Brewin N.J. Development of the legume root nodule // Annual Review of Cell Biology. — 1991. — V. 7, № 1. — P. 191-226.
14. Brewin N.J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis // Critical Reviews in Plant Sciences. — 2004. — V. 23, № 4. — P. 293-316.
15. Cameron C., Geitmann A. Cell mechanics of pollen tube growth // Current Opinion in Genetics & Development. — 2018. — V. 51. — P. 11-17.
16. Campbell G.R.O., Reuhs B.L., Walker G.C. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2002. — V. 99, № 6. — P. 3938-3943.

17. Cantu D., Vicente A.R., Labavitch J.M., Bennett A.B., Powell A.L.T. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility // Trends in Plant Science. — 2008. — V. 13, № 11. — P. 610-617.
18. Cao L., Lu W., Mata A., Nishinari K., Fang Y. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review // Carbohydrate Polymers. — 2020. — V. 242. — P. 116389.
19. Carol R.J., Dolan L. Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Section B: Biological Sciences. — 2002. — V. 357, № 1422. — P. 815-821.
20. Cassab G.I. Plant cell wall proteins // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. — 1998. — V. 49, № 1. — P. 281-309.
21. Catalano C.M., Lane W.S., Sherrier D.J. Biochemical characterization of symbiosome membrane proteins from *Medicago truncatula* root nodules // Electrophoresis. — 2004. — V. 25, № 3. — P. 519-531.
22. Cho E., Kwon C., Lee S., Tahir M.N., Park S., Jung S. Biotinylation of the rhizobial cyclic  $\beta$ -glucans and succinoglycans crucial for symbiosis with legumes // Carbohydrate Research. — 2014. — V. 389. — P. 141-146.
23. Clarke V.C., Loughlin P.C., Gavrín A., Chen C., Brear E.M., Day D.A., Smith P.M.C. Proteomic analysis of the soybean symbiosome identifies new symbiotic proteins // Molecular & Cellular Proteomics. — 2015. — V. 14, № 5. — P. 1301-1322.
24. Coba de la Peña T., Fedorova E., Pueyo J.J., Lucas M.M. The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? // Frontiers in Plant Science. — 2018. — V. 8, № 2229.
25. Collmer A., Keen N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis // Annual Review of Phytopathology. — 1986. — V. 24. — P. 383-409.
26. Combier J.-P., Frugier F., de Billy F., Boualem A., El-Yahyaoui F., Moreau S., Vernié T., Ott T., Gamas P., Crespi M., Niebel A. *MtHAP2-1* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by

microRNA169 in *Medicago truncatula* // Genes and Development. — 2006. — V. 20, № 22. — P. 3084-3088.

27. Considine M.J., Siddique K.H.M., Foyer C.H. Nature's pulse power: legumes, food security and climate change // Journal of Experimental Botany. — 2017. — V. 68, № 8. — P. 1815-1818.

28. Cosgrove D.J. Growth of the plant cell wall // Nature Reviews Molecular Cell Biology. — 2005. — V. 6, № 11. — P. 850-861.

29. Dahiya P., Brewin N.J. Immunogold localization of callose and other cell wall components in pea nodule transfer cells // Protoplasma. — 2000. — V. 214, № 3. — P. 210-218.

30. Dahiya P., Sherrier D.J., Kardailsky I.V., Borisov A.Y., Brewin N.J. Symbiotic gene *Sym31* controls the presence of a lectinlike glycoprotein in the symbiosome compartment of nitrogen-fixing pea nodules // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 1998. — V. 11, № 9. — P. 915-923.

31. Davies H.A., Daniels M.J., Dow J.M. Induction of extracellular matrix glycoproteins in *Brassica* petioles by wounding and in response to *Xanthomonas campestris* // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 1997. — V. 10, № 7. — P. 812-820.

32. de Faria S.M., Ringelberg J.J., Gross E., Koenen E.J.M., Cardoso D., Ametsitsi G.K.D., Akomatey J., Maluk M., Tak N., Gehlot H.S., Wright K.M., Teaumroong N., Songwattana P., de Lima H.C., Prin Y., Zartman C.E., Sprent J.I., Ardley J., Hughes C.E., James E.K. The innovation of the symbiosome has enhanced the evolutionary stability of nitrogen fixation in legumes // New Phytologist. — 2022. — V. 235, № 6. — P. 2365-2377.

33. Dixon R., Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation // Nature Reviews Microbiology. — 2004. — V. 2. — P. 621-631.

34. 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.

35. Emerich D.W., Krishnan H.B. Symbiosomes: temporary moonlighting organelles // *Biochemical Journal*. — 2014. — V. 460, № 1. — P. 1-11.

36. Engelsdorf T., Hamann T. An update on receptor-like kinase involvement in the maintenance of plant cell wall integrity // *Annals of Botany*. — 2014. — V. 114, № 6. — P. 1339-1347.

37. Fagard M., Desnos T., Desprez T., Goubet F., Refregier G., Mouille G., McCann M., Rayon C., Vernhettes S., Höfte H. *PROCUSTE1* encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. — 2000. — V. 12, № 12. — P. 2409-2423.

38. Fedorova E.E. Rapid changes to endomembrane system of infected root nodule cells to adapt to unusual lifestyle // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — V. 24, № 5. — P. 4647.

39. Ferguson G.P., Roop R.M., Walker G.C. Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti bacA* mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope // *Journal of Bacteriology*. — 2002. — V. 184, № 20. — P. 5625-5632.

40. Forest F., Chase M.W. *Eurosid i* // *The timetree of life*. — New York: Oxford University Press, 2009. — P. 188-196.

41. Fraysse N., Couderc F., Poinso V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis // *European Journal of Biochemistry*. — 2003. — V. 270, № 7. — P. 1365-1380.

42. Frendo P., Matamoros M., Alloing G., Becana M. Thiol-based redox signaling in the nitrogen-fixing symbiosis // *Frontiers in Plant Science*. — 2013. — V. 4. — P. 376.

43. Freshour G., Bonin C.P., Reiter W.-D., Albersheim P., Darvill A.G., Hahn M.G. Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the *mur1* mutant of *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. — 2003. — V. 131, № 4. — P. 1602-1612.

44. Gage D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2004. — V. 68, № 2. — P. 280-300.
45. García-Rodríguez L.J., Gay A.C., Pon L.A. Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast // *The Journal of Cell Biology*. — 2007. — V. 176, № 2. — P. 197-207.
46. Gavrín A., Chiasson D., Ovchinnikova E., Kaiser B.N., Bisseling T., Fedorova E.E. VAMP721a and VAMP721d are important for pectin dynamics and release of bacteria in soybean nodules // *New Phytologist*. — 2016. — V. 210, № 3. — P. 1011-1021.
47. Gavrín A., Kulikova O., Bisseling T., Fedorova E.E. Interface symbiotic membrane formation in root nodules of *Medicago truncatula*: the role of synaptotagmins *MtSyt1*, *MtSyt2* and *MtSyt3* // *Frontiers in Plant Science*. — 2017. — V. 8, № 201.
48. Goodrum L.J., Patel A., Leykam J.F., Kieliszewski M.J. Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactan-glycoproteins // *Phytochemistry*. — 2000. — V. 54, № 1. — P. 99-106.
49. Gorshkova T.A., Chemikosova S.B., Lozovaya V.V., Carpita N.C. Turnover of galactans and other cell wall polysaccharides during development of flax plants // *Plant Physiology*. — 1997. — V. 114, № 2. — P. 723-729.
50. Gucciardo S., Rathbun E.A., Shanks M., Jenkyns S., Mak L., Durrant M.C., Brewin N.J. Epitope tagging of legume root nodule extensin modifies protein structure and crosslinking in cell walls of transformed tobacco leaves // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2005. — V. 18, № 1. — P. 24-32.
51. Guinel F.C. Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types // *Botany*. — 2009. — V. 87, № 12. — P. 1117-1138.
52. Guinel F.C., Geil R.D. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles

of ethylene in the establishment of these two symbioses // *Canadian Journal of Botany*. — 2002. — V. 80, № 7. — P. 695-720.

53. Haag A.F., Arnold M.F.F., Myka K.K., Kerscher B., Dall'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G.P. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2013. — V. 37, № 3. — P. 364-383.

54. Hancock J.T., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Neill S.J. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species // *Plant Physiology and Biochemistry*. — 2002. — V. 40, № 6. — P. 611-617.

55. Houston K., Tucker M.R., Chowdhury J., Shirley N., Little A. The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions // *Frontiers in Plant Science*. — 2016. — V. 7. — P. 984.

56. Huang R., Liu M., Gong G., Wu P., Patra B., Yuan L., Qin H., Wang X., Wang G., Liao H., Gao L., Yang C., Li H., Zhang S. The Pumilio RNA-binding protein APUM24 regulates seed maturation by fine-tuning the BPM-WRI1 module in *Arabidopsis* // *Journal of Integrative Plant Biology*. — 2021. — V. 63, № 7. — P. 1240-1259.

57. Hükelhoven R. Cell wall–associated mechanisms of disease resistance and susceptibility // *Annual Review of Phytopathology*. — 2007. — V. 45, № 1. — P. 101-127.

58. Ibáñez F., Wall L., Fabra A. Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots // *Journal of Experimental Botany*. — 2016. — V. 68, № 8. — P. 1905-1918.

59. Ivanov S., Fedorova E.E., Limpens E., De Mita S., Genre A., Bonfante P., Bisseling T. *Rhizobium*–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2012. — V. 109, № 21. — P. 8316-8321.

60. Ivanova K.A., Chernova E.N., Kulaeva O.A., Tsyganova A.V., Kusakin P.G., Russkikh I.V., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. The regulation of pea (*Pisum*

*sativum* L.) symbiotic nodule infection and defense responses by glutathione, homoglutathione, and their ratio // *Frontiers in Plant Science*. — 2022. — V. 13. — P. 843565.

61. Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations *sym40* (*PsEFD*), *sym33* (*PsIPD3/PsCYCLOPS*) and *sym42* // *Protoplasma*. — 2015. — V. 252, № 6. — P. 1505-1517.

62. Jamet A., Mandon K., Puppo A., Hérouart D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for optimal establishment of the *Medicago sativa/Sinorhizobium meliloti* symbiosis // *Journal of Bacteriology*. — 2007. — V. 189, № 23. — P. 8741-8745.

63. Kardailsky I.V., Sherrier D.J., Brewin N.J. Identification of a new pea gene, *PsNlec1*, encoding a lectin-like glycoprotein isolated from the symbiosomes of root nodules // *Plant Physiology*. — 1996. — V. 111, № 1. — P. 49-60.

64. Keating D.H., Willits M.G., Long S.R. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in cell surface sulfation // *Journal of Bacteriology*. — 2002. — V. 184, № 23. — P. 6681-6689.

65. Keegstra K. Plant cell walls // *Plant Physiology*. — 2010. — V. 154, № 2. — P. 483-486.

66. Kelly S., Mun T., Stougaard J., Ben C., Andersen S.U. Distinct *Lotus japonicus* transcriptomic responses to a spectrum of bacteria ranging from symbiotic to pathogenic // *Frontiers in Plant Science*. — 2018. — V. 9. — P. 1218.

67. Kiss E., Kereszt A., Barta F., Stephens S., Reuhs B.L., Kondorosi Á., Putnoky P. The *rkp-3* gene region of *Sinorhizobium meliloti* Rm41 contains strain-specific genes that determine K antigen structure // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 12. — P. 1395-1403.

68. Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Timmers A.C.J., Tsyganov V.E. Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: bacterial release and bacteroid

positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements // *New Phytologist*. — 2016. — V. 210, № 1. — P. 168-183.

69. Komalavilas P., Mort A.J. The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins // *Carbohydrate Research*. — 1989. — V. 189. — P. 261-272.

70. 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.

71. Le Quéré A.J.L., Deakin W.J., Schmeisser C., Carlson R.W., Streit W.R., Broughton W.J., Forsberg L.S. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234: Deletion of the rkpMNO locus prevents synthesis of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-non-2-ulosonic acid // *Journal of Biological Chemistry*. — 2006. — V. 281, № 39. — P. 28981-28992.

72. Levesque-Tremblay G., Pelloux J., Braybrook S.A., Müller K. Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development // *Planta*. — 2015. — V. 242, № 4. — P. 791-811.

73. Li Y.-Y., Chen X.-M., Zhang Y., Cho Y.-H., Wang A.-R., Yeung E.C., Zeng X., Guo S.-X., Lee Y.-I. Immunolocalization and changes of hydroxyproline-rich glycoproteins during symbiotic germination of *Dendrobium officinale* // *Frontiers in Plant Science*. — 2018. — V. 9. — P. 552.

74. Lievens S., Goormachtig S., Herman S., Holsters M. Patterns of pectin methylesterase transcripts in developing stem nodules of *Sesbania rostrata* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2002. — V. 15, № 2. — P. 164-168.

75. Limpens E., Ivanov S., van Esse W., Voets G., Fedorova E., Bisseling T. *Medicago* N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity // *The Plant Cell*. — 2009. — V. 21, № 9. — P. 2811-2828.



76. Lionetti V., Cervone F., Bellincampi D. Methyl esterification of pectin plays a role during plant–pathogen interactions and affects plant resistance to diseases // *Journal of Plant Physiology*. — 2012. — V. 169, № 16. — P. 1623-1630.
77. Madsen L.H., Tirichine L., Jurkiewicz A., Sullivan J.T., Heckmann A.B., Bek A.S., Ronson C.W., James E.K., Stougaard J. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus* // *Nature Communications*. — 2010. — V. 1. — P. 10.
78. Matamoros M.A., Becana M. Redox control of the legume-Rhizobium symbiosis // *Advances in Botanical Research* / Frenedo P. et al. Academic Press, 2020. — P. 67-96.
79. Matamoros M.A., Clemente M.R., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Ramos J., Moran J.F., Stiller J., Gresshoff P.M., Becana M. Molecular analysis of the pathway for the synthesis of thiol tripeptides in the model legume *Lotus japonicus* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2003. — V. 16, № 11. — P. 1039-1046.
80. Matamoros M.A., Fernández-García N., Wienkoop S., Loscos J., Saiz A., Becana M. Mitochondria are an early target of oxidative modifications in senescing legume nodules // *New Phytologist*. — 2013. — V. 197, № 3. — P. 873-885.
81. Mathesius U. Hormonal interactions in the regulation of the nitrogen-fixing legume-*Rhizobium* symbiosis // *Advances in Botanical Research* / Frenedo P. et al. Academic Press, 2020. — P. 41-66.
82. Mbengue M.D., Hervé C., Debelle F. Nod factor signaling in symbiotic nodulation // *Advances in Botanical Research* / Frenedo P. et al. Academic Press, 2020. — P. 1-39.
83. McAdam E.L., Reid J.B., Foo E. Gibberellins promote nodule organogenesis but inhibit the infection stages of nodulation // *Journal of Experimental Botany*. — 2018. — V. 69, № 8. — P. 2117-2130.
84. McCartney L., Ormerod A.P., Gidley M.J., Knox J.P. Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea

cotyledons: implications for mechanical properties // *The Plant Journal*. — 2000. — V. 22, № 2. — P. 105-113.

85. McCartney L., Steele-King C.G., Jordan E., Knox J.P. Cell wall pectic (1→4)-β-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem // *The Plant Journal*. — 2003. — V. 33, № 3. — P. 447-454.

86. Miedes E., Vanholme R., Boerjan W., Molina A. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens // *Frontiers in Plant Science*. — 2014. — V. 5. — P. 358.

87. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2008. — V. 11, № 3. — P. 266-277.

88. Monahan-Giovanelli H., Pinedo C.A., Gage D.J. Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2006. — V. 140, № 2. — P. 661-670.

89. Muñoz J.A., Coronado C., Pérez-Hormaeche J., Kondorosi A., Ratet P., Palomares A.J. *MsPG3*, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa-*Rhizobium meliloti* interaction // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1998. — V. 95, № 16. — P. 9687-9692.

90. Newcomb W. A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules // *Canadian Journal of Botany*. — 1976. — V. 54, № 18. — P. 2163-2186.

91. Nezamivand-Chegini M., Metzger S., Moghadam A., Tahmasebi A., Koprivova A., Eshghi S., Mohammadi-Dehchesmeh M., Kopriva S., Niazi A., Ebrahimie E. Nitrogen and phosphorus deficiencies alter primary and secondary metabolites of soybean roots // *bioRxiv*. — 2022. — V. 03, № 14. — P. 484309.

92. Nguema-Ona E., Bannigan A., Chevalier L., Baskin T.I., Driouich A. Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal*. — 2007. — V. 52, № 2. — P. 240-251.

93. Nguema-Ona E., Vické-Gibouin M., Cannesan M.-A., Driouich A. Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions // *Trends in Plant Science*. — 2013. — V. 18, № 8. — P. 440-449.
94. Niehaus K., Kapp D., Pühler A. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant // *Planta*. — 1993. — V. 190, № 3. — P. 415-425.
95. Oldroyd G.E.D., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis // *Annual Review of Genetics*. — 2011. — V. 45, № 1. — P. 119-144.
96. Ovchinnikova E., Journet E.-P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., Fedorova E., Liu W., den Camp R.O., Zhukov V., Tikhonovich I., Borisov A., Bisseling T., Limpens E. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* Spp. // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2011. — V. 24, № 11. — P. 1333-1344.
97. Palin R., Geitmann A. The role of pectin in plant morphogenesis // *Biosystems*. — 2012. — V. 109, № 3. — P. 397-402.
98. Parada M., Vinardell J.M., Ollero F.J., Hidalgo Á., Gutiérrez R., Buendía-Clavería A.M., Lei W., Margaret I., López-Baena F.J., Gil-Serrano A.M., Rodríguez-Carvajal M.A., Moreno J., Ruiz-Sainz J.E. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2006. — V. 19, № 1. — P. 43-52.
99. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses // *Nature Reviews Microbiology*. — 2008. — V. 6, № 10. — P. 763-775.
100. Pawlowski K., Sirrenberg A. Symbiosis between *Frankia* and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes // *Indian Journal of Experimental Biology*. — 2003. — V. 41, № 10. — P. 1165-1183.
101. Pedersen H.L., Fangel J.U., McCleary B., Ruzanski C., Rydahl M.G., Ralet M.-C., Farkas V., von Schantz L., Marcus S.E., Andersen M.C.F., Field R.,

Ohlin M., Knox J.P., Clausen M.H., Willats W.G.T. Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research // *Journal of Biological Chemistry*. — 2012. — V. 287, № 47. — P. 39429-39438.

102. Perotto S., Donovan N., Drobak B.K., Brewin N.J. Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen on the peribacteroid membrane during pea nodule development // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 1995. — V. 8, № 4. — P. 560-568.

103. Perotto S., Vandenbosch K.A., Butcher G.W., Brewin N.J. Molecular composition and development of the plant glycocalyx associated with the peribacteroid membrane of pea root-nodules // *Development*. — 1991. — V. 112, № 3. — P. 763-773.

104. Pogorelko G., Lionetti V., Bellincampi D., Zabolina O. Cell wall integrity: Targeted post-synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens // *Plant Signaling & Behavior*. — 2013. — V. 8, № 9. — P. e25435.

105. Prasad A., Porter D.F., Kroll-Conner P.L., Mohanty I., Ryan A.R., Crittenden S.L., Wickens M., Kimble J. The PUF binding landscape in metazoan germ cells // *RNA*. — 2016. — V. 22, № 7. — P. 1026-1043.

106. Provorov N.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E., Vorobyov N.I. Evolution of symbiotic bacteria within the extra- and intra-cellular plant compartments: experimental evidence and mathematical simulation (Mini-review) // *Symbiosis*. — 2012. — V. 58, № 1-3. — P. 39-50.

107. Pumplin N., Harrison M.J. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis // *Plant Physiology*. — 2009. — V. 151, № 2. — P. 809-819.

108. Puppo A., Pauly N., Boscardi A., Mandon K., Brouquisse R. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume–*Rhizobium* and mycorrhizal symbioses // *Antioxidants and Redox Signaling*. — 2013. — V. 18, № 16. — P. 2202-2219.

109. Rae A., Perotto S., Knox J., Kannenberg E., Brewin N. Expression of extracellular glycoproteins in the uninfected cells of developing pea nodule tissue // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 1991. — V. 4, № 6. — P. 563-570.
110. Rae A.L., Bonfante-Fasolo P., Brewin N.J. Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum* // *The Plant Journal*. — 1992. — V. 2, № 3. — P. 385-395.
111. Ramu S.K., Peng H.-M., Cook D.R. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2002. — V. 15, № 6. — P. 522-528.
112. Rathbun E.A., Brewin N.J. Gum arabic glycoprotein and the infection of legumes by *Rhizobium*: evidence for tyrosine cross-linking by peroxidase and by inorganic catalysis // *Aspects of Applied Biology*. — 2009. — V. 96. — P. 241-246.
113. Rathbun E.A., Naldrett M.J., Brewin N.J. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2002. — V. 15, № 4. — P. 350-359.
114. Redondo-Nieto M., Reguera M., Bonilla I., Bolaños L. Boron dependent membrane glycoproteins in symbiosome development and nodule organogenesis // *Plant Signaling & Behavior*. — 2008. — V. 3, № 5. — P. 298-300.
115. Reguera M., Abreu I., Brewin N.J., Bonilla I., Bolaños L. Borate promotes the formation of a complex between legume AGP-extensin and rhamnogalacturonan II and enhances production of *Rhizobium* capsular polysaccharide during infection thread development in *Pisum sativum* symbiotic root nodules // *Plant, Cell & Environment*. — 2010. — V. 33, № 12. — P. 2112-2120.
116. Reiter W.-D., Chapple C.C.S., Somerville C.R. Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis* // *Science*. — 1993. — V. 261, № 5124. — P. 1032-1035.

