

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ФЕДОРОВА

Елена Эриковна

**Эндомембранная система клеток корневого клубенька бобовых
растений в условиях азотфиксирующего симбиоза**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва - 2026

Диссертация подготовлена в Группе растительно-микробных взаимодействий
Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии
наук

Официальные оппоненты – *Гоголев Юрий Викторович, доктор биологических наук, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казанский институт биохимии и биофизики, лаборатория молекулярной биологии, руководитель лаборатории*

Медведев Сергей Семенович, доктор биологических наук, профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра физиологии и биохимии растений, заведующий кафедрой

Топунов Алексей Федорович, доктор биологических наук, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория биохимии азотфиксации и метаболизма азота, заведующий лабораторией

Защита диссертации состоится «22» мая 2026 г. в 15 часов 35 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М1.

E-mail: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3796/>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Симбиотическая азотфиксация является одним из важнейших источников фиксированного азота для биосферы. Преимущество процесса восстановления газообразного азота атмосферы в аммиак в корневых клубеньках в том, что реакция проходит при нормальном атмосферном давлении и температуре и осуществляется за счет фермента нитрогеназы, экспрессия которого индуцируется в бактериях группы ризобий в процессе их сосуществования с бобовым растением. Биологическая азотфиксация является одним из первых кандидатов для разработки технологий, использующих природные процессы. Это делает изучение симбиоза актуальным и необходимым.

Актуальность проблемы и степень разработанности темы.

Поддержание в живой эукариотической клетке огромной колонии живых азотфиксирующих бактерий является не только крайне интересным биологическим феноменом, но и одним из источников необходимого для биосферы азота.

Будучи внутриклеточными симбионтами, ризобии получают доступ к ресурсам клетки-хозяина и приобретают способность к фиксации атмосферного азота. При этом в клетках корневого клубенька, заселенных бактериями, не происходит индукции программируемой клеточной смерти (PCD) и бактерии не элиминируются в процессе слияния с литическими компартментами немедленно после входа в клетку.

Продолжительность жизни клубеньков составляет лишь 6-8 недель, но причины, которые вызывают быструю гибель инфицированных клеток и клубенька, пока так и не выяснены.

Одной из наиболее ярких особенностей инфицированной клетки являются резкие изменения в эндомембранной системе, которые происходят после проникновения бактерий в симпласт клетки-хозяина. Создание мембранного интерфейса между клеткой клубенька и внутриклеточными бактериями, интеграция эндомембранной системы клетки-хозяина и развивающейся в клетке бактериальной колонии, представляет собой важную часть растительно-микробных взаимодействий, которая до сих пор изучена недостаточно. Результаты исследований могут быть востребованы и в других областях биологии и в медицине, а также создают возможности повышения эффективности процесса азотфиксации.

Цели и задачи исследований

Целью работы было выявление молекулярных механизмов модификаций эндомембранной системы инфицированной клетки, которые обеспечивают поддержание колонии азотфиксирующих бактерий в симпласте клетки растения-хозяина в процессе развития симбиоза.

Для исследований были выбраны направления модификации эндоплазматической мембраны, происходящие в процессе изменения функционального состояния инфицированной клетки при переходе к азотфиксации, а также прекращения симбиотических отношений при натуральном старении или вследствие неблагоприятных условий. Для диагностики были отобраны гены-маркеры этих изменений.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Для выяснения условий поддержания внутриклеточной колонии ризобий в симпласте растительной клетки исследовать молекулярные механизмы, которые предотвращают элиминацию внутриклеточных ризобий на пути слияния с литическими компартментами, а также выявить динамику изменений главного литического компартмента клетки - вакуоли.
2. Провести анализ регуляции процессов транспорта к мембранам симбиотического интерфейса в инфицированной клетке и определить ключевые гены и белки, участвующие в этих процессах.
3. Для выяснения молекулярных механизмов таргетированного мембранного транспорта и перенаправления мембранных компонентов и белков к симбиотическому интерфейсу, исследовать процессы изменения конформации актинового цитоскелета и распределения в инфицированной клетке белков Arp2/3-комплекса, который регулирует нуклеацию белка актина.
4. Выявить механизмы новообразования мембранных компонентов в инфицированной клетке и формирования вектора переноса мембран к симбиотическому интерфейсу, зависящие от Ca^{2+} -сенсоров из группы синаптоагминов, участвующих в регенерации поврежденных мембран.
5. Определить источники и стимулирующие механизмы, которые приводят к избыточному синтезу элементов эндоплазматического ретикулума (ЭР) в инфицированных клетках.
6. Для выяснения причин ускоренного старения инфицированных клеток клубенька и низкой устойчивости клубеньков к солевому стрессу исследовать экспрессию и распределение белков ионных каналов шейкерного типа MtAKT1 и MtSKOR/GORK и генов, участвующих в транспорте ионов калия и натрия в корневом клубеньке.

Интеграция информации, полученной в процессе исследований, позволила выяснить ключевые элементы, которые индуцируются в эндоплазматической мембранной системе клеток корневого клубенька в ответ на пролиферацию бактерий в симпласте, и оценить последствия поддержания бактериальной колонии для клетки растения-хозяина.