117. Rich M.K., Schorderet M., Reinhardt D. The role of the cell wall compartment in mutualistic symbioses of plants // *Frontiers in Plant Science*. — 2014. — V. 5. — P. 238.

118. Robledo M., Jiménez-Zurdo J.I., Velázquez E., Trujillo M.E., Zurdo-Piñeiro J.L., Ramírez-Bahena M.H., Ramos B., Díaz-Mínguez J.M., Dazzo F., Martínez-Molina E., Mateos P.F. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2008. — V. 105, № 19. — P. 7064-7069.

119. Rodríguez-Llorente I.D., Pérez-Hormaeche J., Dary M., Caviedes M.A., Kondorosi A., Ratet P., Palomares A.J. Expression of MsPG3-GFP fusions in *Medicago truncatula* 'hairy roots' reveals preferential tip localization of the protein in root hairs // *European Journal of Biochemistry*. — 2003. — V. 270, № 2. — P. 261-269.

120. Rodríguez-Llorente I.D., Pérez-Hormaeche J., Mounadi K.E., Dary M., Caviedes M.A., Cosson V., Kondorosi A., Ratet P., Palomares A.J. From pollen tubes to infection threads: recruitment of *Medicago* floral pectic genes for symbiosis // *The Plant Journal*. — 2004. — V. 39, № 4. — P. 587-598.

121. Roth L., Stacey G. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources // *European Journal of Cell Biology*. — 1989. — V. 49, № 1. — P. 13-23.

122. Rubio M.C., James E.K., Clemente M.R., Bucciarelli B., Fedorova M., Vance C.P., Becana M. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2004. — V. 17, № 12. — P. 1294-1305.

123. Rydahl M.G., Hansen A.R., Kračun S.K., Mravec J. Report on the current inventory of the toolbox for plant cell wall analysis: proteinaceous and small molecular probes // *Frontiers in Plant Science*. — 2018. — V. 9. — P. 581.

124. Santos R., Hérouart D., Puppo A., Touati D. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis // *Molecular Microbiology*. — 2000. — V. 38, № 4. — P. 750-759.

125. Santos R., Hérouart D., Sigaud S., Touati D., Puppo A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 1. — P. 86-89.
126. Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls // *Journal of Experimental Botany*. — 1999. — V. 50, № 337. — P. 1267-1280.
127. Seifert G.J., Roberts K. The biology of arabinogalactan proteins // *Annual Review of Plant Biology*. — 2007. — V. 58, № 1. — P. 137-161.
128. 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. — P. 285.
129. Serova T.A., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages // *Protoplasma*. — 2018. — V. 255, № 5. — P. 1443-1459.
130. Sherrier D.J., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Brewin N.J. Immunocytological evidence for abnormal symbiosome development in nodules of the pea mutant line Sprint-2Fix<sup>-</sup> (*sym31*) // *Protoplasma*. — 1997. — V. 199, № 1. — P. 57-68.
131. Sherrier D.J., Prime T.A., Dupree P. Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from *Arabidopsis* // *Electrophoresis*. — 1999. — V. 20, № 10. — P. 2027-2035.
132. Showalter A.M., Basu D. Extensin and arabinogalactan-protein biosynthesis: glycosyltransferases, research challenges, and biosensors // *Frontiers in Plant Science*. — 2016. — V. 7.
133. Silva I.R., Jers C., Meyer A.S., Mikkelsen J.D. Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update // *New Biotechnology*. — 2016. — V. 33, № 1. — P. 41-54.

134. Singh S., Katzer K., Lambert J., Cerri M., Parniske M. CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development // *Cell Host and Microbe*. — 2014. — V. 15, № 2. — P. 139-152.
135. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions // *Microbial Cell Factories*. — 2006. — V. 5, № 1. — P. 7.
136. Smallwood M., Martin H., Knox J.P. An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins // *Planta*. — 1995. — V. 196, № 3. — P. 510-522.
137. Sprent J.I., Ardley J., James E.K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts // *New Phytologist*. — 2017. — V. 215, № 1. — P. 40-56.
138. Su C. Pectin modifications at the symbiotic interface // *New Phytologist*. — 2023. — V. 238, № 1. — P. 25-32.
139. Su C., Zhang G., Rodriguez-Franco M., Hinnenberg R., Wietschorke J., Liang P., Yang W., Uhler L., Li X., Ott T. Transcellular progression of infection threads in *Medicago truncatula* roots is associated with locally confined cell wall modifications // *Current Biology*. — 2023. — V. 33, № 3. — P. 533-542.e535.
140. Su S., Higashiyama T. Arabinogalactan proteins and their sugar chains: functions in plant reproduction, research methods, and biosynthesis // *Plant Reproduction*. — 2018. — V. 31, № 1. — P. 67-75.
141. Sujkowska-Rybkowska M., Borucki W. Accumulation and localization of extensin protein in apoplast of pea root nodule under aluminum stress // *Micron*. — 2014. — V. 67. — P. 10-19.
142. Sujkowska M., Górská-Czekaj M., Bederska M., Borucki W. Vacuolar organization in the nodule parenchyma is important for the functioning of pea root nodules // *Symbiosis*. — 2011. — V. 54, № 1. — P. 1-16.
143. Tatsukami Y., Ueda M. Rhizobial gibberellin negatively regulates host nodule number // *Scientific Reports*. — 2016. — V. 6. — P. 27998.



144. Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction // *The Plant Journal*. — 1997. — V. 11, № 6. — P. 1187-1194.
145. Timmers A.C., Auriac M.C., Truchet G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements // *Development*. — 1999. — V. 126, № 16. — P. 3617-3628.
146. Timmers A.C.J., Soupène E., Auriac M.-C., de Billy F., Vasse J., Boistard P., Truchet G. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2000. — V. 13, № 11. — P. 1204-1213.
147. Tirichine L.I., de Billy F., Huguet T. *Mtsym6*, a gene conditioning *Sinorhizobium* strain-specific nitrogen fixation in *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2000. — V. 123, № 3. — P. 845-852.
148. Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Molecular and General Genetics*. — 1998. — V. 259, № 5. — P. 491-503.
149. Tsyganov V.E., Tsyganova A.V. Symbiotic regulatory genes controlling nodule development in *Pisum sativum* L // *Plants*. — 2020. — V. 9, № 12. — P. 1741.
150. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Herrera-Cervera J.A., Sanjuan-Pinilla J.M., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Priefer U.B., Olivares J., Sanjuan J. Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum* // *New Phytologist*. — 2003. — V. 159, № 2. — P. 521-530.
151. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Priefer U.B., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis // *Annals of Botany*. — 2002. — V. 89, № 4. — P. 357-366.

152. Tsyganova A.V., Brewin N., Tsyganov V.E. Analysis of epitope distribution of arabinogalactan protein-extensins in pea (*Pisum sativum*) nodules of wild-type and mutants impaired in infection thread growth // Ecological genetics. — 2019a. — V. 17, № 3. — P. 5-12.

153. Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Structure and development of the legume-rhizobial symbiotic interface in infection threads // Cells. — 2021. — V. 10, № 5.

154. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Tsyganov V.E. Cell differentiation in nitrogen-fixing nodules hosting symbiosomes // Functional Plant Biology. — 2018. — V. 45, № 2. — P. 47-57.

155. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Bacterial release is accompanied by ectopic accumulation of cell wall material around the vacuole in nodules of *Pisum sativum sym33-3* allele encoding transcription factor PsCYCLOPS/PsIPD3 // Protoplasma. — 2019b. — V. 256, № 5. — P. 1449-1453.

156. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Comparative analysis of remodelling of the plant–microbe interface in *Pisum sativum* and *Medicago truncatula* symbiotic nodules // Protoplasma. — 2019c. — V. 256, № 4. — P. 983-996.

157. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Gorshkov A.P., Tsyganov V.E. Analysis of *Glycine max* and *Galega orientalis* nodules revealed specific features of symbiotic interface organization in determinate and indeterminate nodules // Russian Journal of Plant Physiology. — 2023a. — V. 70, № 8. — P. 192.

158. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Tsyganov V.E. Comparison of the formation of plant-microbial interface in *Pisum sativum* L. and *Medicago truncatula* Gaertn. nitrogen-fixing nodules // International Journal of Molecular Sciences. — 2023b. — V. 24, № 18. — P. 13850.

159. Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Plant genetic control over infection thread development during legume-*Rhizobium* symbiosis // Symbiosis / Rigobelo E. C. — London: IntechOpen, 2019. — P. 23-52.

160. Tsyganova A.V., Tsyganov V.E., Findlay K.C., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Brewin N.J. Distribution of legume arabinogalactan protein-extensin (AGPE) glycoproteins in symbiotically defective pea mutants with abnormal infection threads // *Cell and Tissue Biology*. — 2009. — V. 3, № 1. — P. 93-102.
161. Van de Velde W., Guerra J.C.P., Keyser A.D., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M., Goormachtig S. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2006. — V. 141, № 2. — P. 711-720.
162. Van de Velde W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Nagy A., Tiricz H., Satiat-Jeunemaître B., Alunni B., Bourge M., Kucho K.-i., Abe M., Kereszt A., Maroti G., Uchiumi T., Kondorosi E., Mergaert P. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis // *Science*. — 2010. — V. 327, № 5969. — P. 1122-1126.
163. van Rhijn P., Vanderleyden J. The *Rhizobium*-plant symbiosis // *Microbiological Reviews*. — 1995. — V. 59, № 1. — P. 124-142.
164. van Spronsen P.C., Grønlund M., Bras C.P., Spaink H.P., Kijne J.W. Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 7. — P. 839-847.
165. VandenBosch K.A., Bradley D.J., Knox J.P., Perotto S., Butcher G.W., Brewin N.J. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots // *The EMBO Journal*. — 1989. — V. 8, № 2. — P. 335-341.
166. Vasse J., de Billy F., Camut S., Truchet G. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules // *Journal of Bacteriology*. — 1990. — V. 172, № 8. — P. 4295-4306.
167. Verhertbruggen Y., Walker J.L., Guillon F., Scheller H.V. A comparative study of sample preparation for staining and immunodetection of plant cell walls by light microscopy // *Frontiers in Plant Science*. — 2017. — V. 8. — P. 1505.

168. Vernié T., Moreau S., de Billy F., Plet J., Combiér J.-P., Rogers C., Oldroyd G., Frugier F., Niebel A., Gamas P. EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula* // *The Plant Cell*. — 2008. — V. 20, № 10. — P. 2696-2713.

169. Vincken J.-P., Schols H.A., Oomen R.J., McCann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G., Visser R.G. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture // *Plant Physiology*. — 2003. — V. 132, № 4. — P. 1781-1789.

170. Voroshilova V.A., Boesten B., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Priefer U.B. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 4. — P. 471-476.

171. Voroshilova V.A., Demchenko K.N., Brewin N.J., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads // *New Phytologist*. — 2009. — V. 181, № 4. — P. 913-923.

172. Wang D., Dong X. A highway for war and peace: The secretory pathway in plant-microbe interactions // *Molecular Plant*. — 2011. — V. 4, № 4. — P. 581-587.

173. Wang J., Ling L., Cai H., Guo C. Gene-wide identification and expression analysis of the PME1 family genes in soybean (*Glycine max*) // *3 Biotech*. — 2020. — V. 10, № 8. — P. 335.

174. Wang L., Gao Y., Wang S., Zhang Q., Yang S. Genome-wide identification of PME genes, evolution and expression analyses in soybean (*Glycine max* L.) // *BMC Plant Biology*. — 2021. — V. 21, № 1. — P. 578.

175. Wang T., Park Y.B., Caporini M.A., Rosay M., Zhong L., Cosgrove D.J., Hong M. Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2013. — V. 110, № 41. — P. 16444-16449.

176. Willats W.G., Steele-King C.G., Marcus S.E., Knox J.P. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation // *The Plant Journal*. — 1999. — V. 20, № 6. — P. 619-628.

177. Wilmowicz E., Kućko A., Alché J.D.D., Czeszewska-Rosiak G., Florkiewicz A.B., Kapusta M., Karwaszewski J. Remodeling of cell wall components in root nodules and flower abscission zone under drought in yellow lupine // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — V. 23, № 3. — P. 1680.

178. Wisniewski J.-P., Rathbun E.A., Knox J.P., Brewin N.J. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule Initiation by *Rhizobium leguminosarum* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2000. — V. 13, № 4. — P. 413-420.

179. Wolf S., Greiner S. Growth control by cell wall pectins // *Protoplasma*. — 2012. — V. 249, № 2. — P. 169-175.

180. Wolf S., Mouille G., Pelloux J. Homogalacturonan methylesterification and plant development // *Molecular Plant*. — 2009. — V. 2, № 5. — P. 851-860.

181. Wormit A., Usadel B. The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs) // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2018. — V. 19, № 10. — P. 2878.

182. Xie F., Murray J.D., Kim J., Heckmann A.B., Edwards A., Oldroyd G.E.D., Downie J.A. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2012. — V. 109, № 2. — P. 633-638.

183. Yang L., El Msehli S., Benyamina S., Lambert A., Hopkins J., Cazareth J., Pierre O., Hérouart D., Achi-Smiti S., Boncompagni E., Frenedo P. Glutathione deficiency in *Sinorhizobium meliloti* does not impair bacteroid differentiation but induces early senescence in the interaction with *Medicago truncatula* // *Frontiers in Plant Science*. — 2020. — V. 11, № 137.

184. Zgadzaj R., James E.K., Kelly S., Kawaharada Y., de Jonge N., Jensen D.B., Madsen L.H., Radutoiu S. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria // *PLOS Genetics*. — 2015. — V. 11, № 6. — P. e1005280.
185. Zipfel C., Oldroyd G.E.D. Plant signalling in symbiosis and immunity // *Nature*. — 2017. — V. 543. — P. 328-336.
186. Долгих Е.А., Кириенко А.Н., Леппянен И.В., Долгих А.В. Роль фитогормонов в контроле развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. Сообщение II. Ауксины // *Сельскохозяйственная биология*. — 2016а. — V. 51, № 5. — P. 585-592.
187. Долгих Е.А., Кириенко А.Н., Леппянен И.В., Долгих А.В. Роль фитогормонов в контроле развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. Сообщение I. Цитокинины // *Сельскохозяйственная биология*. — 2016б. — V. 51, № 3. — P. 285-298.
188. Иванова К.А., Цыганов В.Е. Антиоксидантная система защиты в симбиотических клубеньках бобовых растений (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. — 2017. — Т. 52, № 5. — С. 878-894.
189. Цыганов В.Е., Селиверстова Е.В., Ворошилова В.А., Цыганова А.В., Павлова З.Б., Лебский В.К., Борисов А.Ю., Бревин Н.Д., Тихонович И.А. Анализ двойных мутантных линий для определения последовательности функционирования генов гороха (*Pisum sativum* L.) *Sym13*, *Sym33* и *Sym40* во время развития симбиотического клубенька // *Экологическая генетика*. — 2010. — Т. 8, № 2. — С. 3-8.
190. Цыганов В.Е., Цыганова А.В., Ворошилова В.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Анализ взаимодействия симбиотических генов гороха (*Pisum sativum* L.) *Sym33* и *Sym42*, мутации в которых приводят к аномалиям в развитии инфекционных нитей // *Экологическая генетика*. — 2012. — V. 10, № 4. — P. 50-55.
191. Цыганова А.В., Иванова К.А., Цыганов В.Е. Гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков мутанта гороха (*Pisum sativum*)

SGEFix<sup>-5</sup> по гену *Sym33*, кодирующему транскрипционный фактор PsCYCLOPS/PsIPD3 // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17, № 1. — С. 65-70.

192. Цыганова А.В., Китаева А.Б., Бревин Н.Д., Цыганов В.Е. Клеточные механизмы развития симбиотических клубеньков у бобовых растений (обзор) // Сельскохозяйственная биология. — 2011. № 3. — Р. 34-40.

193. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями // Успехи современной биологии. — 2012. — Т. 132, № 2. — С. 211-222.

194. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. Сообщение I. Этилен (обзор) // Сельскохозяйственная биология. — 2015. — Т. 50, № 3. — С. 267-277.

195. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. II. Салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты // Сельскохозяйственная биология. — 2018. — Т. 53, № 1. — С. 3-14.

196. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Организация эндоплазматического ретикулула в клетках эффективных и неэффективных клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) // Экологическая генетика. — 2019а. — Т. 17, № 4. — С. 5-14.

197. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Растительная клеточная стенка в симбиотических взаимодействиях. Пектины // Сельскохозяйственная биология. — 2019б. — Т. 54, № 3. — С. 446-457.

198. Цыганова А.В., Цыганов В.Е., Борисов А.Ю., Тихонович И.А., Бревин Н.Д. Сравнительный цитохимический анализ распределения перекиси водорода у неэффективного мутанта гороха SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40*) и исходной линии SGE // Экологическая генетика. — 2009. — Т. 7, № 3. — С. 3-9.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Я выражаю самую искреннюю и глубокую благодарность научному консультанту — Виктору Евгеньевичу Цыганову за многолетнее руководство и направление исследований как заведующего лабораторией, где я работаю, за критическое прочтение моих статей и диссертации. Я выражаю глубокую благодарность профессору Николасу Бревину (Центр Джона Иннеса, Великобритания), во многом благодаря которому и состоялась настоящая работа.

Я выражаю огромную благодарность всем преподавателям биологического факультета Казахского национального университета и прежде всего кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии. Особенную благодарность я выражаю одному из моих научных руководителей Тамаре Минажевне Шалахметовой, которая научила меня не сдаваться в научном поиске.

Я крайне признательна сотрудникам моей первой научной лаборатории, лаборатории электронной микроскопии в Научном центре хирургии, Евгению Леонидовичу Зумерову, Алексею Ивановичу Жарикову, Нине Ефимовне Жирновой и Анастасии Михайловне Соколовой, которые открыли для меня мир микроскопии и научного поиска. Я крайне признательна за многолетнее руководство и дружбу Галине Васильевне Федотовских, открывшей для меня красоту и логичность морфологии.

Я выражаю глубокую благодарность зарубежным коллегам Питеру Кало, Уорду Капоену, Анне Хекманн и Энн Эдвардс за сотрудничество и создание теплой обстановки во время работы в лаборатории растительно-микробных отношений в Центре Джона Иннеса под руководством Джайлса Олдройда и Аллана Дауни. Огромную благодарность я приношу и техническим сотрудникам отдела клеточной биологии Центра Джона Иннеса Ким Финдли, Гранту Калдеру и Сью Банневелл за помощь в освоении новых методик.



Я признательна коллегам, с которыми я имела удовольствие трудиться в рамках лабораторий молекулярной и клеточной биологии, прежде всего: Елене Валентиновне Селиверстовой, Анне Борисовне Китаевой, Татьяне Александровне Серовой, Кире Андреевне Ивановой, Петру Глебовичу Кусакину, Артемию Павловичу Горшкову и всем другим.

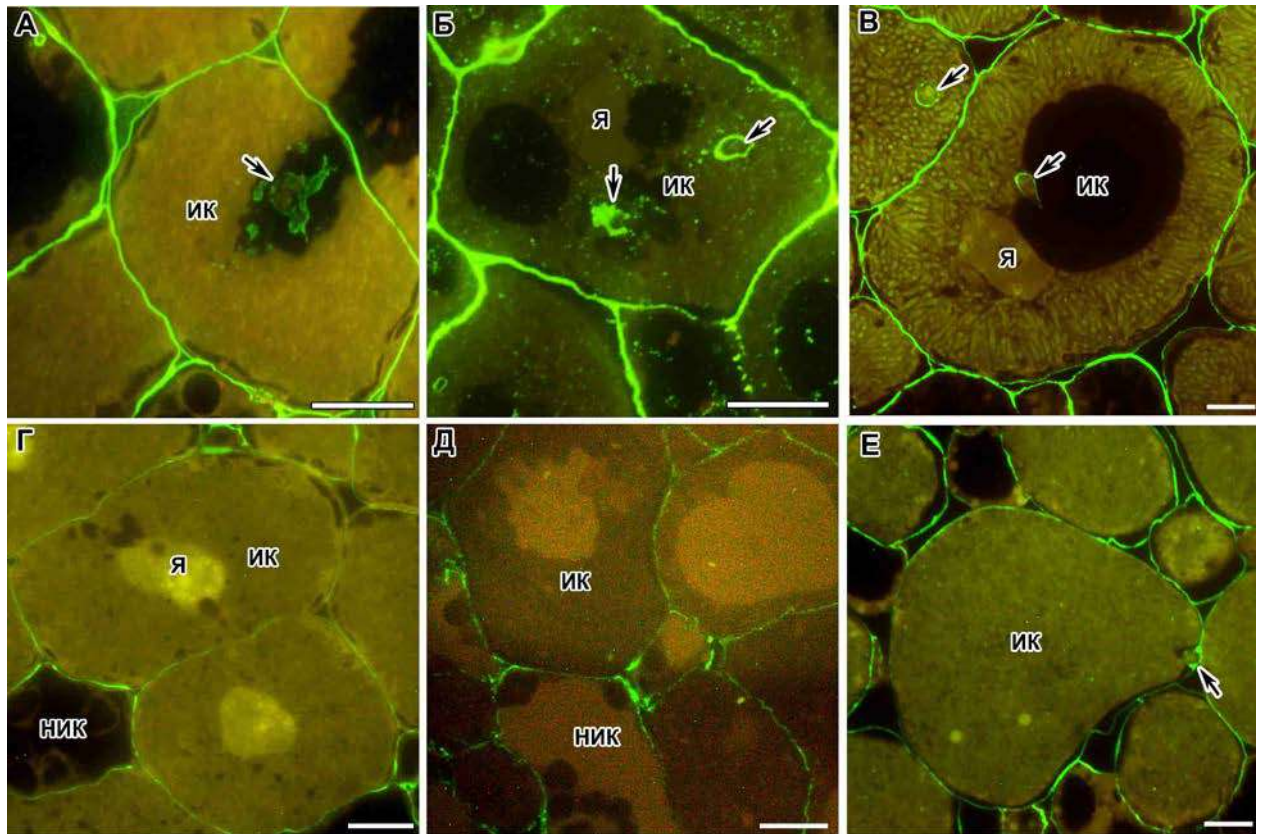
Я выражаю искреннюю благодарность Кириллу Николаевичу Демченко, благодаря бесценному опыту которого были проведены некоторые исследования, а также же за критические замечания, которые помогли сделать мою работу лучше.