Объекты исследования: корневые клубеньки бобовых и небобовых растений, способных к симбиозу, гены и белки этих растений, участвующие в симбиотическом процессе.

Научная новизна полученных результатов

Впервые показано, что нарушение органеллогенеза вакуолей в инфицированных клетках зависит от репрессия генов комплекса HOPS, который регулирует селективный транспорт и слияние с мембраной тонопласта. Был сделан вывод, что репрессия комплекса HOPS в инфицированных клетках клубеньков является одним из определяющих условий поддержания внутриклеточной бактериальной колонии, а также способствует созданию пространства для симбиосом в симпласте инфицированных клеток.

Впервые было показано, что мембраны симбиосом не приобретают молекулярных маркеров, специфичных для первых этапов эндоцитоза, что, вероятно, позволяет предотвратить лизис симбиосом на начальном этапе колонизации растительных клеток.

Впервые была выявлена идентичность мембран симбиосом в онтогенезе, последовательное появление на симбиосомных мембранах белков пути эндоцитоза (Rab5, Rab7), белков регуляторов слияния мембран специфичных для эндосом и тонопласта: (t-SNAREs): SYP21/22, SYP51/52, VTI11, VPS11, VPS15, а также белков пути секреции, принадлежащих к группе VAMP7.

Впервые показано, что белки пути секреции из группы VAMP71 являются необходимым компонентом симбиотических отношений в разных типах симбиоза, и, среди других функций, обеспечивают доставку ферментов, участвующих в модификации клеточной стенки инфекционной нити за счет чего создается мембранный интерфейс, позволяющий выход ризобий в симпласт клетки-хозяина и последующий процесс азотфиксации.

Впервые было показано значение для симбиоза генов и белков комплекса Arp2/3, которые регулируют формирование и рост актинового цитоскелета, обеспечивая рост и созревание симбиосом.

Впервые была выявлена роль белков синаптоагминов, из группы Ca^{2+} сенсоров, участвующих в регенерации поврежденных мембран, в создании и регуляции вектора переноса мембран к симбиотическому интерфейсу. Были исследованы молекулярные механизмы индукции избыточного синтеза мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР) в инфицированных клетках.

С целью выявления причин высокой чувствительности корневых клубеньков к солевому стрессу, был проведен анализ спектра ионов в клубеньках растений, подвергнутых солевому стрессу, и исследованы гены, участвующие в удалении или секвестрировании Na^{+} как

защитной реакции на стресс. Впервые были показаны нарушения в распределении белков ионных каналов шейкерного типа, участвующих в переносе ионов калия, MtAKT1 (канал входящего выпрямления) и MtSKOR/GORK (канал выходящего выпрямления). Были показаны изменения в распределении белков NHX6 и NHX7, участвующих в выведении ионов Na^+ в инфицированных клетках, а также выявлена динамика экспрессии более 20 других генов, участвующих в транспорте ионов калия в корневых клубеньках люцерны усеченной.

Согласно данным анализа, в инфицированных клетках накапливалось в 5 раз больше натрия, чем в неинфицированных. Причины наблюдаемых изменений зависят от нарушения локализации белков ионообменников группы NHX на мембранах и нарушение их экспрессии в инфицированных клетках.

Теоретическая и практическая значимость работы

Процессы адаптации инфицированных клеток к их необычному образу жизни, изменения и регуляции внутриклеточных процессов и поддерживающей эндомембранной системы инфицированных клеток пока мало изучены. Результаты исследований, приведенные в диссертации, могут быть использованы для проведения генетических манипуляций с генами, определяющими условия существования колонии азотфиксирующих бактерий в инфицированной клетке. Исследования адаптации эукариотической клетки к бактериальной колонии, находящейся в симпласте, создают возможности для создания искусственных биосистем с возможностью получения фиксированного азота.

Методология и методы исследований. В диссертации использованы современные методы: молекулярно-генетические методы применялись для клонирования генов и трансформирования растений, световая, электронная и конфокальная микроскопия, а также методы иммуноцитохимии были использованы для анализа фенотипов и локализации белков.

Положения, выносимые на защиту

1. Нарушения органеллогенеза вакуоли в инфицированных клетках связаны с репрессией генов комплекса HOPS, который регулирует селективный транспорт и слияние с мембраной тонопласта. Дефункционализация вакуоли является одним из определяющих условий поддержания бактериальной колонии и процесса азотфиксации.

2. Изменение идентичности симбиосомной мембраны и последовательное появление на этой мембране малых GTPаз Rab5, Rab7, регуляторов слияния мембран специфичных для мембран эндосом и тонопласта: (t-SNAREs): SYP21/22, SYP51/52, VTI11, VPS11, VPS15

и белков пути секреции, принадлежащих к группе VAMP7 обуславливает возможность временной поддержки бактериальной колонии в симпласте растительной клетки.

3. Перенос на мембрану симбиосомы белков комплекса Agr2/3, который регулирует формирование и рост актинового цитоскелета, и, вызванное этим перемещением изменение конформации актинового цитоскелета в инфицированных клетках, является фактором, обеспечивающим рост симбиосом.

4. Изменение вектора переноса мембран в направлении симбиотического интерфейса в инфицированных клетках зависит от Ca^{2+} сенсоров из группы синаптоагминов, участвующих в регенерации поврежденных мембран. Индукция избыточного синтеза мембран эндоплазматического ретикулума в инфицированных клетках клубенька, вероятно, зависит от генов ответа на стресс эндоплазматического ретикулума.

5. Высокая чувствительность корневого клубенька к солевому стрессу, а также ускоренное старение инфицированных клеток, обуславливается эндогенными дефектами транспорта ионов калия и выноса ионов натрия из инфицированной клетки.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена использованием современных методов, коллегиальностью исследований, проведением статистической обработки полученных результатов, несколькими повторностями экспериментов.

Материалы диссертации были опубликованы в международных журналах с рейтингом Q1, и представлены на научных конференциях:

V Всероссийская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий». Санкт-Петербург, 2021; XVII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation, Madrid, Spain, 2019; 20th International Congress on Nitrogen Fixation, Granada, September 2017; 12th European Nitrogen Fixation Conference, Budapest, Hungary, 2016; 36 New Phytologist Symposium, Munich, Germany, 2015; European Nitrogen Fixation Congress, 2014, Tenerife, Spain; II IBEMPA CONGRESS, SEVILLA (SPAIN), 2013; European Nitrogen Fixation Conference, Geneva, Switzerland, 2010; 8th European Nitrogen Fixation Conference, Ghent, Belgium, 2008; IV Moscow International Congress «Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development», 2007.

Личный вклад автора и связь с плановыми исследованиями и научными программами.

Диссертация выполнялась лично Федоровой Е.Э. в 2005-2024 гг в соответствии с планом научных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения

науки Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы. Раздел VI. Биологические науки, подраздел 56. «Физиология и биохимия растений, фотосинтез, взаимодействие растений с другими организмами», Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2021-2025 годы. Раздел VI. Биологические науки, подраздел 56. «Физиология и биохимия растений, фотосинтез, взаимодействие растений с другими организмами», № 122042700043-9 и поддержкой Министерства науки и образования № АААА-А19-119041690042-7, № 122042700043-9, №.0087-2019-0013. Часть исследований были выполнены при поддержке совместного гранта Нидерландской организации научных исследований (NWO) и Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ) 047.018.001, в котором автор участвовала как руководитель секции 7 по выполнению проекта «Анализ транскриптома и идентификация ключевых игроков в формировании и поддержании симбиосом», а также персонального гранта РФФИ 19-04-00570. Исследования выполнены автором лично или при непосредственном участии. Автор осуществляла постановку задач, планирование, формирование коллектива, анализ полученных результатов, подготовку публикаций и докладов на международных и всероссийских конференциях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 36 статей, из них 31 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 228 страницах, содержит 68 иллюстраций и 4 таблицы, список литературы включает 416 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **Главе 1** представлен обзор литературы, в котором изложены сведения о развитии и функционировании корневого клубенька, развитии симбиоза и роли внутриклеточных мембран в поддержании внутриклеточной колонии азотфиксирующих бактерий.

В **Главе 2** изложены **Материалы и методы исследований.**

Растительный материал, штаммы клубеньковых бактерий и условия выращивания растений. Растения люцерны усеченной (*Medicago truncatula*) и сои (*Glycine max*) выращивали в вегетационной камере при 16-ч освещении и температуре 21°C. Для получения клубеньков проростки люцерны инокулировали бактериями *Sinorhizobium meliloti* 2011. Проростки сои инокулировали *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110.

Подбор генов для исследований. Для поиска генов использовали доступные базы данных геномных последовательностей: <https://www.uniprot.org>, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Анализ экспрессии генов *in silico*. Уровень экспрессии генов, намеченных для исследований, предварительно оценивали, используя базу данных портала Symbimics <https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics> (Roux et al., 2014).

Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени. РНК выделяли из корней и корневых клубеньков с помощью набора для выделения РНК из растительных тканей (Qiagen), набора для выделения РНК (Evrogen). РНК транскрибировали в кДНК с помощью набора для синтеза кДНК iScript (Bio-Rad), набора для транскрипции (Evrogen). ПЦР в реальном времени проводили в 20-луночной реакционной системе с использованием iQSYBR Green Supermix (Bio-Rad).

Дизайн праймеров, специфичных для генов, осуществлялся с использованием программы PRIMER 3-PLUS (Untergasser et al., 2007). Как референсные гены использовали гены домашнего хозяйства *cons6*, *Mtc27*, *MtGAPDH* для генов растения-хозяина и *SMc00128* для генов бактерии.

Клонирование генов и приготовление диагностических генетических конструктов. Открытые рамки считывания генов были амплифицированы методом ПЦР из кДНК клубеньков с использованием PhusionTaq-полимеразы и направленно клонированы в pENTR-D-TOPO (Invitrogen). pENTR клоны были рекомбинированы в один из Gateway-совместимых бинарных векторов с использованием LRClonase (Invitrogen). Для переноса плазмид в корни и клубеньки выполнялась трансформация с использованием штамма *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 (Limpens et al., 2004).