Я выражаю искреннюю благодарность сотрудникам ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», особенно Александре Николаевне Ивановой, Максиму Германовичу Воробьеву и Ярославу Геннадьевичу Борисову, которые обеспечивали максимально удобную работу в центре, где проводилась большая часть исследований.

Я бесконечно благодарна своим родителям Виктору Георгиевичу Невердовскому, памяти которого я посвящаю свою работу, и Жанне Анатольевне Светышевой, которая не только дарила меня своей любовью и заботой, но и открыла мне дорогу в науку.

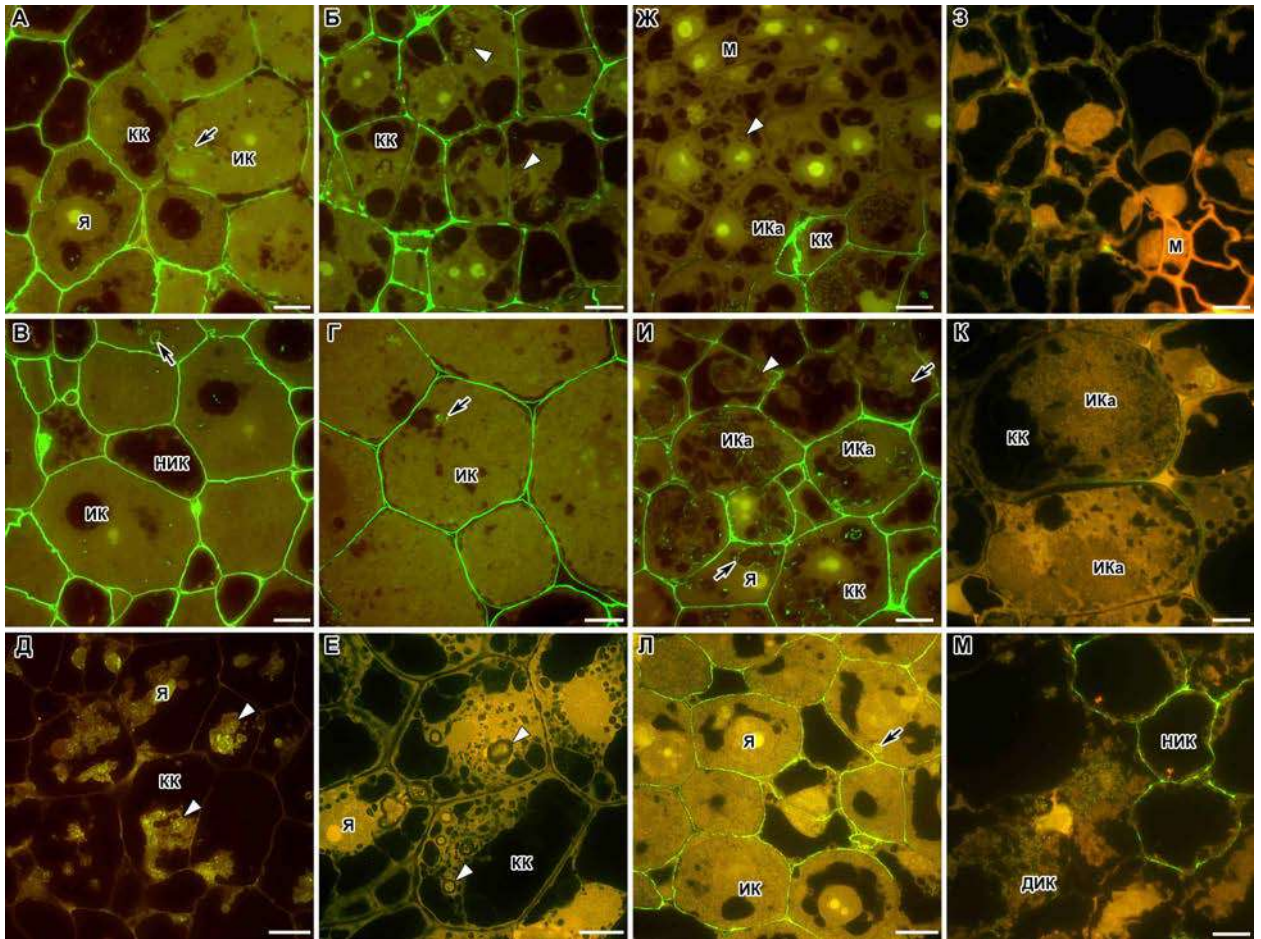
Я безмерно признательна моему супругу за всестороннюю заботу и любовь, которые он дарит мне ежедневно. Я благодарна моим детям Валентине и Юрию за то, что они есть у меня.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А



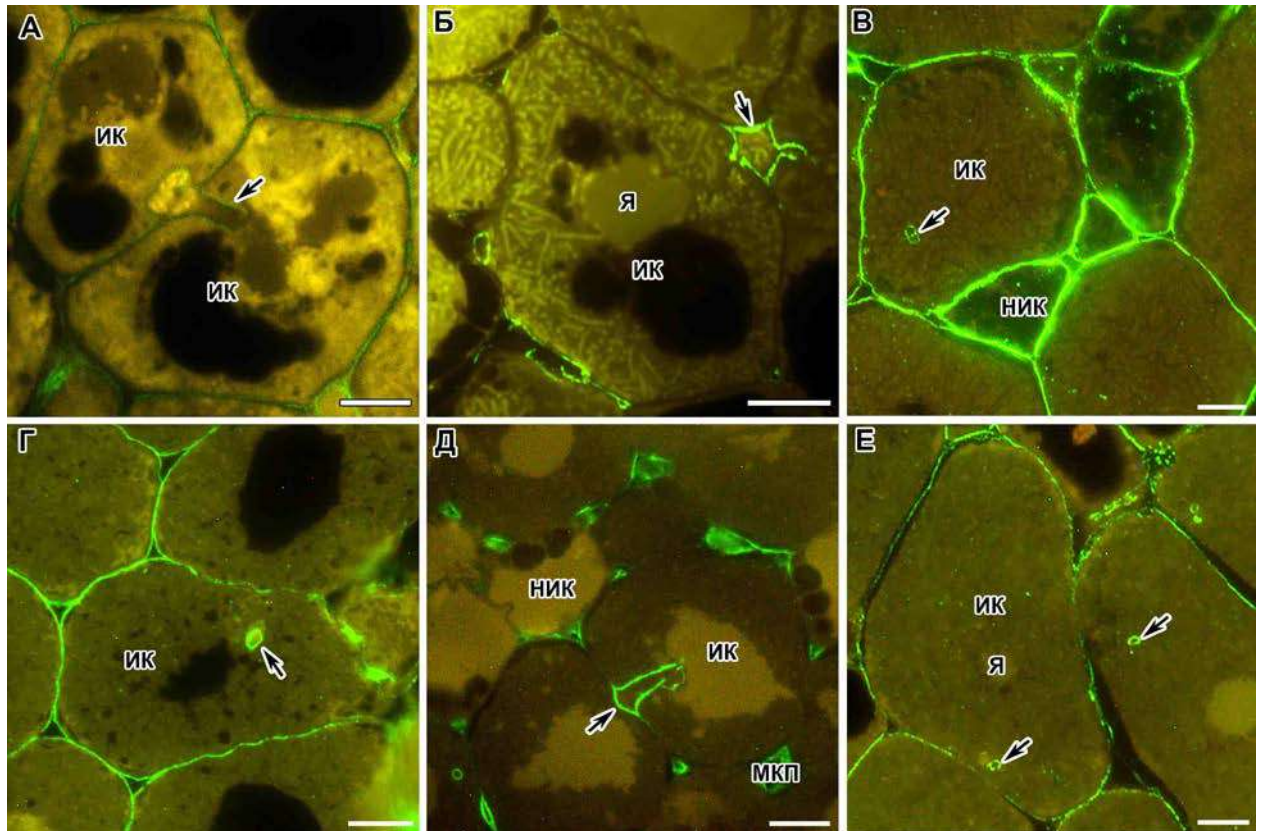
Флуоресцентная иммунолокализация с антителом ЛМ7 в клубеньках *Pisum sativum* (А), *Medicago truncatula* (Б), *Galega orientalis* (В), *Vavilovia formosa* (Г), *Vicia villosa* (Д) и *Glycine max* (Е). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, Я — ядро; стрелки указывают на инфекционные нити. Масштаб = 20 мкм (А, Б), 10 мкм (В-Е).

**Рисунок А.1— Высокометилэтерифицированный гомогалактуронан в клубеньках Бобовых**



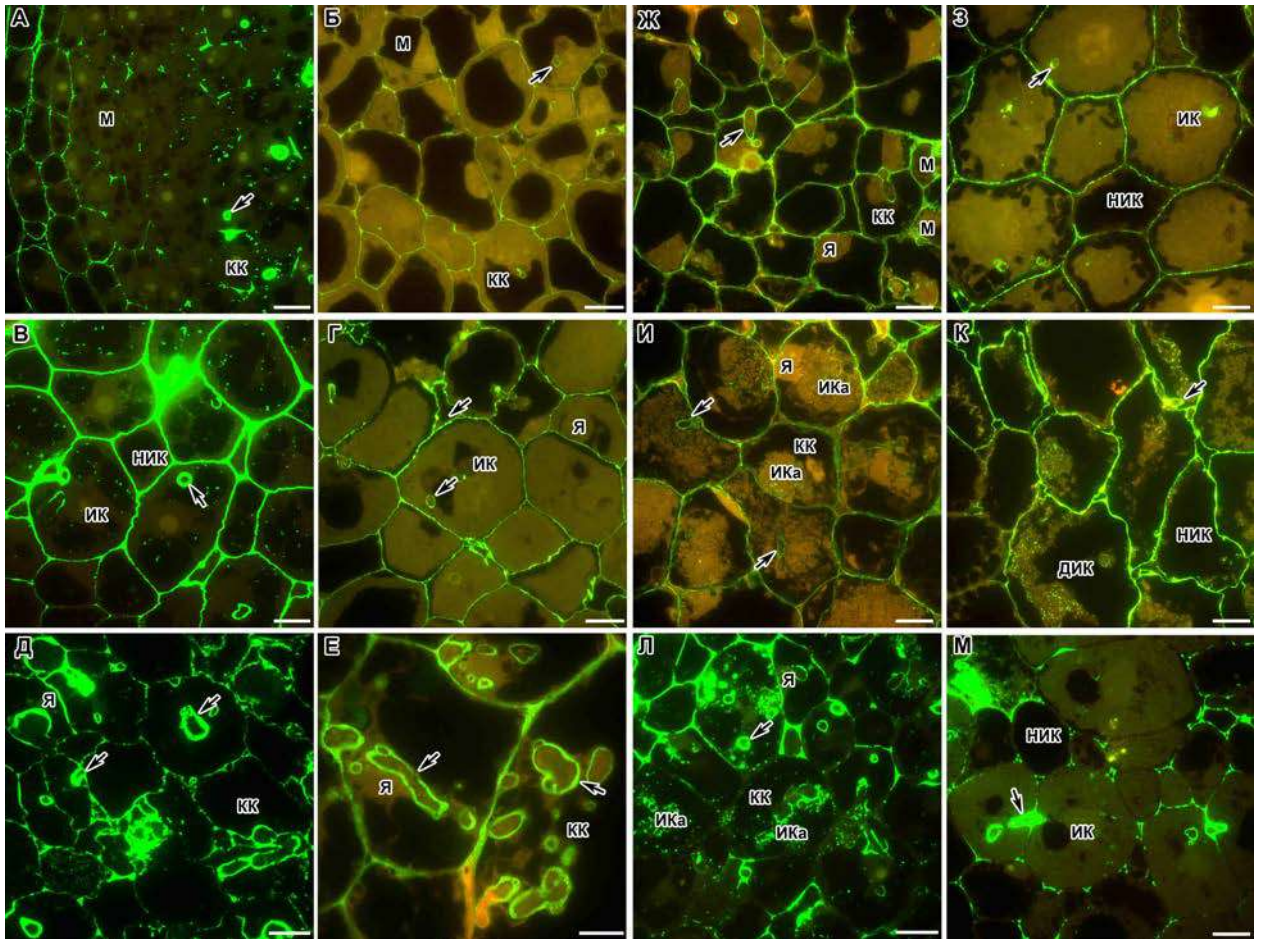
Флуоресцентная иммулокализация с антителом LM20 в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* (Б, Г, Е, З, К-М), *Medicago truncatula* (А, В, Д, Ж, И). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. (А) Зона инфекции в клубеньках дикого типа A17. (Б) Зона инфекции в клубеньках дикого типа SGE. (В) Зона азотфиксации в клубеньках дикого типа A17. (Г) Зона азотфиксации в клубеньках дикого типа SGE. (Д) Колонизированные клетки мутанта TR3 (*Mtipd3*). (Е) Колонизированные клетки мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*). (Ж) Меристема мутанта *Mtefd-1*. (З) Меристема мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). (И) Зона инфекции мутанта *Mtefd-1*. (К) Зона инфекции мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). (Л) Зона, соответствующая зоне азотфиксации у дикого типа, у мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*). (М) Зона старения мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*). М — меристематическая клетка, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, КК — колонизированная клетка, ДИК — деградирующая инфицированная клетка, ИКа — инфекционная капля, Я — ядро; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники — на инфекционные нити без сигнала. Масштаб = 10 мкм.

**Рисунок А.2— Высокометилэтерифицированный гомогалактуронан в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* и *Medicago truncatula***



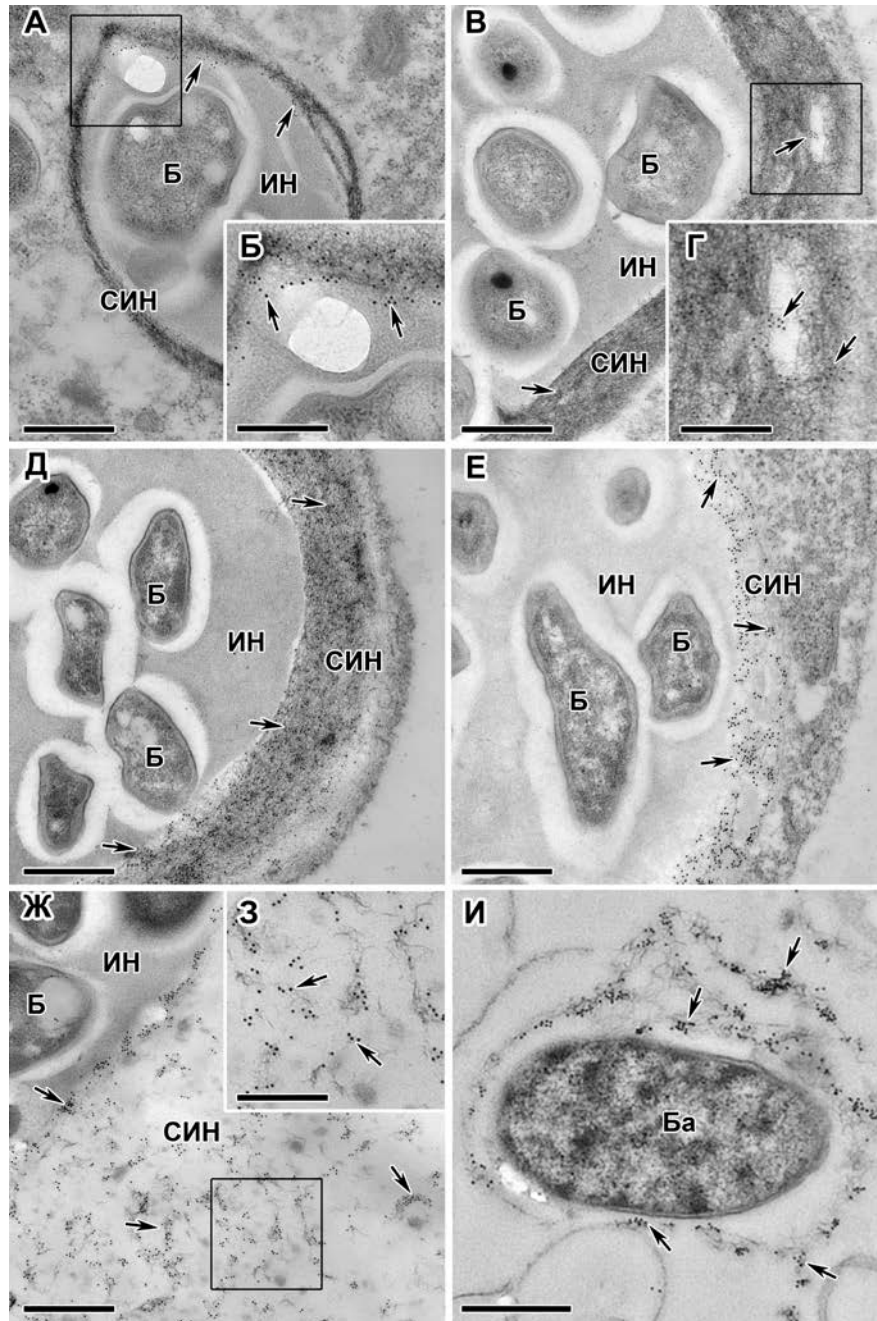
Флуоресцентная иммунолокализация с антителом JIM5 в клубеньках *Pisum sativum* (А), *Medicago truncatula* (Б), *Galega orientalis* (В), *Vavilovia formosa* (Г), *Vicia villosa* (Д) и *Glycine max* (Е). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, Я — ядро, МКП — межклеточное пространство; стрелки указывают на инфекционные нити. Масштаб = 20 мкм (А, Б), 10 мкм (В-Е).

**Рисунок А.3— Низкометилэтерифицированный гомогалактуронан в клубеньках Бобовых**



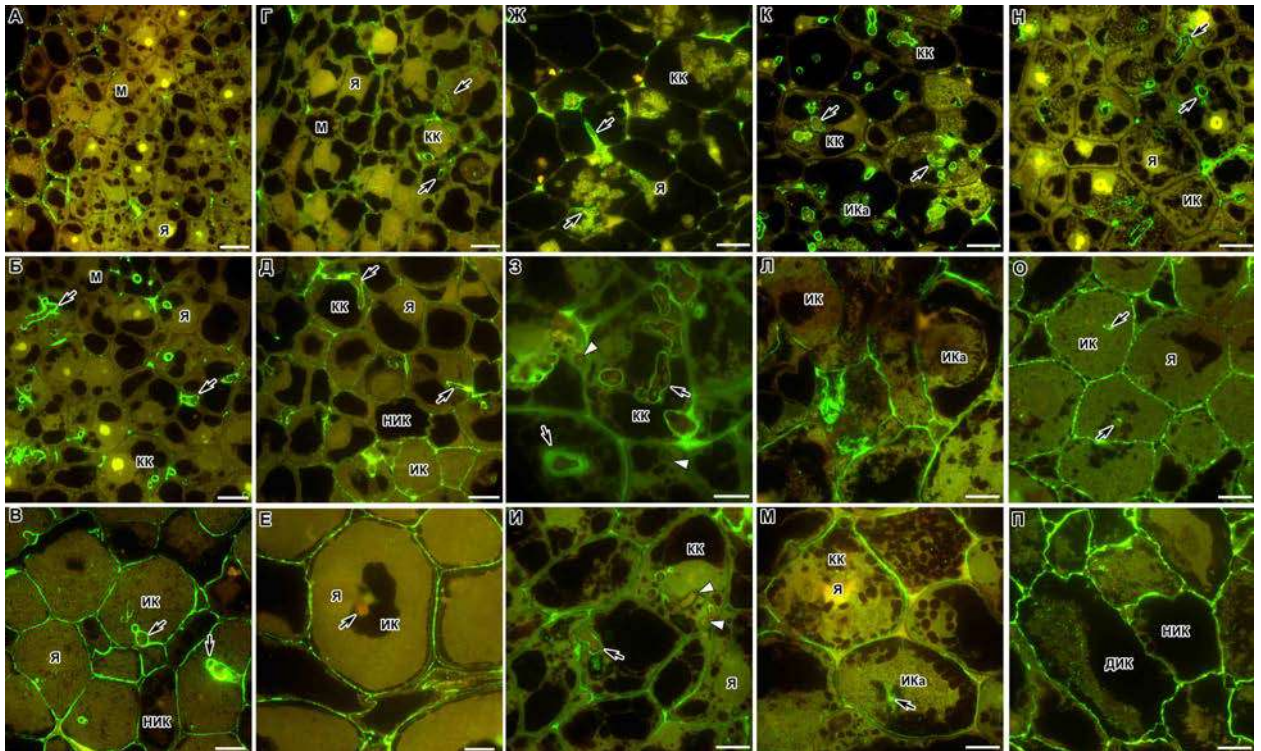
Флуоресцентная иммулокализация с антителом LM19 в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* (Б, Г, Е-К), *Medicago truncatula* (А, В, Д, Л, М). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. (А) Меристема и зона инфекции в клубеньках дикого типа A17. (Б) Меристема и зона инфекции в клубеньках дикого типа SGE. (В) Зона азотфиксации в клубеньках дикого типа A17. (Г) Зона азотфиксации в клубеньках дикого типа SGE. (Д) Колонизированные клетки мутанта TR3 (*Mtipd3*). (Е) Колонизированные клетки мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*). (Ж) Меристема и ранняя зона инфекции мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). (З) Зона, соответствующая зоне азотфиксации у дикого типа, у мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*sym26*). (И) Зона инфекции мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). (К) Зона старения мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*). (Л) Зона инфекции мутанта *Mtefd-1*. (М) Зона инфекции мутанта *Mtdnf1-1*. М — меристематическая клетка, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, КК — колонизированная клетка, ДИК — деградирующая инфицированная клетка, ИКа — инфекционная капля, Я — ядро; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники — на инфекционные нити без сигнала. Масштаб = 10 мкм.

**Рисунок А.4— Низкометилэтерифицированный гомогалактуронан в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* и *Medicago truncatula***



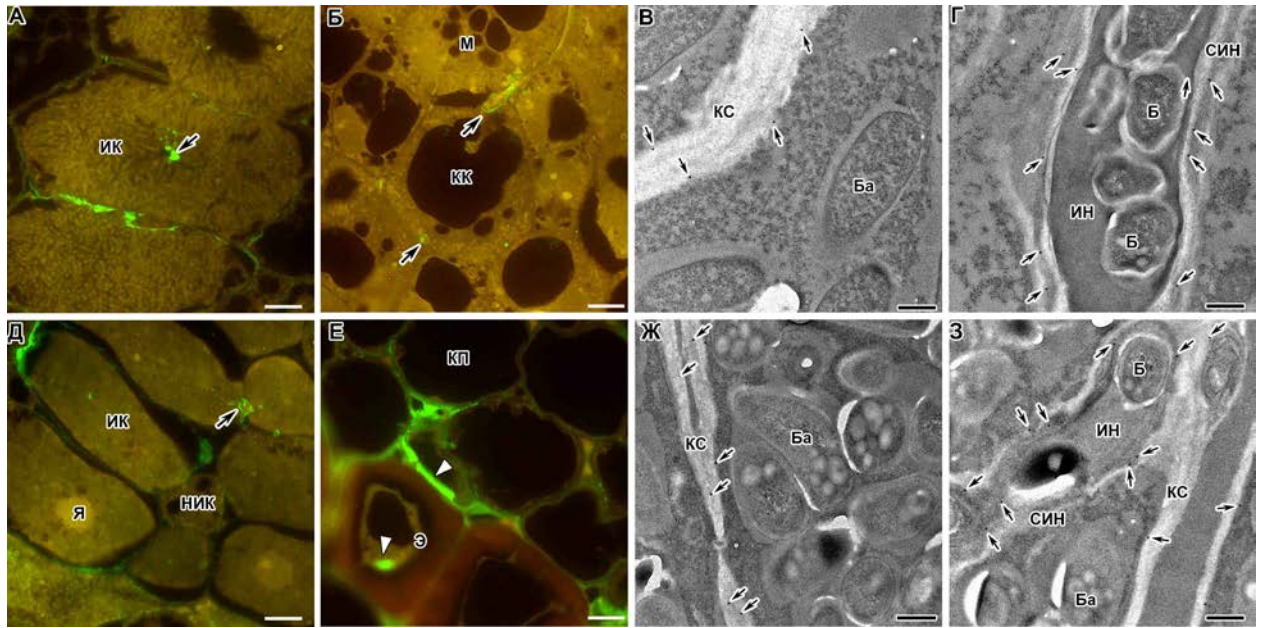
Иммуноэлектронная локализация с антителом JIM5 в 2-недельных клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum*. В качестве вторичных антител использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм. (А, Б) Дикий тип SGE. (Б) Большое увеличение области в рамке на (А). (В, Г) Мутант SGEFix<sup>-</sup>2 (*Pssym33-3*). (Г) Большое увеличение области в рамке на (В). (Д) Двойной мутант RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*). (Е) Двойной мутант RBT4 (*Pssym33-3*, *Pssym42*). (Ж, З, И) Мутант RisFixV (*Pssym42*). (З) Большое увеличение области в рамке на (Ж). (И) Бактероид в дегенерирующей инфицированной клетке. ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, Ба — бактериоид; стрелки указывают на частицы золота. Масштаб = 500 нм (А, В, Д, Е, И), = 200 нм (Б, Г, З).

**Рисунок А.5— Низкометилэтерифицированный гомогалактуронан в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum***



Флуоресцентная иммулокализация с антителом 2F4 в клубеньках дикого типа и мутантов *Medicago truncatula* (А-В,Ж,К,Н) и *Pisum sativum* (Г-Е,З,И,Л,М,О,П). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к мышинному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. (А) Меристема дикого типа А17; (Б) Зона инфекции дикого типа А17; (В) Зона азотфиксации дикого типа А17; (Г) Меристема дикого типа SGE; (Д) Зона инфекции дикого типа SGE; (Е) Зона азотфиксации дикого типа SGE; (Ж) Колонизированные клетки мутанта TR3 (*Mtipd3*); (З, И) Колонизированные клетки мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*); (К) Зона инфекции мутанта *Mtefd-1*; (Л) Ранняя зона инфекции мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*); (М) Поздняя зона инфекции мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*); (Н) Зона инфекции мутанта *Mtdnf1-1*; (О) Зона, соответствующая зоне азотфиксации дикого типа, мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*); (П) Зона старения мутанта SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*). М — меристематическая клетка, КК — колонизированная клетка, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, ДИК — деградирующая инфицированная клетка, Я — ядро, ИКа — инфекционная капля; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники — на инфекционные нити с отсутствием сигнала. Масштаб = 10 мкм.

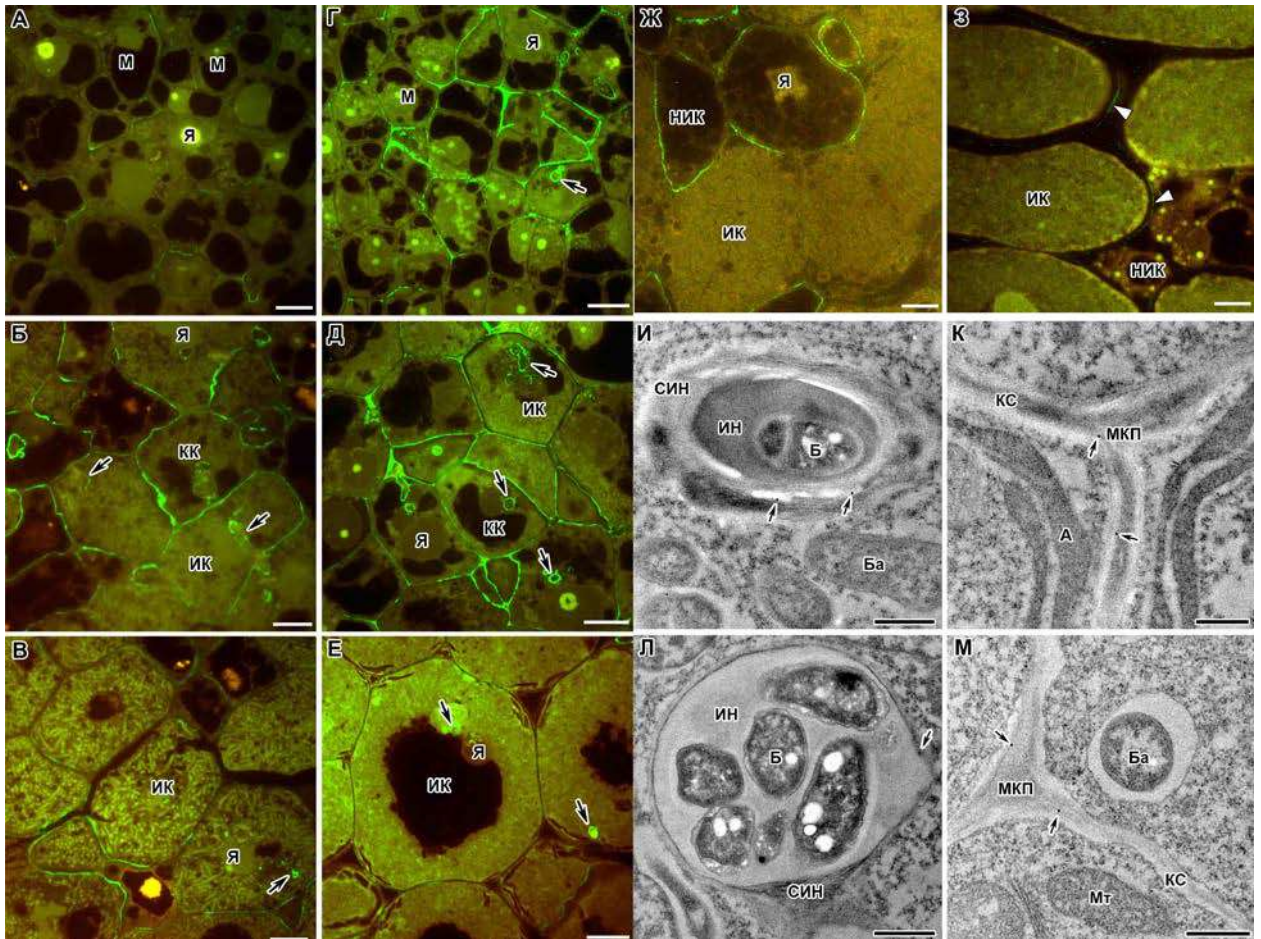
**Рисунок А.6— Димерная ассоциация цепей гомогалактуронана с помощью ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* и *Medicago truncatula***



Флуоресцентная иммунолокализация (А,Б,Д,Е) и иммуноэлектронная локализация (В,Г,Ж,З) с антителом 2F4 в клубеньках *Galega orientalis* (А-Г) и *Glycine max* (Д-З). В качестве вторичного антитела использованы козы антитела к мышиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488 (А,Б,Д,Е) и конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм (В,Г,Ж,З). (А) Инфицированные клетки из зоны азотфиксации. (Б) Колонизированные клетки из ранней зоны инфекции. (В,Ж) Клеточные стенки инфицированных клеток. (Г,З) Инфекционные нити. (Д) Инфицированные клетки. (Е) Эндодерма. Э — эндодермальная клетка, КП — клетки клубеньковой паренхимы, М — меристематическая клетка, КК — колонизированная клетка, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, Я — ядро, КС — клеточная стенка, ИН — инфекционная нить, СИИ — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, Ба — бактериод; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники — на сигнал, маленькие стрелки — на частицы золота. Масштаб = 10 мкм (А,Б,Д,Е), = 500 нм (В,Г,Ж,З).

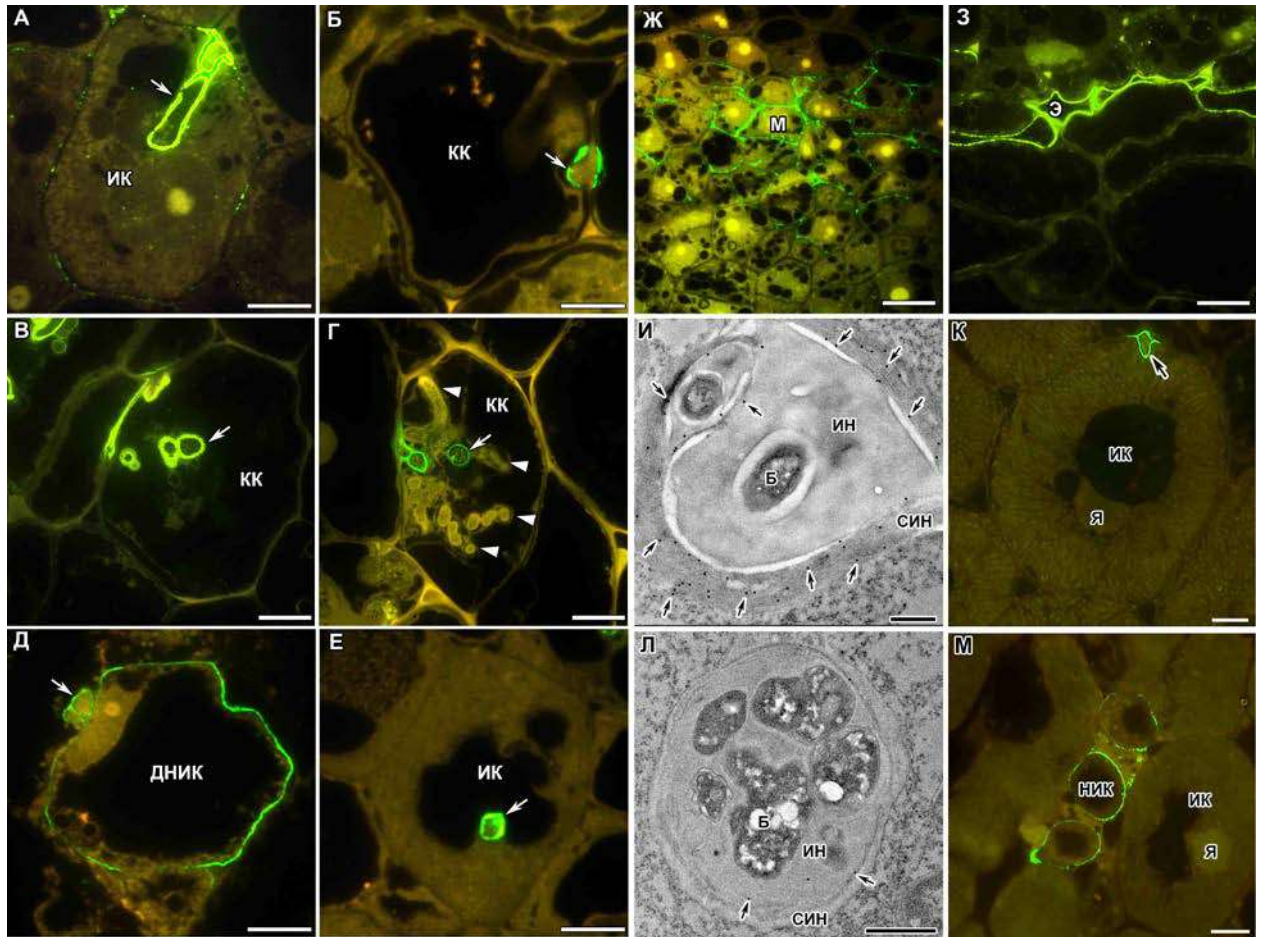
**Рисунок А.7— Димерная ассоциация цепей гомогалактуронана с помощью ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клубеньках *Galega orientalis* и *Glycine max***





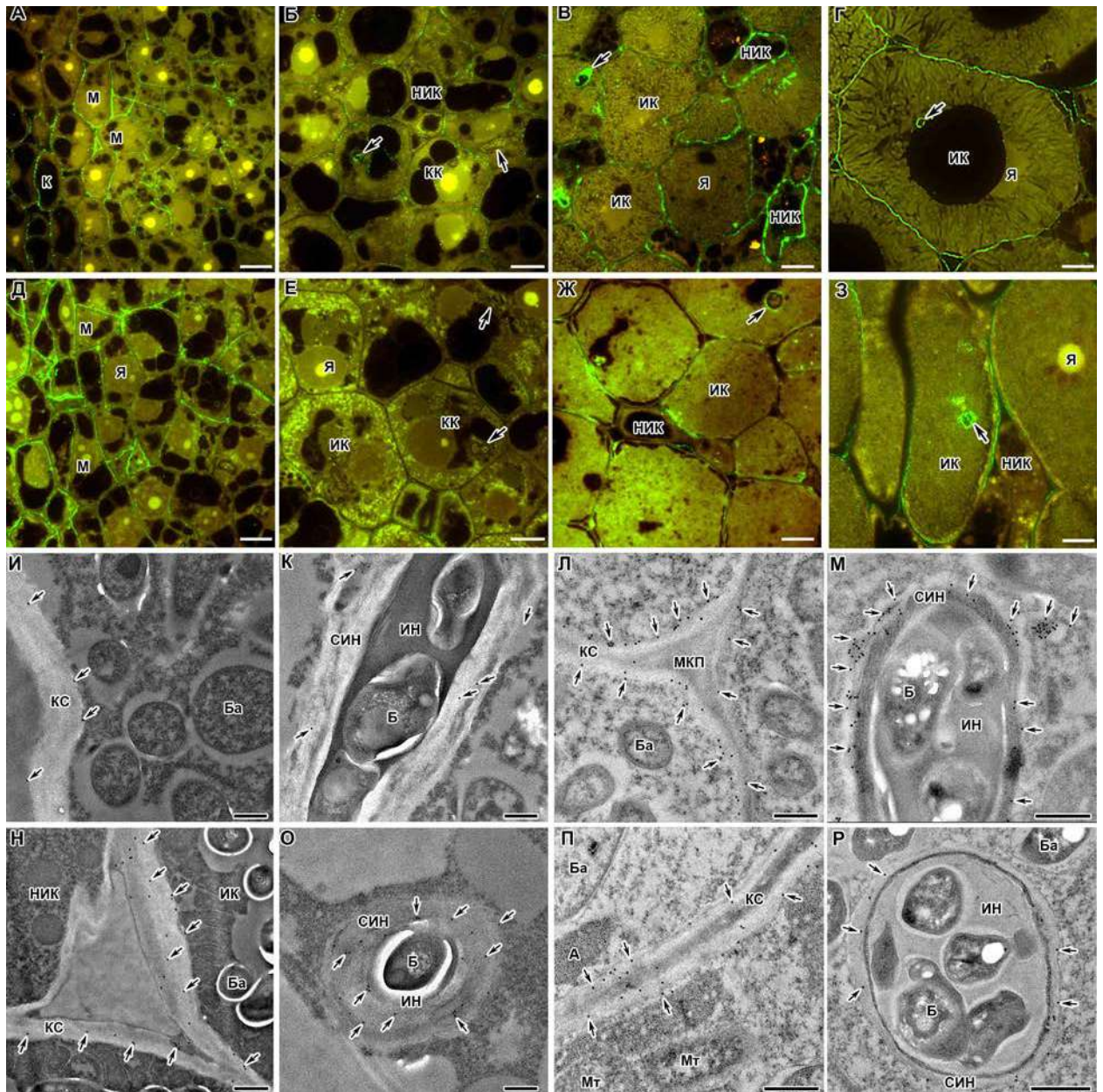
Флуоресцентная иммулокализация на полутонких срезах (А-З) и иммуноэлектронная локализация (И-М) с антителом ССРС-М36 в клубеньках *Medicago truncatula* (А-В), *Pisum sativum* (Г-Е), *Galega orientalis* (Ж), *Glycine max* (З), *Vavilovia formosa* (И,К) и *Vicia villosa* (Л,М). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к мышинному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488 (А-З) и конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм (И-М). (А,Г) Меристема. (Б,Д) Зона инфекции. (В,Е,Ж) Зона азотфиксации. (З) Инфицированные клетки. (И,Л) Инфекционные нити. (К,М) Клеточные стенки инфицированных клеток. М — меристематическая клетка, КК — колонизированная клетка, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, Я — ядро, А — амилопласт, Мт — митохондрия, КС — клеточная стенка, МКП — межклеточное пространство, ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, Ба — бактериоид; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники — на сигнал, маленькие стрелки — на частицы золота. Масштаб = 10 мкм (А-З), = 500 нм (И-М).