Исследование ответа корневого клубенька на солевой стресс. Растения люцерны подвергали солевому стрессу (100 мМ NaCl). Для анализа использовали корневые клубеньки, расположенные на боковых корнях.

Цитологические исследования. Трансгенные корни и клубеньки отбирали на основе экспрессии GFP или DsRED1 с помощью бинокюляра. Анализ распределения белков проводили с использованием специфических антител (GenScript, США). Для исследования распределения компонентов клеточной стенки использовали соответствующие антитела (PlantProbes, Великобритания) или специфичную окраску. Срезы контрастировали FM4-64 или йодистым пропидием (PI).

Для дифференциального окрашивания цитоскелета использовали антитела против тубулина (Sigma), актин маркировали с помощью Bodipy Phalloidin FL (Molecular Probes, США). Использовались конфокальные лазерные микроскопы Zeiss LSM 510 и Meta LSM 510 (Leica). Образцы для электронной микроскопии фиксировали в 4% параформальдегиде, смешанном с 0,3% или 3% глутаральдегидом в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, и заливали в смолу LRwhite (Fedorova et al., 1994). Для иммунодетекции с использованием электронной

микроскопии никелевые сетки со срезами блокировали и инкубировали с первичными антителами, для детекции использовали вторичные антитела, меченные коллоидным золотом с частицами размером 15 нм или 10 нм (BioCell, New Delhi, Индия).

Анализ распределения ионов в ткани корневых клубеньков. Анализ проводили на низкотемпературном сканирующем электронном микроскопе Zeiss DSM-960 с функциями энергодисперсионной спектроскопии и рентгеновского микроанализа (Pentaflet, Великобритания). Для анализа корневые клубеньки замораживали в жидком азоте, скалывали по длинной оси и анализировали. Количественный анализ элементов проводился с использованием стандартных процедур коррекции ZAF (атомный номер, поглощение и флуоресценция) с помощью программы Link Isis, версия 3.2 (Оксфорд, Великобритания). Для определения значимости различий между средними значениями наборов данных использовался t-тест Стьюдента.

Анализ протеолитической активности вакуолей корневых клубеньков. Срезы клубеньков окрашивали 0,001 % раствором нейтрального красного в буфере PBS, pH 7.4 и фотографировали после 1 ч инкубации. Для контроля специфичности реакции покровное стекло удаляли и добавляли 400 мкл смеси ионофоров 20 мкМ карбонилцианида м-хлорофенилгидразона (CCCP) и 1 мкМ валиномицина для диссипации мембранного градиента. Для анализа литической активности вакуолей срезы клубеньков толщиной 50-100 мкм помещали в раствор флуоресцентных зондов: 7-амино-4-метилкумарина CBZ-L-фенилаланин- L-аргинин амид гидрохлорида (AMC), субстрата сериновых протеаз, и родамина 110, бис-(CBZ-L-фенилаланин- L-аргинин амид дигидрохлорида), (RPA), субстрата цистеиновых и сериновых протеаз на 3 ч и затем просматривали в эпифлуоресцентном микроскопе в соответствующих пробах режимах.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

В процессе развития симбиоза ризобии переходят в симпласт клетки-хозяина и становятся временными азотфиксирующими внутриклеточными органеллами, каждая из которых окружена мембраной, производной цитоплазматической мембраны. Идентичность мембраны является ключом к прогнозированию уровня и спектра мембранного транспорта, а в симбиотических отношениях обеспечивает выживание азотфиксирующих бактериоидов.

В клетках эукариотических организмов присутствуют белки, которые участвуют в процессах транспорта и слиянии везикул. В исследованиях биогенеза органелл и транспорта через их мембрану, эти белки используются как маркеры идентичности мембран. К маркерам идентичности пути эндоцитоза относятся белки малых GTPаз Rab5 и Rab7, участвующие в сортировке белков от аппарата Гольджи к вакуоли (Tse et al., 2004),

также маркерами идентичности являются белки SNARE (N-этилмалеимид чувствительные белковые рецепторы факторов связывания) (Borchers et al., 2021).

3.1. Идентичность симбиосом. Для выяснения статуса симбиосом в инфицированной клетке и ответа на вопрос, как симбиосомы избегают литического уничтожения и слияния с вакуолью и какие молекулярные механизмы предотвращают их уничтожение, нами было исследована роль эндосомальных белков и белков тонопласта на мембранах симбиосом. Для диагностики были выбраны регуляторные малые GTPазы семейства Rab, а также белки SNARE (N-этилмалеимид чувствительные белковые рецепторы факторов связывания), являющиеся маркерами идентичности пути эндоцитоза в клетках животных и дрожжей (Behnia, Munro, 2005; Lipka et al., 2007). Мы исследовали трансгенные клубеньки люцерны и сои, несущие малые GTP-азы Rab5, Rab7 и SNARE MtSYP22, которые были помечены GFP (Limpens et al., 2009, Ivanov et al., 2012, Gavrin et al., 2014, 2015). По результатам исследований, белок MtRab5, маркер ранних эндосом, не был найден на симбиосомной мембране ни на одной из стадий развития, хотя метка была найдена на эндосомах инфицированных клеток. Таким образом, было показано, что симбиосомы при вхождении в клетку не приобретают идентичности ранней эндосомы, что, вероятно, позволяет избежать быстрого лизиса (Рис.1).

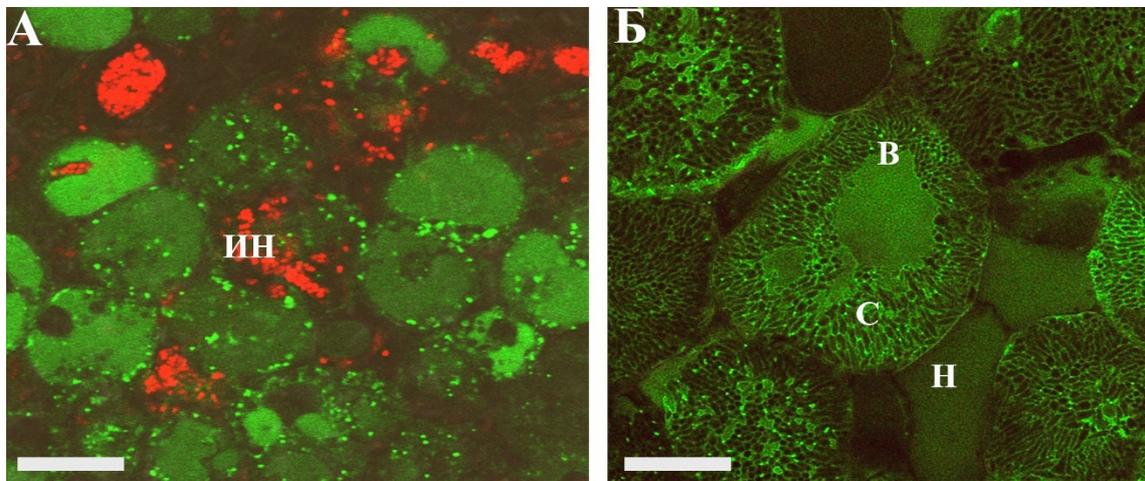


Рис.1. Распределение белка MtRab7 в молодой инфицированной клетке. (А) молодая клетка на этапе инфицирования, бактерии помечены красным флуорофором, ИИ-инфекционная нить, Н-неинфицированная клетка. Эндосомы, помечены зеленым флуорофором GFP, присутствуют как в инфицированной, так и в неинфицированной клетке; Б-зрелая инфицированная клетка (ИК), заполненная симбиосомами(СМ), мембраны симбиосом и тонопласт (ВаК) несут зеленый флуорофор, метку Rab7-GFP. Масштабная линейка = 10µm.

В процессе созревания симбиосомы приобретали идентичность молодых вакуолей, но избегали слияния с вакуолью инфицированной клетки (Ivanov et al., 2012, Gavrin et al., 2016). Так, вакуолярный белок SNARE MtSYP22, меченый GFP(Рис.2А), появлялся на мембранах зрелых симбиосом в начале процесса азотфиксации (Рис.2В).

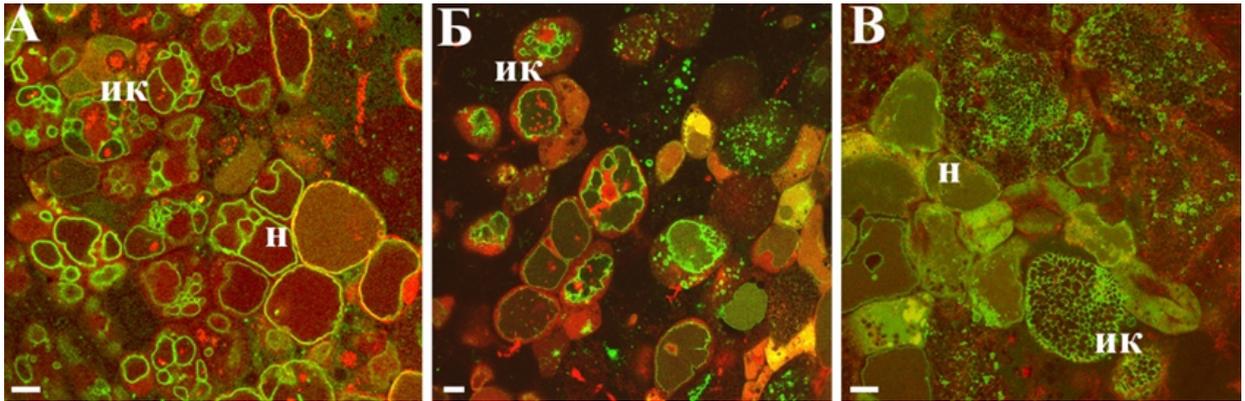


Рис.2. Распределение белка MtSYP22 в клетках клубенька в процессе развития симбиоза. Белок MtSYP22 (зеленый флуорофор) находится на тонопласте (А, Б) в инфицированных (ИК) и неинфицированных (Н) клетках, и на симбиосомной мембране в зрелых инфицированных клетках (В). Масштабная линейка =10μm. ИК–инфицированная клетка, Н–неинфицированная клетка.