**Рисунок А.8— Остов рамногалактуронана I в клубеньках Бобовых**



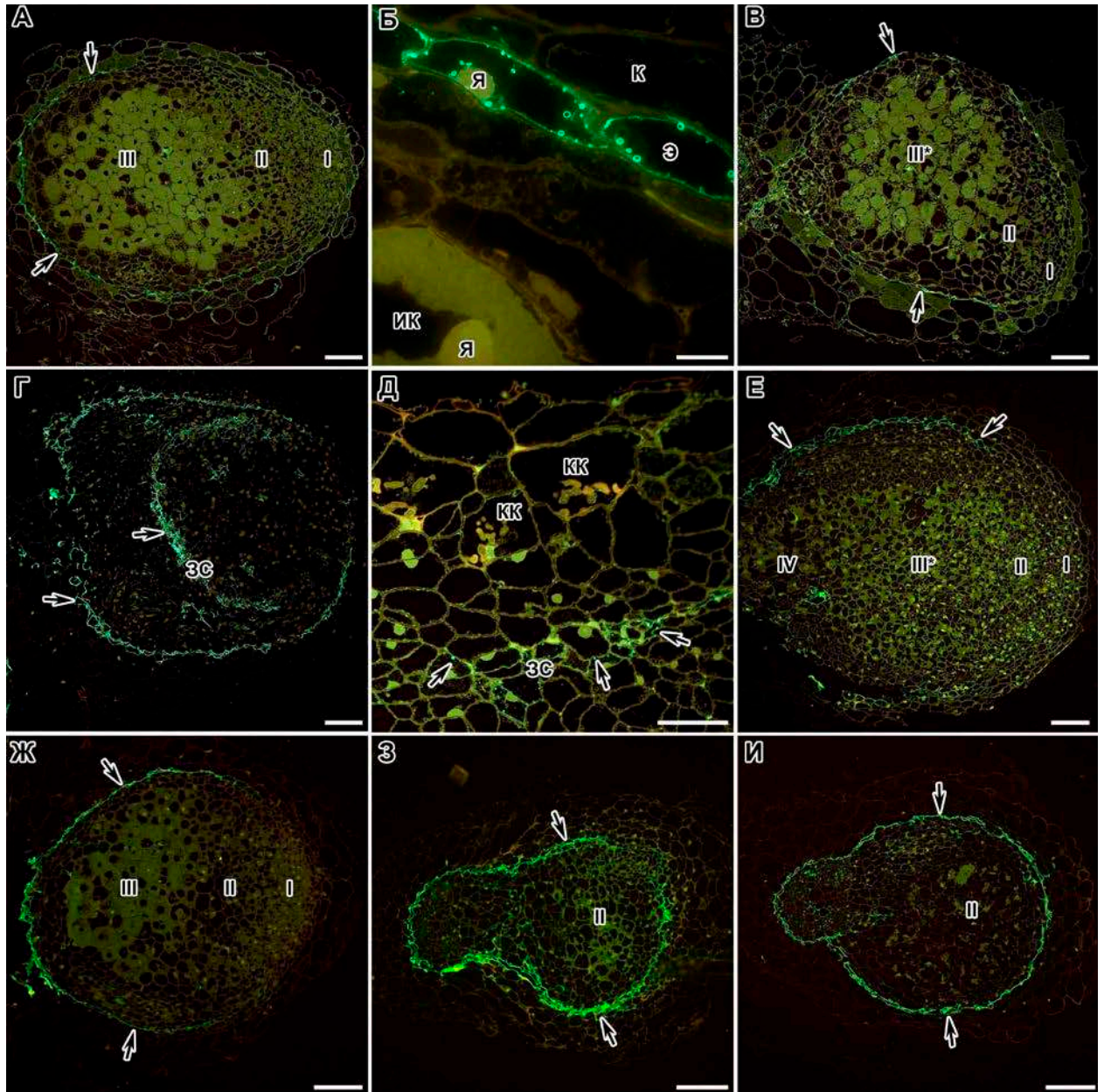
Флуоресцентная иммулокализация (А-З,К,М) и иммуноэлектронная локализация (И,Л) с антителом LM5 в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* (А-Е,З), в клубеньках *Medicago truncatula* (Ж), *Vavilovia formosa* (И), *Galega orientalis* (К), *Vicia villosa* (Л) и *Glycine max* (М). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488 (А-З,К,М) и конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм (И,Л). (А) Дикий тип SGE. (Б) Мутант SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) (В, Г) Мутант SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*). (Д) Мутант SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*). (Е) Мутант Sprint-2Fix<sup>-</sup> (*Pssym31*). (Ж) Меристема. (З) Эндодерма. (И,Л) Инфекционные нити. (К) Зона азотфиксации. (М) Неинфицированные клетки. Э — эндодермальная клетка, М — меристематическая клетка, КК — колонизированная клетка, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, ДНИК — деградирующая неинфицированная клетка, ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники — на инфекционные нити, не имеющие метки, маленькие стрелки — на частицы золота. Масштаб = 10 мкм (А-З,К,М), = 500 нм (И,Л).

**Рисунок А.9 — (1→4)-β-D-галактановая боковая цепь рамногалактуронана I в клубеньках Бобовых**



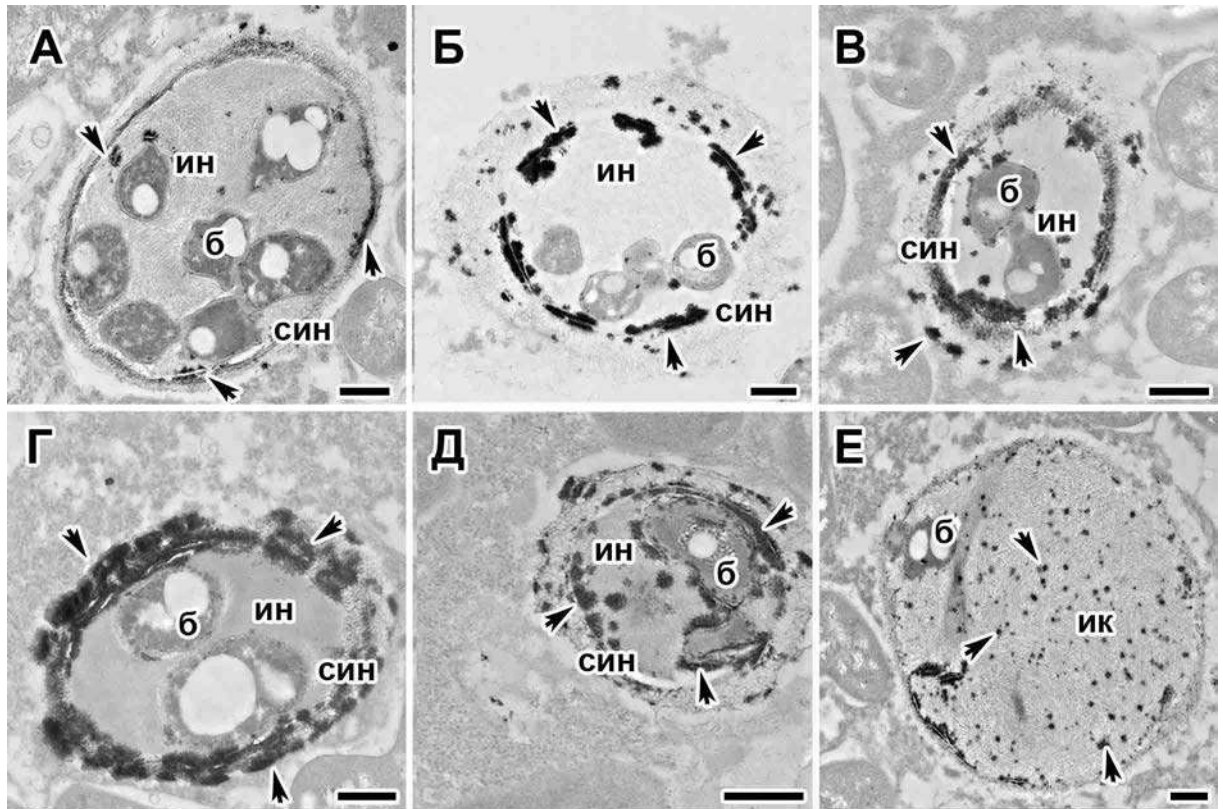
Флуоресцентная иммулокализация (А-З) и иммуноэлектронная локализация (И-Р) с антителом ССРС-М1 в клубеньках *Pisum sativum* (А-В), *Galega orientalis* (Г,И,К), *Medicago truncatula* (Д-Ж), *Glycine max* (З,Н,О), *Vavilovia formosa* (Л,М) и *Vicia villosa* (П,Р). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к мышинному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488 (А-З) и конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм (И-Р). (А,Д) Меристема. (Б,Е) Зона инфекции. (В,Г,Ж) Зона азотфиксации. (З) Инфицированные клетки. (И,Л,Н,П) Клеточные стенки. (К,М,О,Р) Инфекционные нити. К — клетка коры, М — меристематическая клетка, КК — колонизированная клетка, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, Я — ядро, А — амилопласт, Мт — митохондрия, КС — клеточная стенка, ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, Ба — бактериод, стрелки указывают на инфекционные нити, маленькие стрелки — на частицы золота. Масштаб = 10 мкм (А-З), = 500 нм (Л-Н,П,Р), = 200 нм (И,К,О).

**Рисунок А.2— Фукозилированный ксилоглюкан в клубеньках Бобовых**



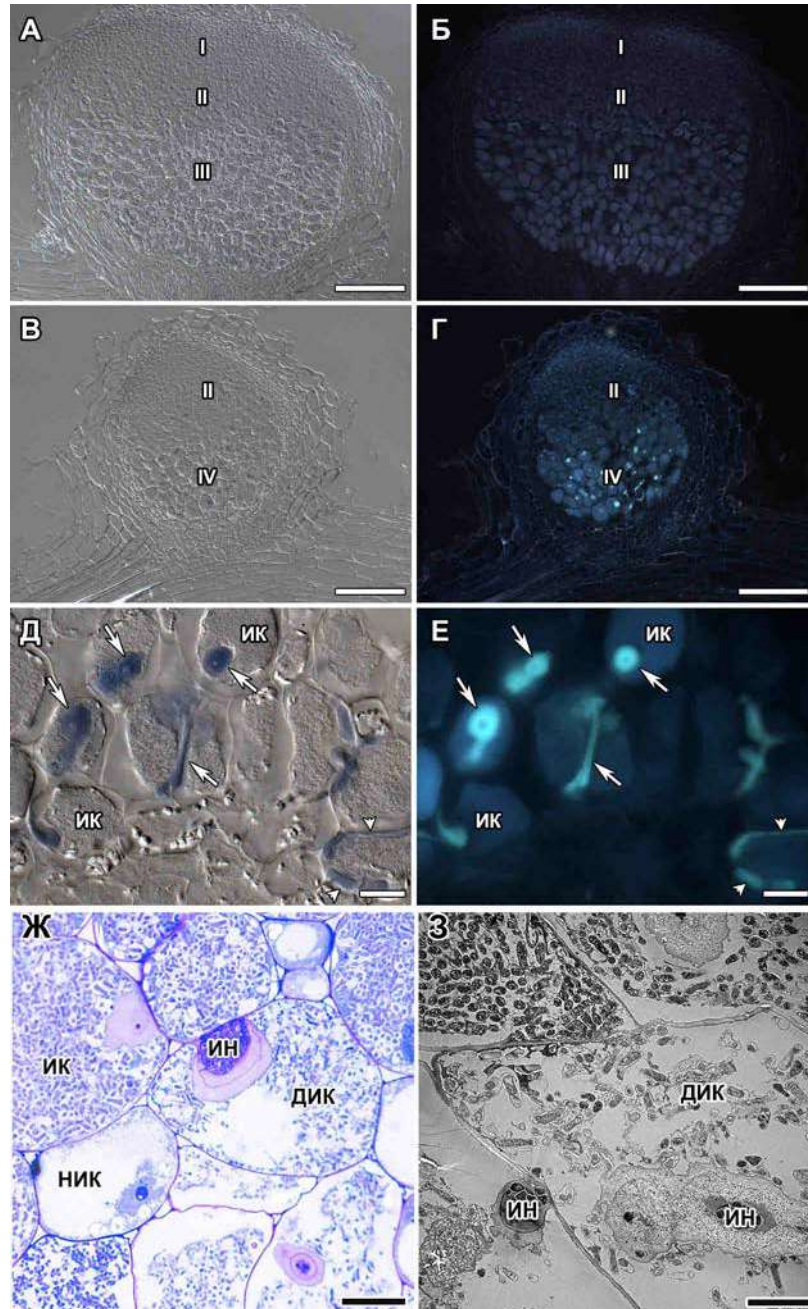
Флуоресцентная иммунолокализация с антителом JIM13 в 2-недельных клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* (А-Е) и *Medicago truncatula* (Ж-И). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. (А,Б) Дикий тип SGE. (В) Мутант SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). (Г,Д) Мутант SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*). (Е) Мутант SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*). (Ж) Дикий тип A17. (З) Мутант *Mtefd-1*. (И) Мутант TR3 (*Mtipd3*). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации, III\* — зона, соответствующая зоне азотфиксации у дикого типа, IV — зона старения, К — клетка коры, Э — эндодермальна клетка, ИК — инфицированная клетка, КК — колонизированная клетка, ЗС — «запирающий слой», Я — ядро, стрелки указывают на метку JIM13. Масштаб = 50 мкм (А,В,Г,Е-И), = 5 мкм (Б), = 50 мкм (Д).

**Рисунок А.3— Арабиногалактановый белок в эндодерме клубеньков дикого типа и мутантов *Pisum sativum* и *Medicago truncatula***



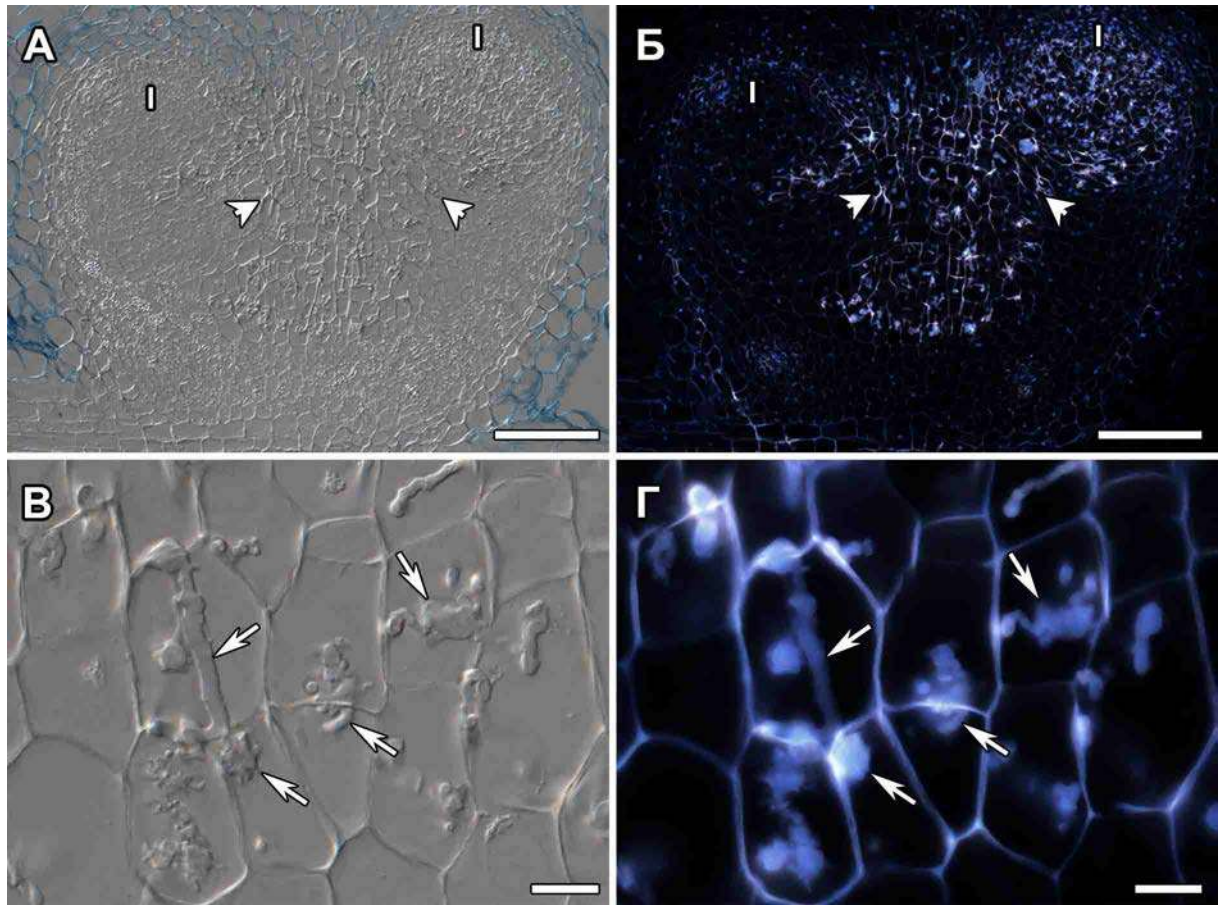
Цитохимическая реакция с хлоридом церия в 2-недельных клубеньках *Pisum sativum* дикого типа SGE. (А) Начальные отложения  $H_2O_2$  на внутренней поверхности стенки инфекционной нити. (Б) Сплошные отложения  $H_2O_2$  на внутренней поверхности стенки инфекционной нити. (В) Появление отложений  $H_2O_2$  на внешней поверхности стенки инфекционной нити. (Г) Полное пропитывание стенки инфекционной нити  $H_2O_2$ . (Д) Появление преципитатов пергидроксида церия в матриксе инфекционных нитей. (Е) Появление преципитатов пергидроксида церия в матрикса инфекционной капли. ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, ИК — инфекционная капля, б — бактерия; стрелки указывают на отложения пергидроксида церия. Масштаб = 500 нм (Б,В,Д), = 200 нм (А,Г,Е).

**Рисунок А.4— Пероксид водорода в стенке инфекционной нити в клубеньках *Pisum sativum* дикого типа SGE**



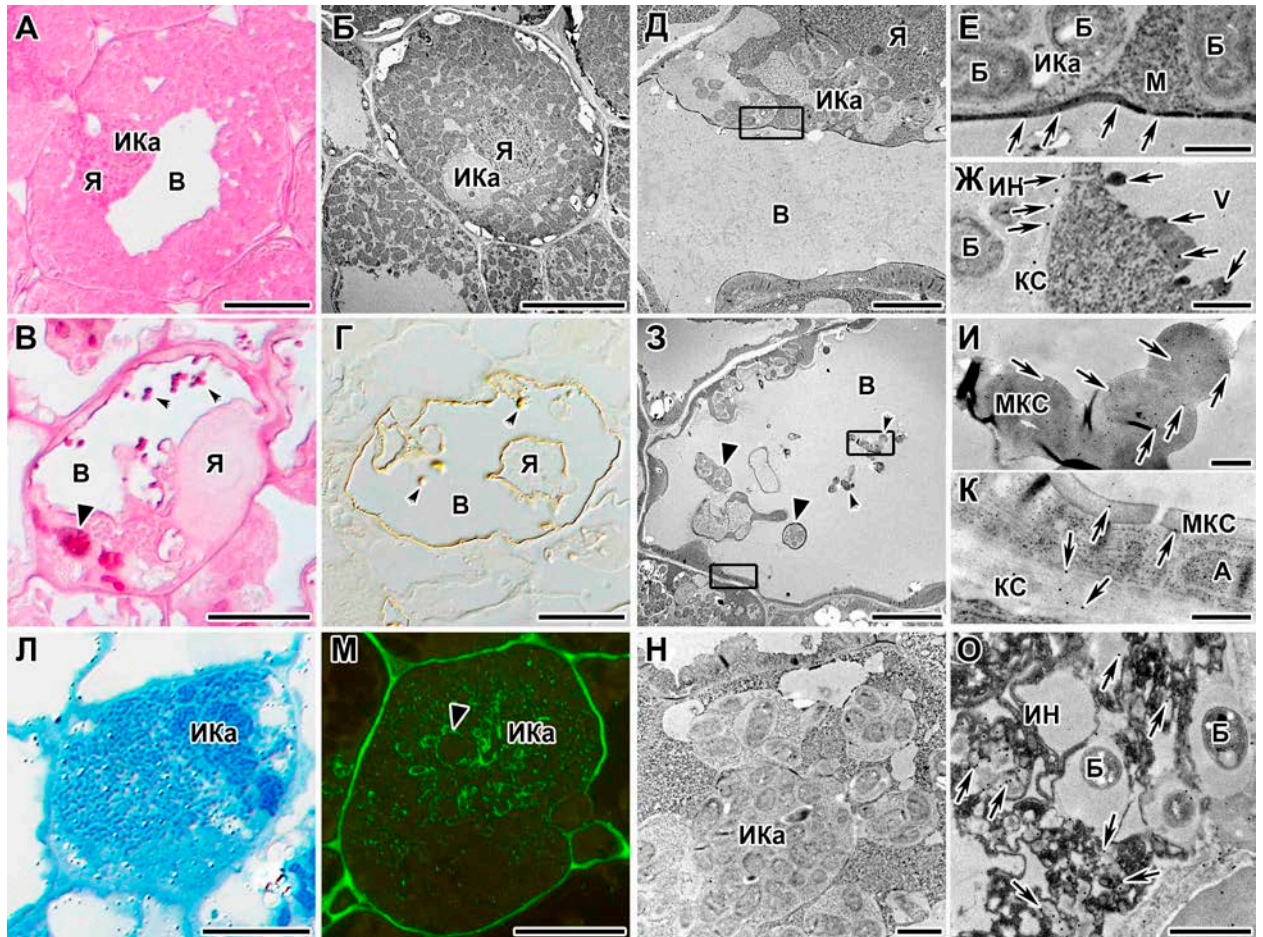
Цитохимическая локализации каллозы (А-Е) в 2-недельных клубеньках *Pisum sativum* дикого типа SGE (А,Б) и мутанта RisFisV (*Pssym42*) (В-З). Окрашивание анилиновым синим (Б,Г,Е), наложение дифференциально-интерференционного контраста (А,В,Д), окрашивание метиленовым синим (Ж), трансмиссионная электронная микроскопия (З). (А-Г) Общий план клубенька. (Д,Е) Накопление каллозы в стенках инфекционных нитей и в клеточных стенках. (Ж,З) Утолщенные стенки инфекционных нитей в дегенерирующих инфицированных клетках. I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации, IV — зона старения, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка, ИН — инфекционная нить; стрелки указывают инфекционные нити с накоплениями каллозы, треугольники — на накопление каллозы в клеточной стенке. Масштаб = 200 мкм (А-Г), = 20 мкм (Д-Ж), = 5 мкм (З).