Была предложена гипотеза, что ингибирование процесса удаления бактерий связано с задержкой приобретения мембраной симбиосомы идентичности вакуоли и изменения литических свойств вакуоли инфицированной клетки.

3.2. Протеолитическая активность и кислотность вакуолей в корневых клубеньках.

В корневых клубеньках *M.truncatula* проанализировали протеолитическую активность вакуолей (Рис.3) с использованием флуоресцентных зондов АМС (субстрата сериновых протеаз) и RPA (субстрата цистеиновых и сериновых протеаз). Для анализа pH использовали ацидотропный краситель Нейтральный красный (НК).

В клетках клубеньков активность обоих зондов отмечалась только в вакуолях неинфицированных клеток (Рис.3).

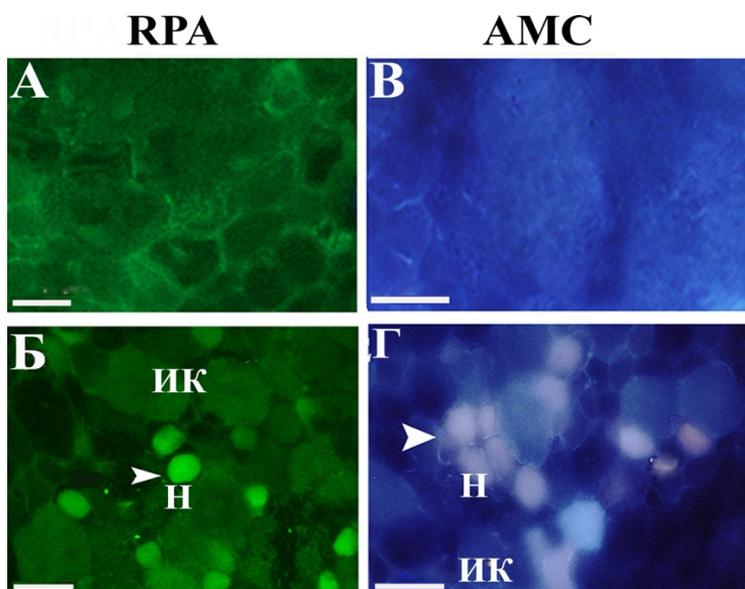


Рис.3. Анализ распределения литической активности в клетках клубенька. (А,Б) – автофлуоресценция ткани до загрузки зондов, (В,Г) – распределение литической активности ткани после загрузки ткани с использованием зондов RPA и АМС. ИК– инфицированная клетка, Н–неинфицированная клетка. Стрелками показаны вакуоли неинфицированных клеток, в люмене которых отмечается высокая флуоресценция зондов (Fedorova, Brown, 2007). Масштабная линейка= 50 μm.

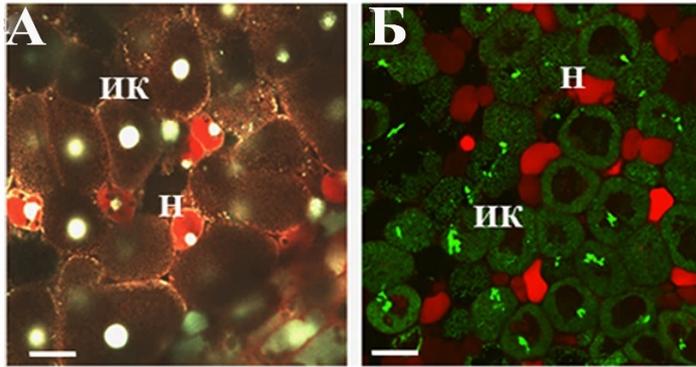


Рис.4. Анализ кислотности вакуолей в клубеньках сои (А) и люцерны усеченной (Б) методом конфокальной микроскопии с использованием НК. ИК–инфицированная клетка, Н–неинфицированная клетка. Масштабная

Согласно анализу рН с использованием ацидотропного красителя (Рис.4), кислый рН сохранили только вакуоли неинфицированных клеток.

В дальнейшем были изучены молекулярные механизмы, которые приводят к дефункционализации вакуолей инфицированных клеток (Gavrin et al., 2014).

3.3. Молекулярные механизмы дефункционализации вакуоли инфицированной клетки, экспрессия и локализация генов вакуолярного комплекса HOPS.

Для выявления молекулярных механизмов, приводящих к дефункционализации вакуолей, были исследованы экспрессия и расположение в клетке белков, принадлежащих к тетеринговому комплексу HOPS, который включает вакуолярные сортирующие белки (VPS): VPS11, VPS16, VPS18, VPS33, VPS39 и VPS41 и является ключевым регулятором, участвующим в формировании вакуоли (Balderhaar, Ungermann, 2013).

Была проанализирована экспрессия генов VPS11 и VPS39, а также была выполнена визуализация экспрессии в ткани с использованием метки промотора β-глюкуронидазой (GUS) в корневых клубеньках. Анализ показал, что промоторы этих генов были активны в неинфицированных клетках меристемы, в клетках периферических тканей и в зоне инфекции, тогда как в инфицированных клетках зоны азотфиксации экспрессия этих генов была подавлена (Рис.5).