**Рисунок А.5— Каллоза в клубеньках *Pisum sativum* дикого типа SGE и мутанта RisFixV (*Pssym42*)**



Цитохимическая локализация суберина в 3-недельных клубеньках мутанта *Pisum sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*). Окрашивание нейтральным красным (Б,Г), наложение дифференциально-интерференционного контраста (А,В). (А,Б) Общий план клубенька. (В,Г) Зона инфекции с извитыми инфекционными нитями. I — меристема; наконечники стрелок указывают на инфекционные нити, стрелки — на суберинизированные стенки инфекционных нитей. Масштаб =200 мкм (А,Б), =20 мкм (В,Г).

**Рисунок А.6— Суберин в клубеньках мутанта *Pisum sativum* SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*)**

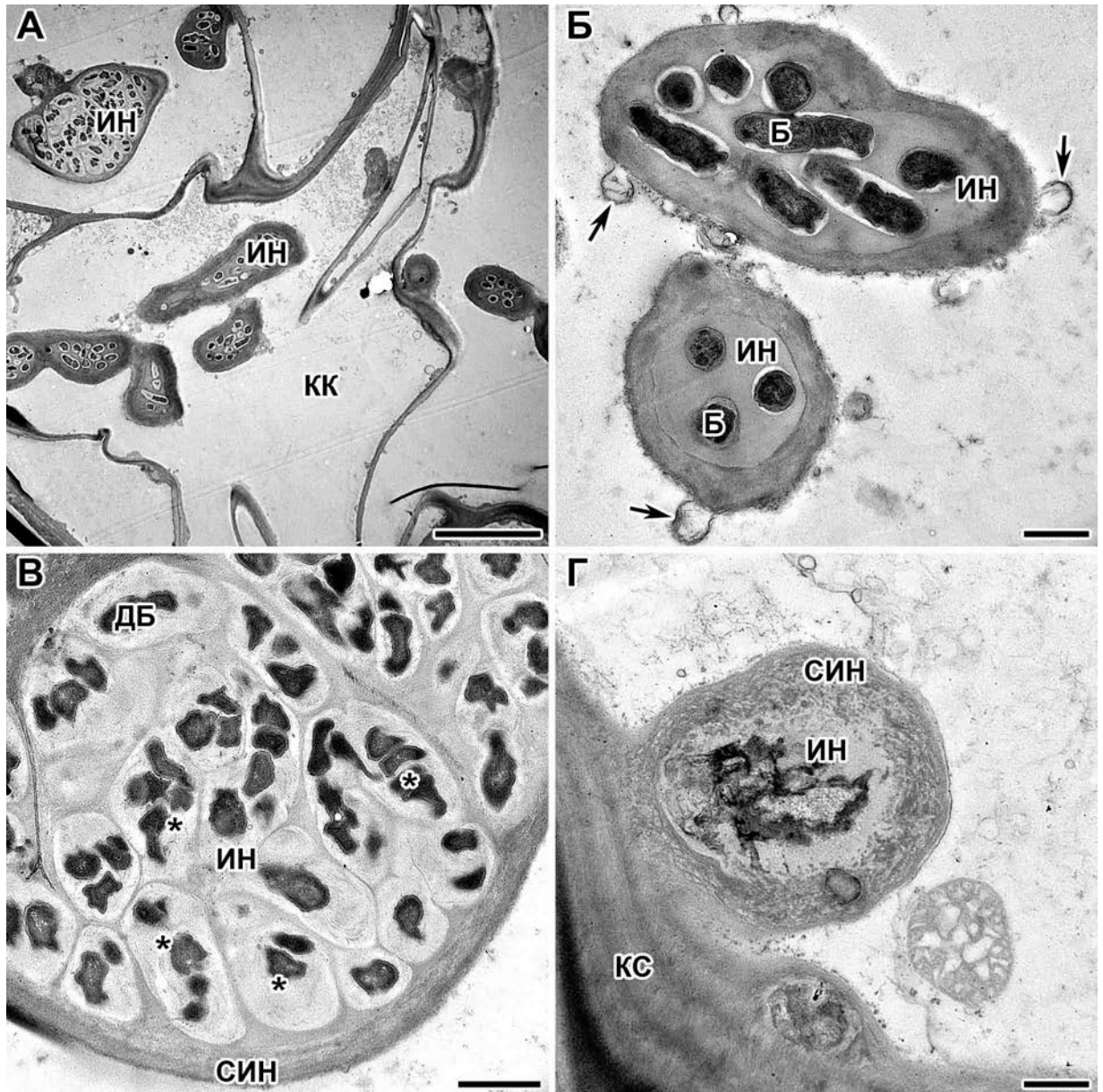


Материал клеточной стенки откладывается вокруг вакуоли в инфицированных клетках, содержащих как инфекционные нити, так и бактериоиды, и включает дополнительные выросты и капли в просвете вакуоли. (А) Инфицированная клетка в клубеньке дикого типа SGE. Гистохимическое окрашивание рутениевым красным. (Б) Микрофотография просвечивающей электронной микроскопии инфицированных клеток в клубеньке дикого типа SGE. (В, Г) Материал клеточной стенки вокруг вакуоли в клубеньках мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) окрашен рутениевым красным (В) и смесью йода и серной кислоты (Г). (Д-Ж) Отложение материала клеточной стенки вокруг вакуоли. Иммуноэлектронная локализация эпитопа гомогалактуронана с высокой степенью метилэтерификации, меченного антителом J1M7. (Е) Большое увеличение области в рамке на (Д). (Ж) Материал клеточной стенки в виде выростов в просвете вакуоли. (З-К) Отложение материала клеточной стенки вокруг вакуоли и в виде капель в просвете вакуоли. Иммуноэлектронная локализация эпитопа (1→4)-β-D-галактановой боковой цепи рамногалактуронана I, меченного антителом LM5. (И, К) Большое увеличение областей в рамках на (З). (Л-Н) Гипертрофированная инфекционная капля в клубеньках мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) при окрашивании метиленовым синим-азуром II на полутонком срезе (Л), с использованием флуоресцентной иммунолокализации эпитопа высоко метилэтерифицированного гомогалактуронана, меченного антителом J1M7 (М) и иммуноэлектронная локализация эпитопа (1→4)-β-D-галактановой боковой цепи



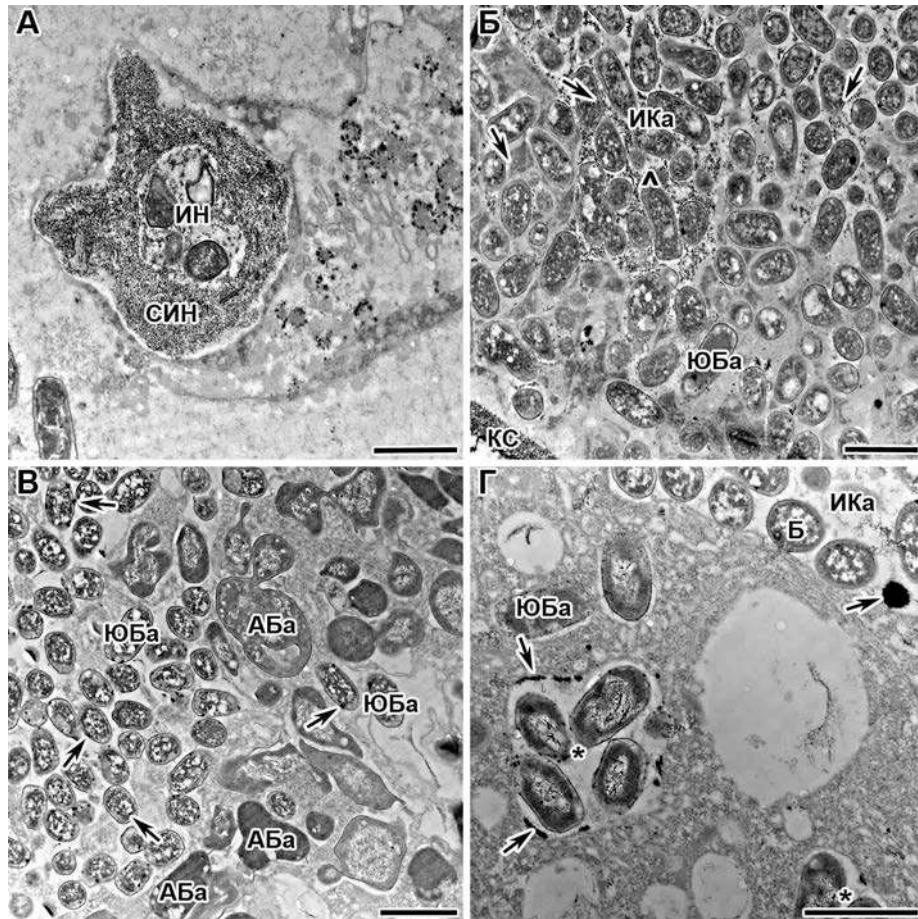
рамногалактуронана I, меченного антителом LM5 (H). (O) Инфекционная нить с электронно-плотным матриксом и заключенными ризобиями. Иммуноэлектронная локализация эпитопа (1→4)-β-D-галактановой боковой цепи рамногалактуронана I, меченного антителом LM5. Я — ядро, В — вакуоль, ИКа — инфекционная капля, ИН — инфекционная нить, КС — клеточная стенка, МКС — материал клеточной стенки, М — митохондрия, А — амилопласт, Б — бактерия; стрелки указывают на частицы золота, наконечники стрелок — на отложения суберина, треугольники — на инфекционные нити. Масштаб = 20 мкм (А-Г, Л, М), = 5 мкм (Д, З), = 2 мкм (Н), = 500 нм (Е, Ж, И, К, О).

**Рисунок А.7— Защитные реакции в клубеньках мутанта *Pisum sativum* SGEFix<sup>-</sup>-2 (*Pssym33-3*)**



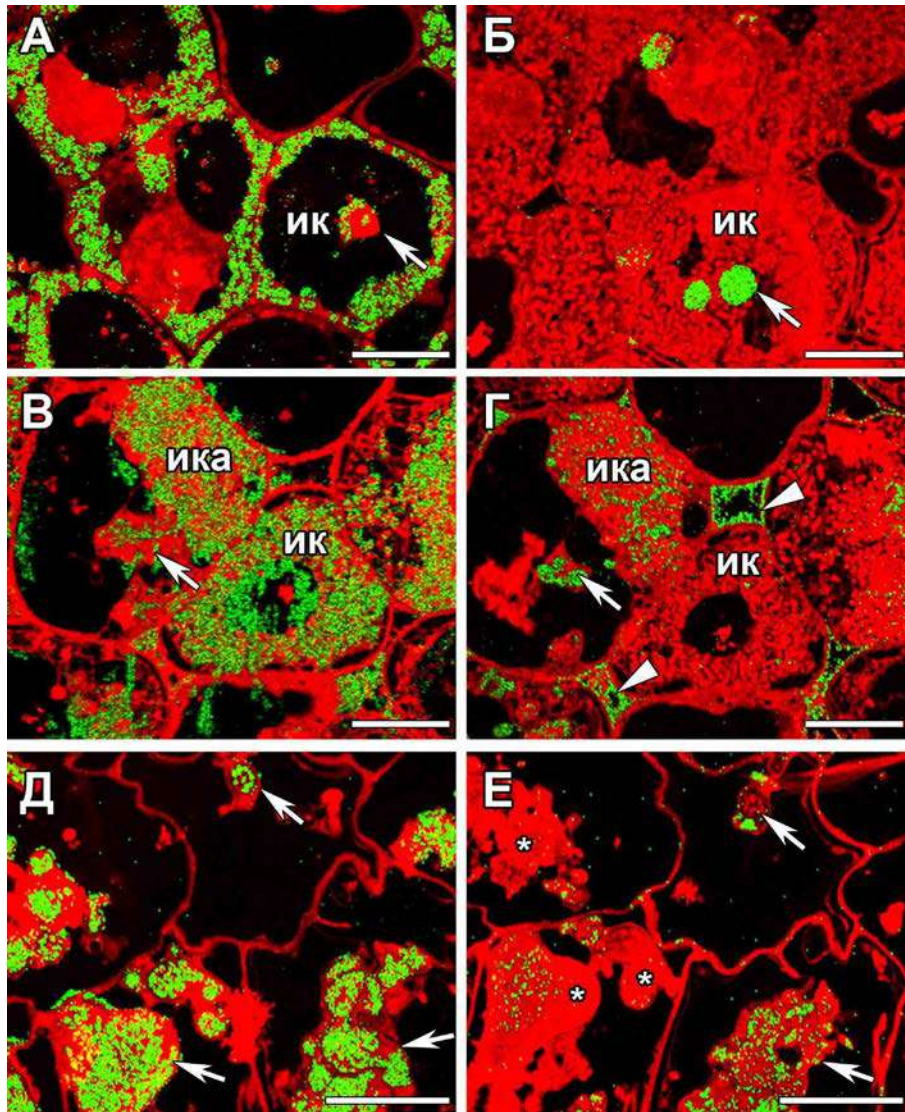
Трансмиссионная электронная микроскопия клубеньков мутанта *Pisum sativum* SGEFix<sup>-5</sup> (*Pssym33-2*). (А) Колонизированные клетки. (Б) Инфекционные нити с утолщенными стенками и интактными бактериями в матриксе. (В) Инфекционная нить с утолщенными стенками и деградирующими бактериями, собранными в кластеры. (Г) Инфекционная нить с полностью деградировавшими бактериями в просвете. КК — колонизированная клетка, ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, КС — клеточная стенка, Б — бактерия, ДБ — деградирующая бактерия, стрелки указывают на везикулы, звездочки — на кластеры бактерий внутри инфекционной нити. Масштаб = 10 мкм (А), = 1 мкм (Б-Г).

**Рисунок А.8— Ультраструктурная организация клубеньков мутанта *Pisum sativum* SGEFix<sup>-5</sup> (*Pssym33-2*)**



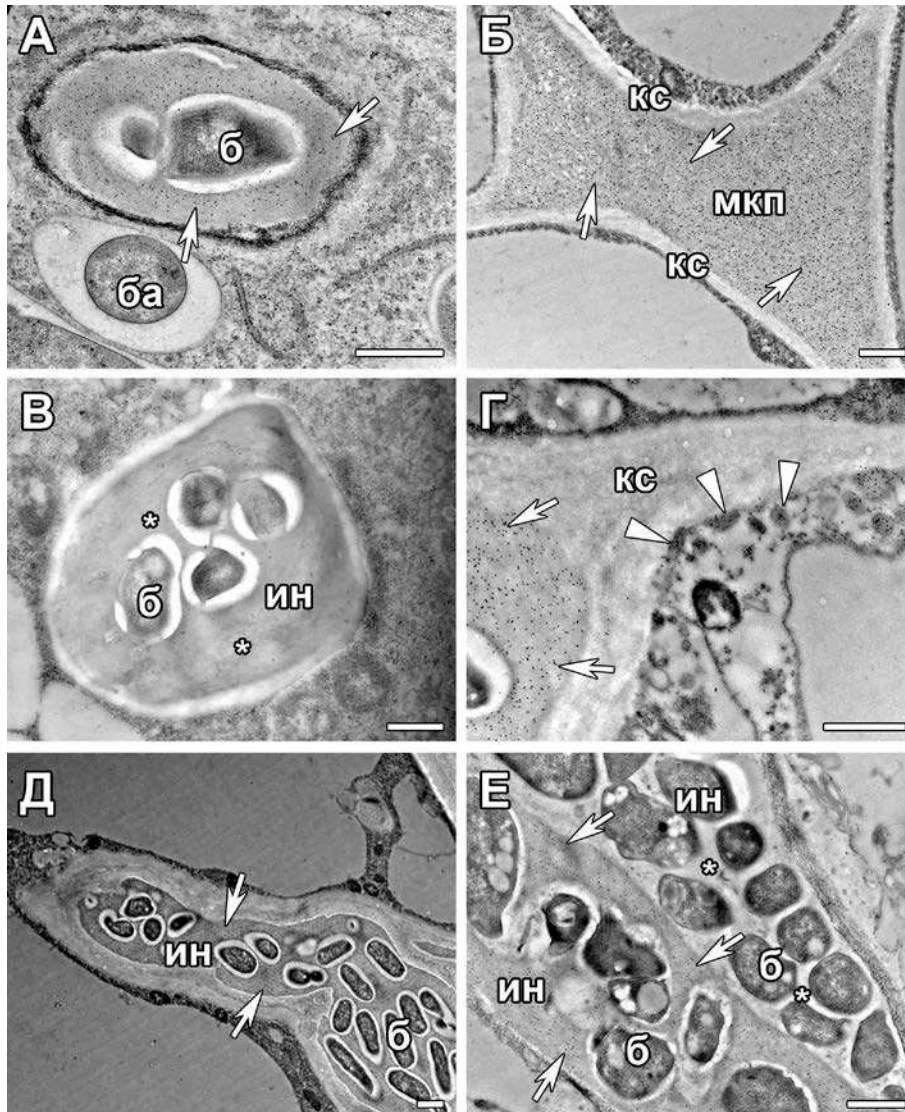
Цитохимическая реакция с хлоридом церия в 2-недельных клубеньках мутанта *Pisum sativum* SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). (А) Инфекционная нить с интенсивным накоплением преципитатов пергидроксида церия в стенке и матриксе. (Б) Инфекционная капля, полностью заполненная преципитатами пергидроксида церия. (В) Ювенильные бактериоды с преципитатами пергидроксида церия. (Г) Формирование мультибактероидных симбиосом, окруженных преципитатами пергидроксида церия. КС — клеточная стенка, ИН — инфекционная нить, ИКа — инфекционная капля, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, ЮБа — ювенильный бактериод, АБа — аномальный бактериод, ^ — матрикс инфекционной нити, заполненный мелкими преципитатами пергидроксида церия, \* — мультибактероидные симбиосомы, стрелки указывают на преципитаты пергидроксида церия. Масштаб = 1 мкм.

**Рисунок А.9— Пероксид водорода в клубеньках мутанта *Pisum sativum* SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*)**



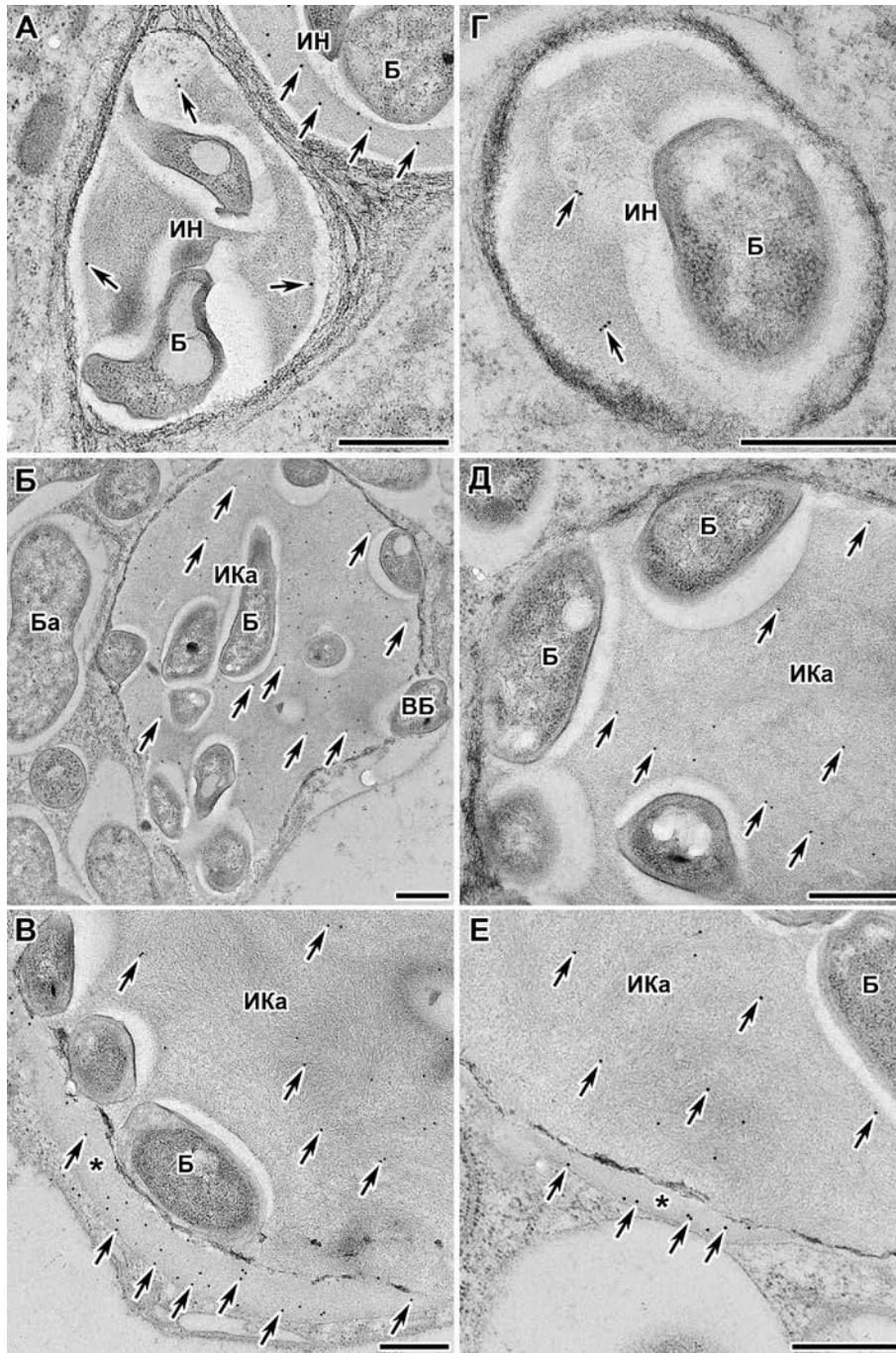
Конфокальная лазерная микроскопия 2-недельных клубеньков *Pisum sativum* дикого типа SGE (А,Б), мутантов SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) (В,Г) и RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*) (Д,Е). Иммунолокализация с помощью антител MAC57 (для липополисахаридов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 3841) (А,В,Д) и MAC265 (для арабиногалактанпротеин-экстензинов) (Б,Г,Е). В качестве вторичных антител использованы козы антигены к крысиному гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм, с последующим серебрением. ИК — инфицированная клетка, ИКа — инфекционная капля, стрелки указывают на инфекционные нити, звездочка — на инфекционные нити с относительным отсутствием метки MAC265 у двойного мутанта RBT3, наконечники стрелок — на локализацию MAC265 в межклеточном пространстве у мутанта SGEFix<sup>-1</sup>. Масштаб = 10 мкм.