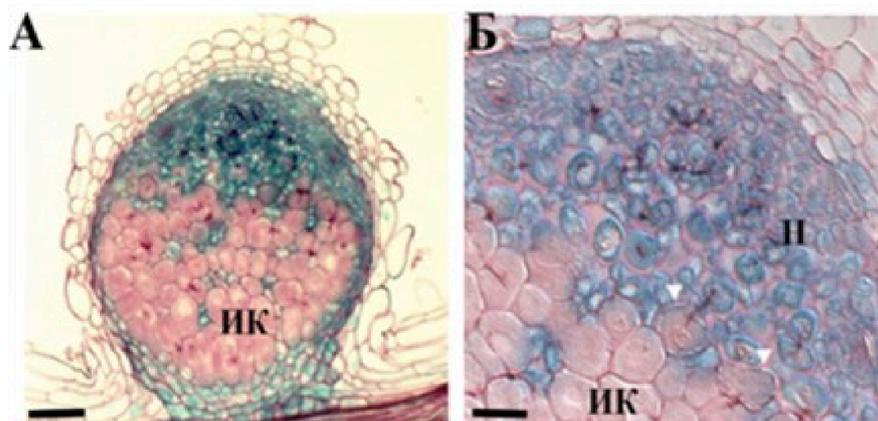


Рис.5. Анализ распределения зон экспрессии MtVPS11 в клубеньках. Экспрессия (синее окрашивание), инфицированные клетки (ИК) окрашены розовым (А,Б). Масштабная линейка: А=75µm, Б=25 µm.

Репрессия комплекса HOPS, вероятно, является причиной дефункционализации вакуоли в зоне активной азотфиксации корневого клубенька, что создает возможность выживания внутриклеточной бактериальной колонии.

3.4. Изменения размеров и архитектуры инфицированной клетки в процессе симбиоза. Динамика объема клеток была оценена количественно с использованием конфокальной микроскопии трансгенных клубеньков, в которых был экспрессирован вакуолярный SNARE SYP22 с меткой GFP (Gavrin et al., 2014) (Рис.6). Микрофотографии, снятые в последовательности по вектору с поверхности вглубь ткани (Z-стеки), использовались для трехмерной реконструкции и количественной оценки объемов в программе IMARIS.

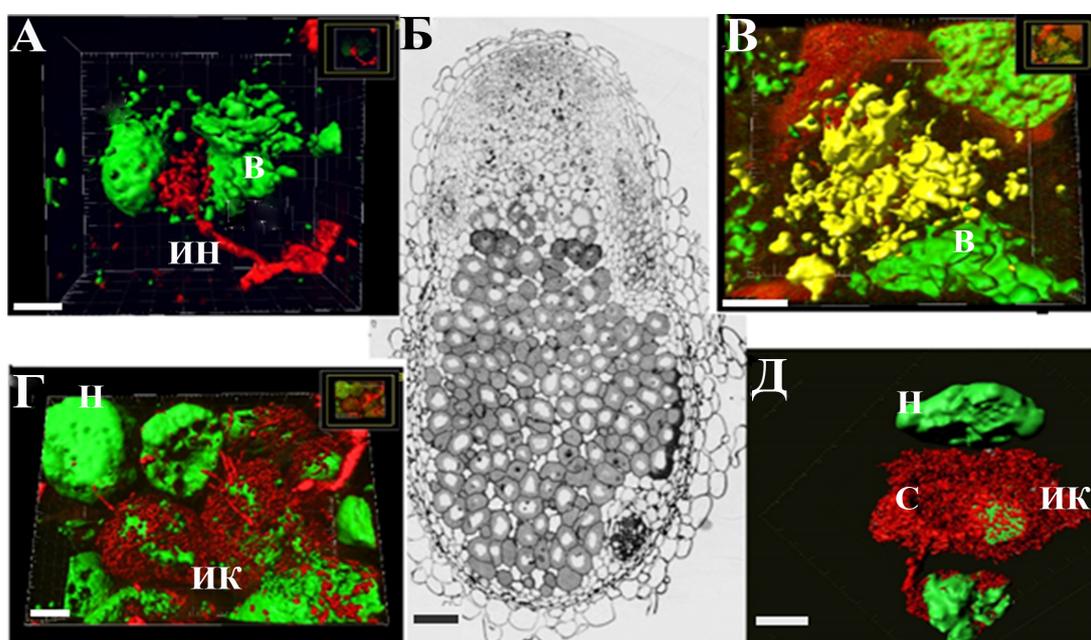


Рис.6 А,Б,В,Г,Д. Динамика изменения объемов клеток, вакуоли и симбиосом в процессе развития симбиоза. Вакуоли помечены зеленым флуорофором, бактерии помечены красным флуорофором. Желтым помечена вакуоль в процессе измерения объема. (В)-вакуоль,ИН-инфекционная нить, С-симбиосомы.ИК-инфицированная клетка.Масштабная линейка (А)=100 μ m, (Б)=25 μ m, (В,Г)=75 μ m, (Д)=5 μ m, (Е,Ж)=10 μ m.