**Рисунок А.10**— Липополисахариды *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 3841 и арабиногалактанпротеин-экстенсин матрикса инфекционных нитей в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum*



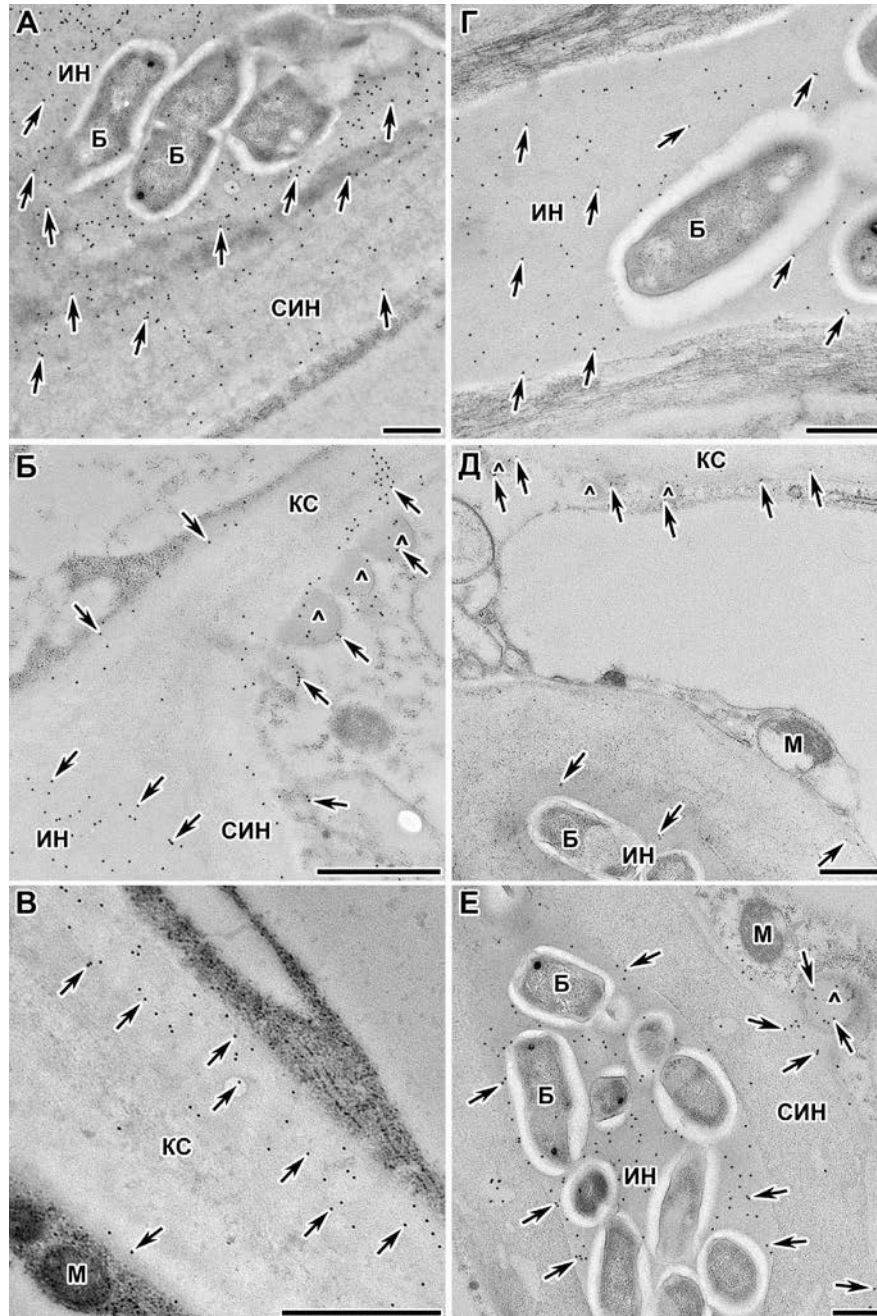
Иммуноэлектронная локализация с помощью антитела MAC265 в 2-недельных клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum*. В качестве вторичных антител использованы козы антитела к крысиному гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм. (А) Дикий тип SGE. (Б) Мутант SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). (В) Мутант SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*). (Г) Двойной мутант RBT3 (*Pssym33-3, Pssym40-1*). (Д) Двойной мутант RBT4 (*Pssym33-3, Pssym42*). (Е) Мутант RisFixV (*Pssym42*). б — бактерия, ба — бактериоид, КС — клеточная стенка, МКП — межклеточное пространство, ИН — инфекционная нить; наконечники стрелок указывают на транспортные везикулы, стрелки — на частицы золота, звездочки — на часть матрикса инфекционной нити с отсутствием метки MAC265. Масштаб = 500 нм.

**Рисунок А.19— Арабиногалактанпротеин-экстенсин матрикса инфекционных нитей в клубеньках *Pisum sativum* дикого типа и мутантов**



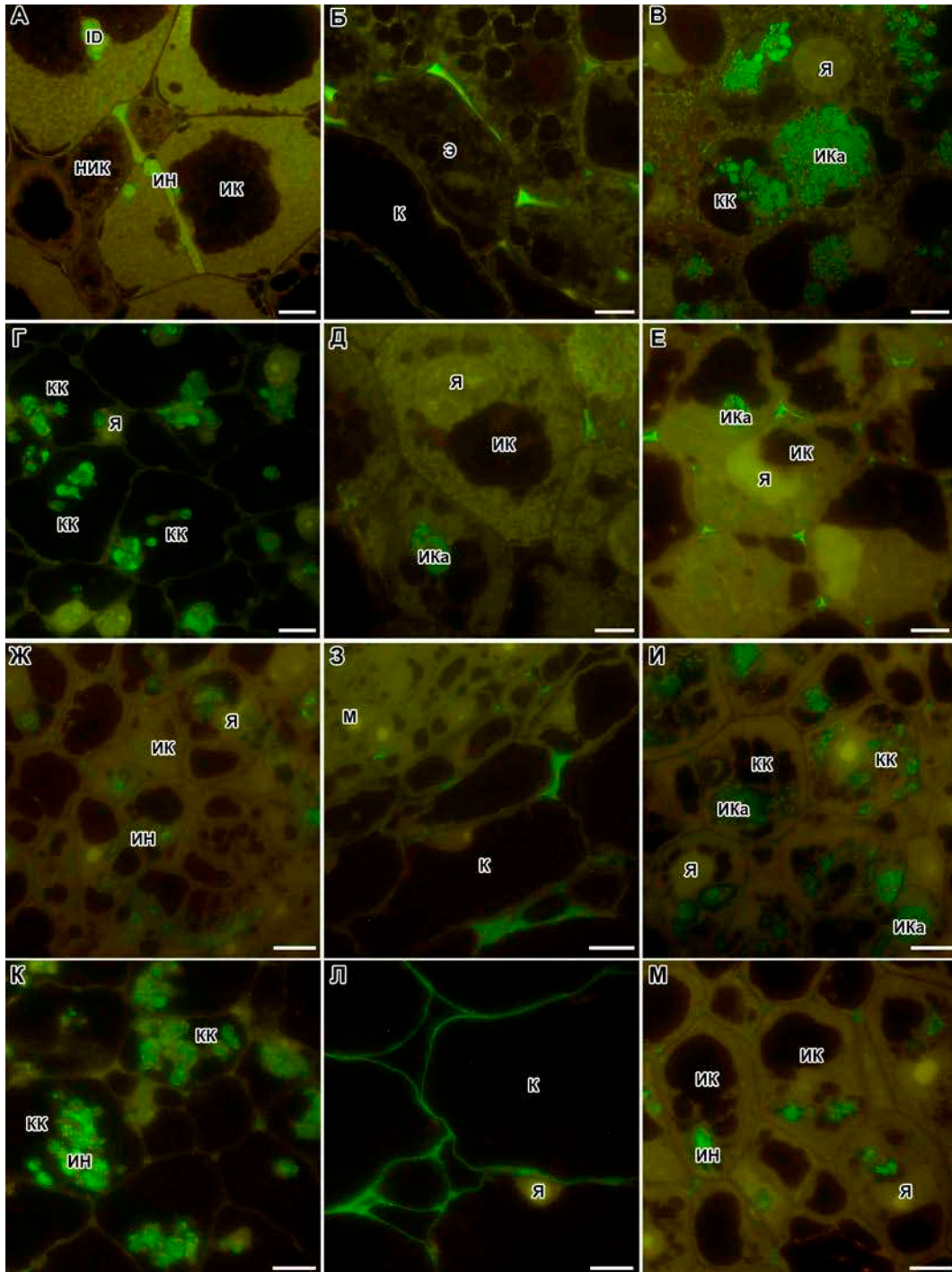
Иммуноэлектронная локализация с помощью антител MAC204 (А-В) и MAC236 (Г-Е) в 2-недельных клубеньках *Pisum sativum* дикого типа SGE. В качестве вторичных антител использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм. (А, Г) Локализация в матриксе инфекционной нити. (Б, Д) Локализация в матриксе инфекционной капли. (В, Е) Локализация во вновь синтезированном матриксе инфекционной капли. ИН — инфекционная нить, ИКа — инфекционная капля, Б — бактерия, ВБ — высвобождающаяся бактерия, Ба — бактериод; стрелки указывают на частицы золота, \* — на районы инфекционной капли с вновь синтезированным матриксом. Масштаб = 500 нм.

**Рисунок А.11— Арабиногалактанпротеин-экстенсины матрикса инфекционных нитей в клубеньках *Pisum sativum* дикого типа SGE**



Иммуноэлектронная локализация с помощью антител МАС204 (А-В) и МАС236 (Г-Е) в 2-недельных клубеньках мутанта *Pisum sativum* RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*). В качестве вторичных антител использованы козы антитела к крысиному гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм. (А, Г) Локализация в матриксе инфекционной нити. (Б, Д) Транспортные везикулы, несущие метку АГБ-Э, рядом с клеточной стенкой. (В) Эпитоп АГБ-Э в клеточной стенке. (Е) Транспортные везикулы, несущие метку АГБ-Э, рядом со стенкой инфекционной нити. ИН — инфекционная нить, СИИ — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, КС — клеточная стенка, М — митохондрия, ^ — везикулы с меткой к эпитопам арабиногалактанпротеин-экстенсинам; стрелки указывают на частицы золота. Масштаб = 500 нм.

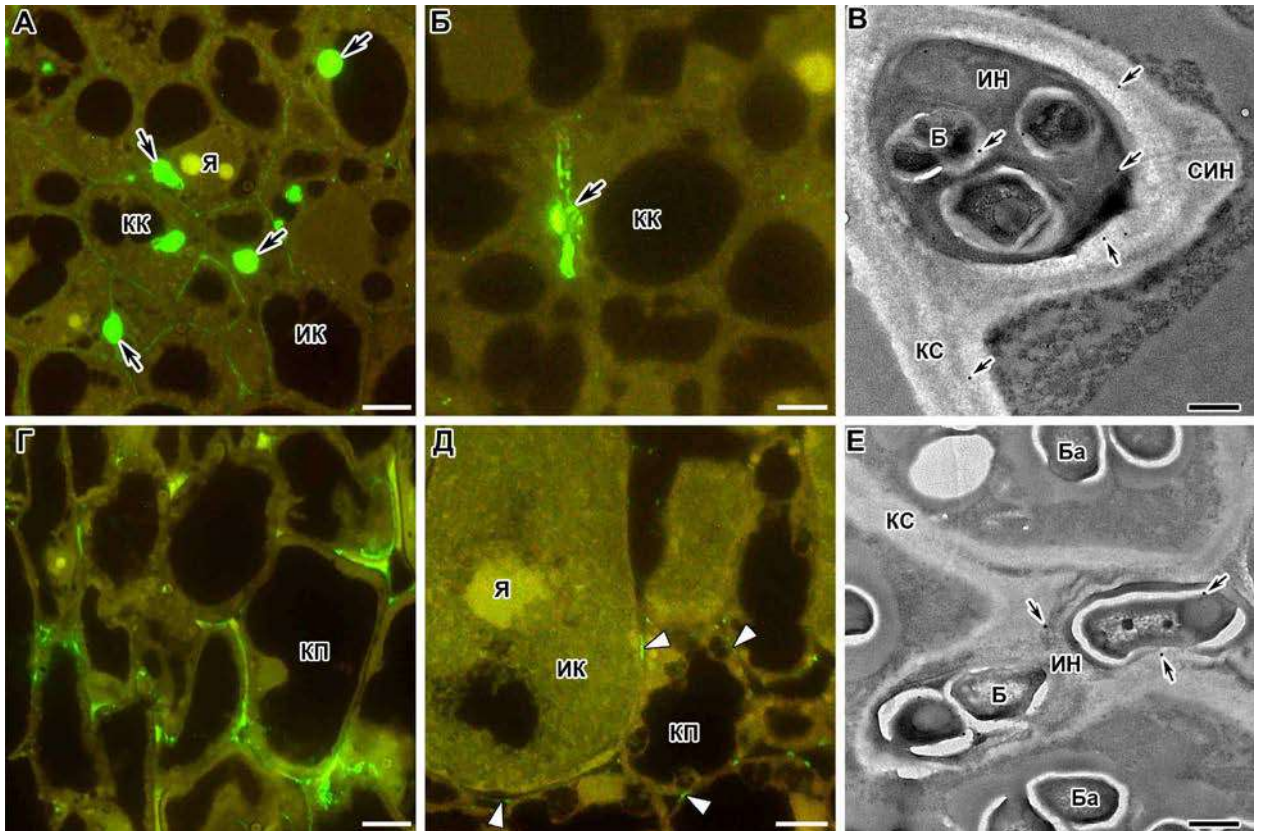
**Рисунок А.12— Арабиногалактанпротеин-экстенсины матрикса инфекционных нитей в клубеньках мутанта *Pisum sativum* RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*)**



Флуоресцентная иммунолокализация с антителом J1M11 на полутонких срезах 2-недельных клубеньков дикого типа и мутантов *Pisum sativum* (А-Е) и *Medicago truncatula* (Ж-М). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. (А, Б) Дикий тип SGE. (В) Мутант SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). (Г) Мутант SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*). (Д) Мутант SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*). (Е) Мутант Sprint-2Fix<sup>-</sup> (*Pssym31*). (Ж, З) Дикий тип А17. (И) Мутант *Mtefd-1*. (К, Л) Мутант TR3 (*Mtipd3*). (М) Мутант *Mtdnf1-1*. ИК — инфицированная клетка, КК — колонизированная клетка, М — меристематическая клетка, К — клетка коры, Э — эндодермальна клетка, Я — ядро. Масштаб = 5 мкм.

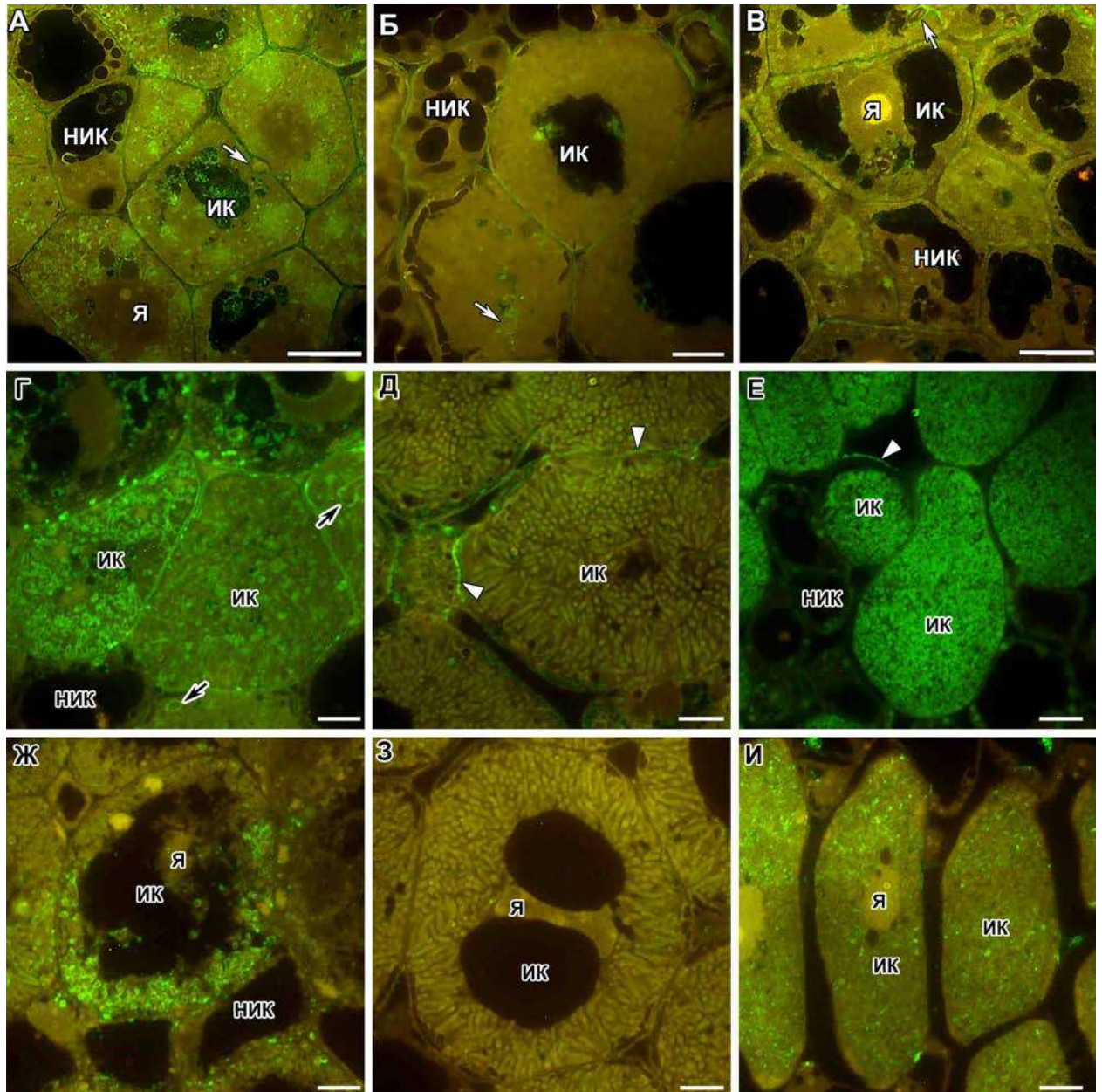
**Рисунок А.13— Экстенсин в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* и *Medicago truncatula***





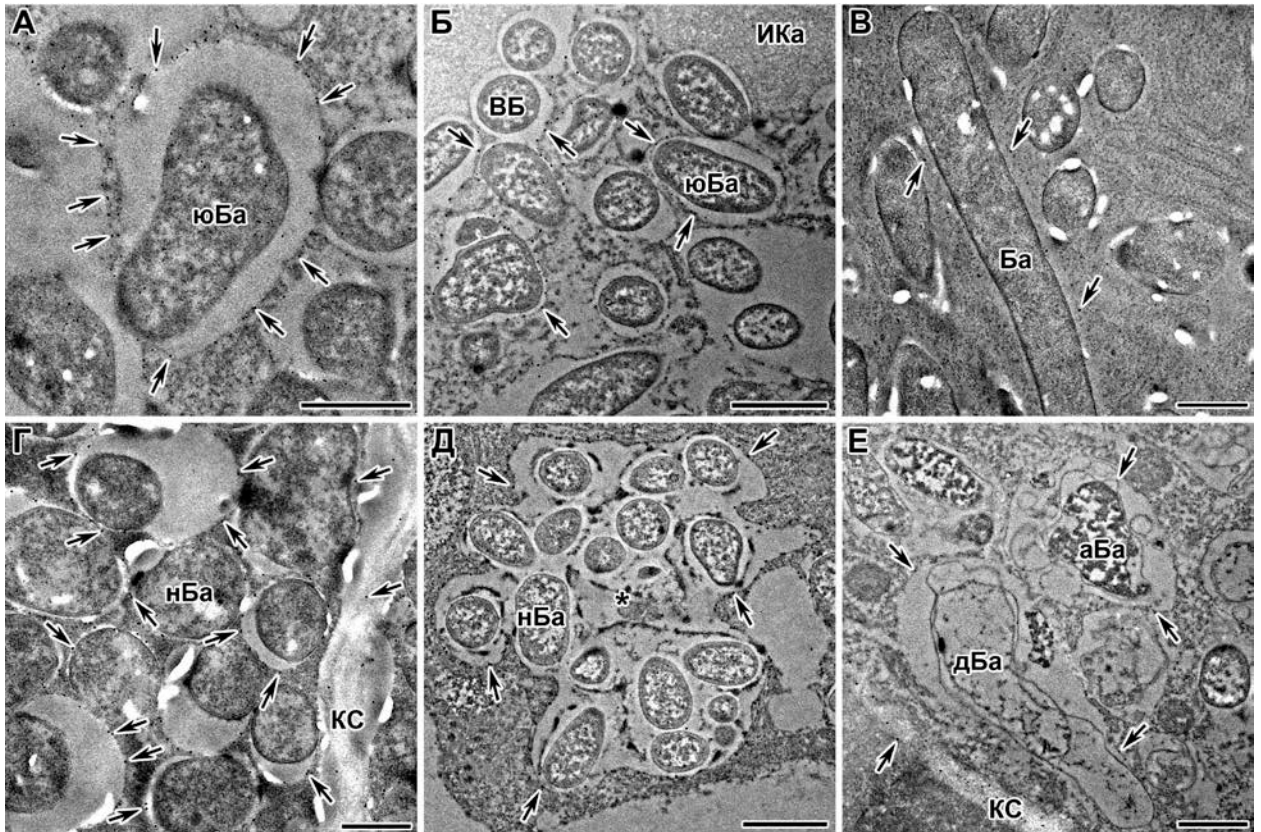
Флуоресцентная иммулокализация (А,Б,Г,Д) с помощью антител МАС265 (А,Г), JIM11 (Б,Д) и иммуоэлектронная локализация (В,Е) с помощью антитела JIM19 (В,Е) в клубеньках *Galega orientalis* (А-В) и *Glycine max* (Г-Е). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488 (А,Б,Г,Д) и конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм (В,Е). (А,Б) Зона инфекции. (В,Е) Инфекционные нити. (Г) Паренхима клубенька. (Д) Инфицированные клетки. КП — клубеньковая паренхима, ИК — инфицированная клетка, КК — колонизированная клетка, Я — ядро, КС — клеточная стенка, ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, Ба — бактериод; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники — на сигнал, маленькие стрелки — на частицы золота. Масштаб = 10 мкм (А,Б,Г,Д), = 500 нм (В,Е).

**Рисунок А.14— Арабиногалактанпротеин-экстенсин и экстенсины в клубеньках *Galega orientalis* и *Glycine max***



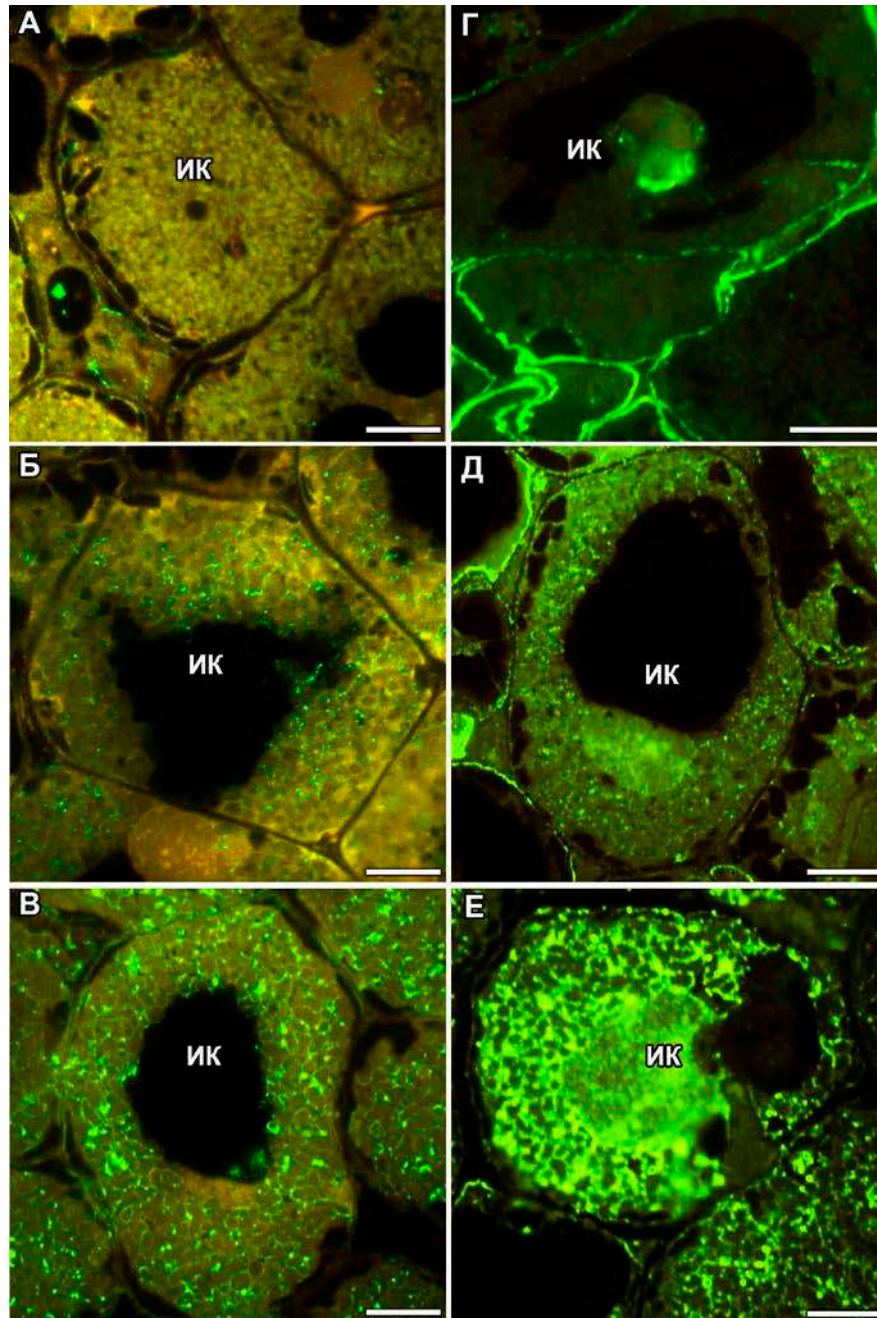
Флуоресцентная иммулокализация с антителами LM6-M (А-Е) и LM2 (Ж-И) в клубеньках *Pisum sativum* (А,Б), *Medicago truncatula* (В), *Galega orientalis* (Г,Д,Ж,З) и *Glycine max* (Е,И). В качестве вторичного антитела использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. (А,В,Г,Ж) Инфицированные клетки с ювенильными симбиосомами. (Б,Д,З) Зрелые инфицированные клетки. (Е,И) Инфицированные клетки. ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, Я — ядро; стрелки указывают на инфекционные нити, треугольники на сигнал в клеточных стенках. Масштаб = 10  $\mu$ m.

**Рисунок А.15— Арабинаны и арабиногалактановые белки в клубеньках Бобовых**



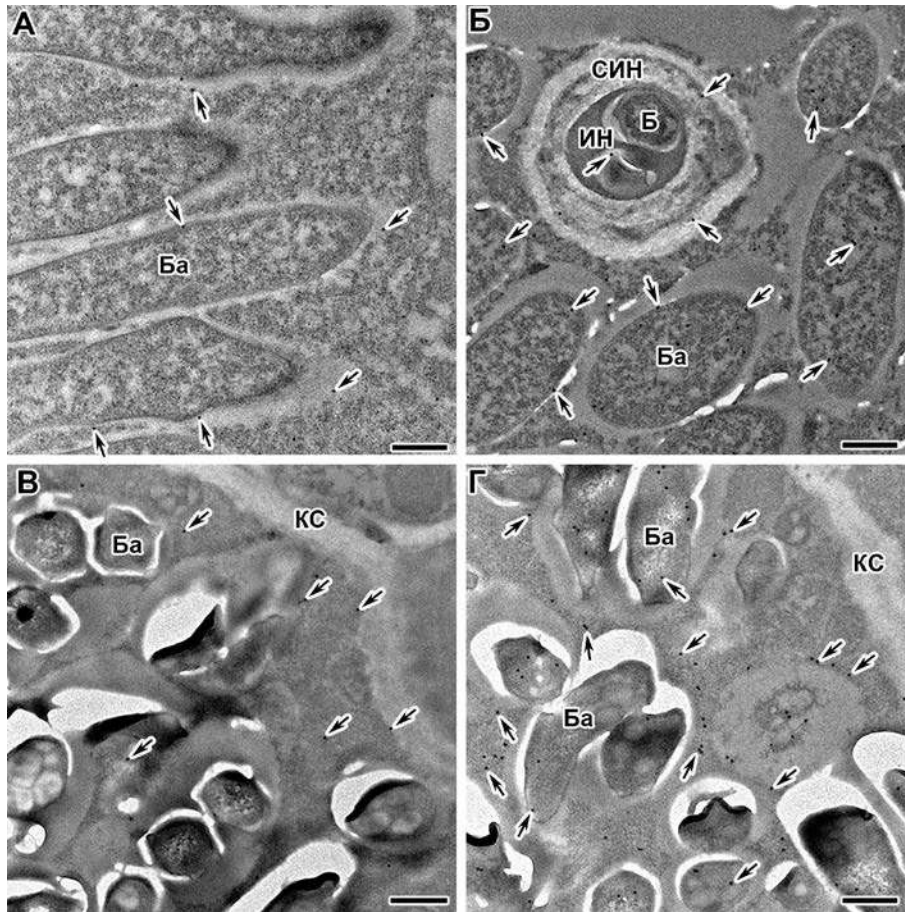
Иммуноэлектронная локализация с помощью антитела LM6-M в клубеньках дикого типа и мутантов *Medicago truncatula* (В,Г) and *Pisum sativum* (А,Б,Д,Е). В качестве вторичных антител использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм. (А) Ювенильные симбиосомы у дикого типа SGE; (Б) Ювенильные симбиосомы у мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*); (В) Зрелые симбиосомы у дикого типа A17; (Г) Недифференцированные симбиосомы у мутанта *Mtdnf1-1*; (Д) Мультибактероидные симбиосомы у мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*); (Е) Симбиосомы с аномальными и деградирующими бактериоидами у мутанта SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*). КС — клеточная стенка, ИКа — инфекционная капля, ВБ — высвобождающаяся бактерия, Ба — зрелый бактериоид, юБа — ювенильный бактериоид, нБа — недифференцированный бактериоид, аБа — аномальный бактериоид, дБа — деградирующий бактериоид, \* — мультибактероидная симбиосома; стрелки указывают на частицы золота. Масштаб = 1 мкм (Б,Д), = 500 нм (А,В,Г,Е).

**Рисунок А.16— (1→5)-α-L-арабиановая боковая цепь рамногалактуронана I в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum* и *Medicago truncatula***



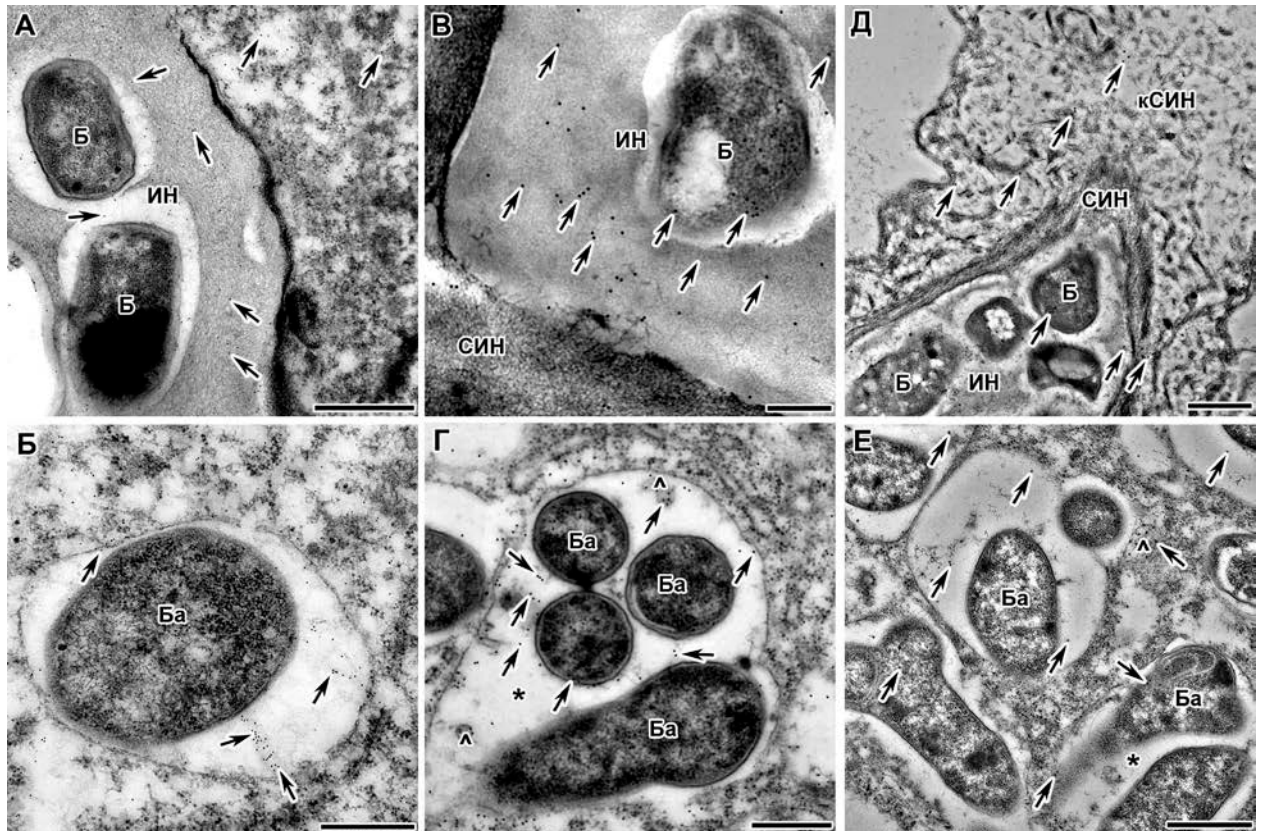
Флуоресцентная иммулокализация с помощью антитела JIM1 в клубеньках *Medicago truncatula* (А) и *Pisum sativum* (Б-Е). В качестве вторичного антитела использованы козьи антитела к крысиному гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488. ИК — инфицированная клетка. (А) Двухнедельные клубеньки дикого типа A17. (Б) Двухнедельные клубеньки дикого типа SGE. (В) Четырехнедельные клубеньки дикого типа SGE. (Г) Двухнедельные клубеньки мутанта Sprint-2Fix<sup>-</sup> (*Pssym31*). (Д) Двухнедельные клубеньки мутанта SGEFix<sup>-</sup>-1 (*Pssym40-1*). (Е) Двухнедельные клубеньки мутанта SGEFix<sup>-</sup>-3 (*Pssym26*). Масштаб = 10 мкм.

**Рисунок А.17— Арабиногалактановый белок с гликозилфосфатидилинозитоловым якорем в клубеньках дикого типа *Medicago truncatula* и дикого типа и мутантов *Pisum sativum***



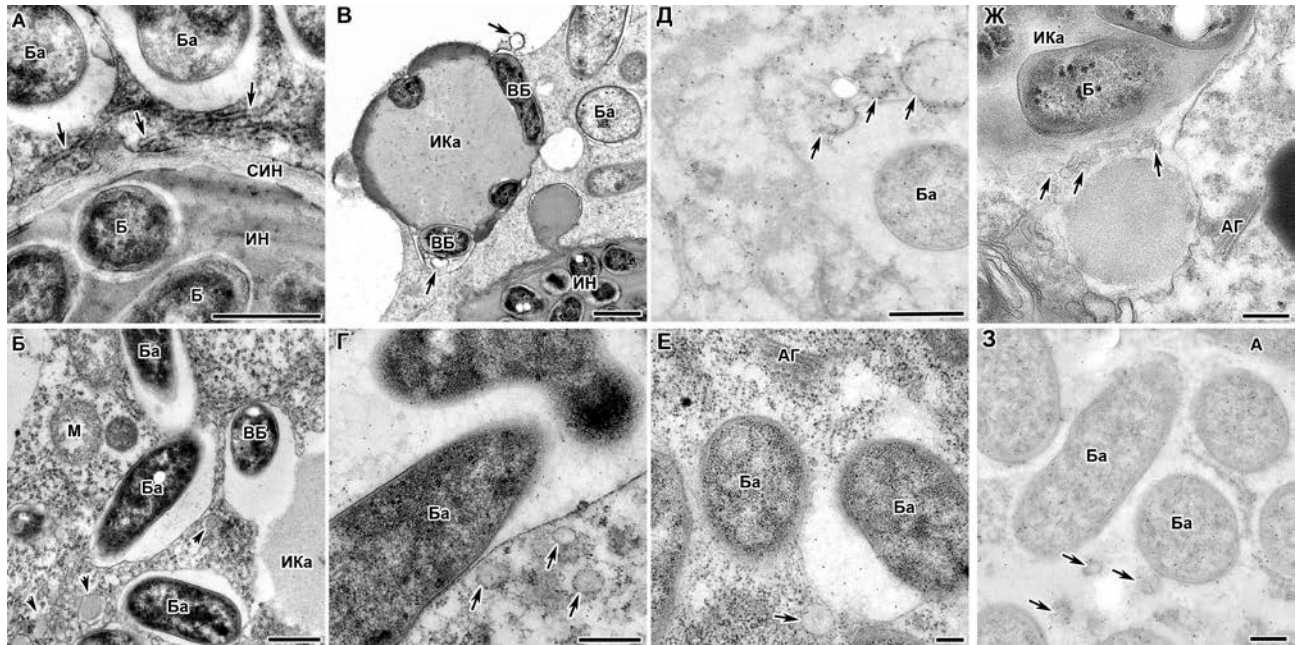
Иммуноэлектронная локализация с помощью антител ЛМ4 (А,В) и ЛМ15 (Б,Г) в клубеньках *Galega orientalis* (А,Б) и *Glycine max* (В,Г). В качестве вторичных антител использованы козы антигена к крысиному гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм. (А,В,Г) Бактероиды в инфицированной клетке. (Б) Инфекционная нить в инфицированной клетке. КС — клеточная стенка, ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, Ба — бактериод; стрелки указывают на частицы золота. Масштаб = 500 нм.

**Рисунок А.18— Арабиногалактановые белки в клубеньках *Galega orientalis* и *Glycine max***



Иммуноэлектронная локализация с поликлональным антителом к транс-зеатину рибозиду в клубеньках дикого типа SGE (А, Б) и мутантов SGEFix<sup>-2</sup> (*Pssym33-3*) (В), SGEFix<sup>-1</sup> (*Pssym40-1*) (Г) и RisFixV (*Pssym42*) (Д, Е). В качестве вторичных антител использованы козы антигена к кроличьему гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм. ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, кСИН — стенка инфекционной нити, пропитанная каллозой, Б — бактерии, Ба — бактериоды, \* — мультибактероидные симбиосомы, ^ — везикулы, несущие метку транс-зеатина рибозид; стрелки указывают на частицы золота. Масштаб = 500 нм (А, Г-Е), = 200 нм (Б, В).

**Рисунок А.19— Транс-зеатин рибозид в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum***



Трансмиссионная электронная микроскопия (А,Б,В,Ж) и иммуноэлектронная локализация цитокинина транс-зеатина рибозида (Г), гибберелловой кислоты (Д,З), и глутатиона (Е) в клубеньках *Pisum sativum* дикого типа SGE (А-Е) и мутантов SGEFix<sup>-6</sup> (*Pssym40-2*) (Ж) и SGEFix<sup>-3</sup> (*Pssym26*) (З). В качестве вторичных антител использовали козы анти тела к кроличьему гамма-глобулину IgG, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм; (Д,З) неконтрастированные срезы. (А) Канальцы ЭПР в тесной ассоциации со стенкой инфекционной нити. (Б) Везикулы агранулярного ЭПР с материалом матрикса инфекционной капли. (В,Ж) Везикулы присоединяются к плазматической мембране при высвобождении бактерий из инфекционных капель. (Г) Везикулы, несущие метку транс-зеатина рибозида, располагаются вблизи симбиосомной мембраны. (Д,З) Везикулы, несущие метку гибберелловой кислоты, присоединяются к симбиосомной мембране. (Е) Везикула, несущая метку глутатиона, соединяется с симбиосомной мембраной. АГ — аппарат Гольджи, М — митохондрия, А — амилопласт, ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, ИКа — инфекционная капля, Б — бактерия, ВБ — высвобождающаяся бактерия, Ба — бактериоид; стрелки указывают каналцы ЭПР и транспортные везикулы, наконечники стрелок — на везикулы агранулярного ЭПР. Масштаб = 1 мкм (В), = 500 нм (А,Б,Г,Д), = 200 нм (Е-З).

**Рисунок А.29— Эндоплазматический ретикулум и везикулярный транспорт в клубеньках дикого типа и мутантов *Pisum sativum***