Анализ изменений объемов клеток и компартментов (Рис.6) показал, что в слоях зоны азотфиксации абсолютный объем вакуолей уменьшился в 4 раза, а абсолютный объем симбиосом увеличился в 2,5 раза, вследствие чего симбиосомы были способны занять около 65% объема клетки (Рис.6Д).

Был сделан вывод, что дефункционализация вакуоли является общей биологической особенностью инфицированных клеток в симбиозе, обуславливая возможность ее колонизации ризобиями и последующего процесса азотфиксации.

3.5. Маркеры пути секреции на симбиосомной мембране люцерны и сои и их роль в развитии симбиоза.

Развитие инфицированных клеток клубеньков приводит к росту внутриклеточной бактериальной колонии, как по числу бактерий, так и по их объему. Этот процесс предполагает соответствующее увеличение объема клетки-хозяина и формирование интерфейса между цитоплазмой хозяина и бактериями - симбиосомной мембраны, что обуславливает необходимость участия пути секреции, и белков, участвующих в перенаправлении и слиянии мембран (Brewin, 2004, Tsyganova et al., 2021).

Слияние везикул пути секреции контролируется группой белков из группы SNAREs, как правило, комплекс образуют один SNARE-белок, расположенный на транспортной везикуле (v-SNARE), vesicle-associated membrane protein (VAMP), и три SNARE-белка, которые находятся на мембране-мишени (t-SNARE) (Bassham, et al., 2008) (Limpens et al., 2007, Ivanov et al., 2012, Zhang et al., 2015, Gavrin et al., 2017).

Были исследованы белки семейства VAMP72 в клубеньках люцерны усеченной и сои (Ivanov et al., 2012, Gavrin et al., 2017). В корнях и в клубеньках люцерны усеченной при сравнении уровня экспрессии были отобраны для дальнейшего анализа гены группы VAMP72: *MtVAMP721a*, *MtVAMP721d* и *MtVAMP721e* (Ivanov et al., 2012), экспрессия которых была максимальной в клубеньках. В клубеньках сои по этим же критериям были отобраны гены сои *GmVAMP721d* и *GmVAMP72a* (Gavrin et al., 2017).

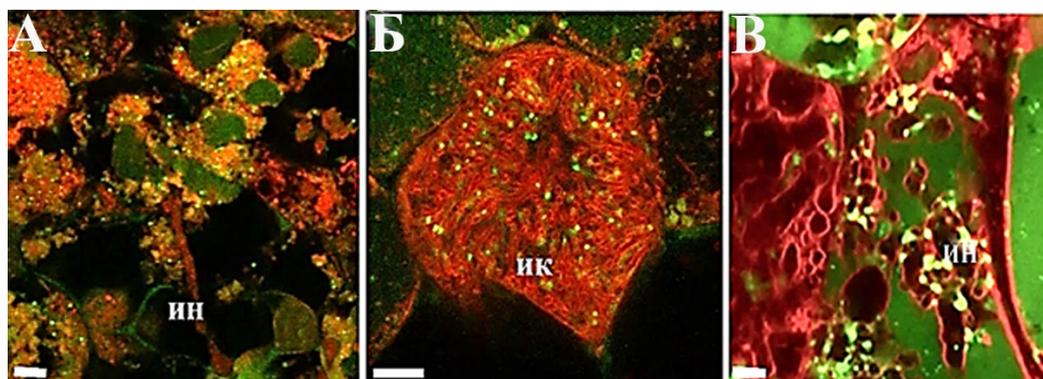


Рис.7. Распределение белка *MtVAMP721d* и *GmVAMP721d* в клетках клубенька люцерны (А,Б) и сои (В). ИИ-инфекционная нить, ИК-инфицированная клетка. Белок помечен GFP (зеленый флуорофор). Симбиосомные мембраны окрашены FM64 (красный флуорофор). Масштабная линейка: (А,Б) =25μm, (В) =1μm

Была определена субклеточная локализация белков, кодируемых этими генами, с использованием метода иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии на клубеньках, полученных на трансгенных корнях, в которых открытая рамка считывания гена была помечена GFP (Рис.7А,Б,В), белки были выявлены в локальных областях вблизи

инфекционных нитей, где формируются бесстенные капли и начинают развиваться симбиосомы.

Для выяснения функциональной роли белков был использован метод частичного ингибирования экспрессии генов методом РНК-интерференции двух генов. Для люцерны была одновременно блокирована экспрессия *MtVAMP721d* и *MtVAMP721e*, а для сои одновременно блокировали экспрессию *GmVAMP72d* и *GmVAMP72a* (Ivanov et al., 2012, Gavrin et al, 2017). Нокаут генов приводил к уменьшению уровня экспрессии в корневых клубеньках вплоть до 80%. Цитологическое исследование показало, что в трансгенных клубеньках люцерны и сои (Рис.9 А,Б,В,Г), в клетках наблюдались крупные бактериальные кластеры (Б,Г) подобные инфекционным нитям, но выход бактерий в симпласт клетки и формирование «бесстенных» капель», лишенных клеточной стенки, было блокировано (Рис.9А,Б).

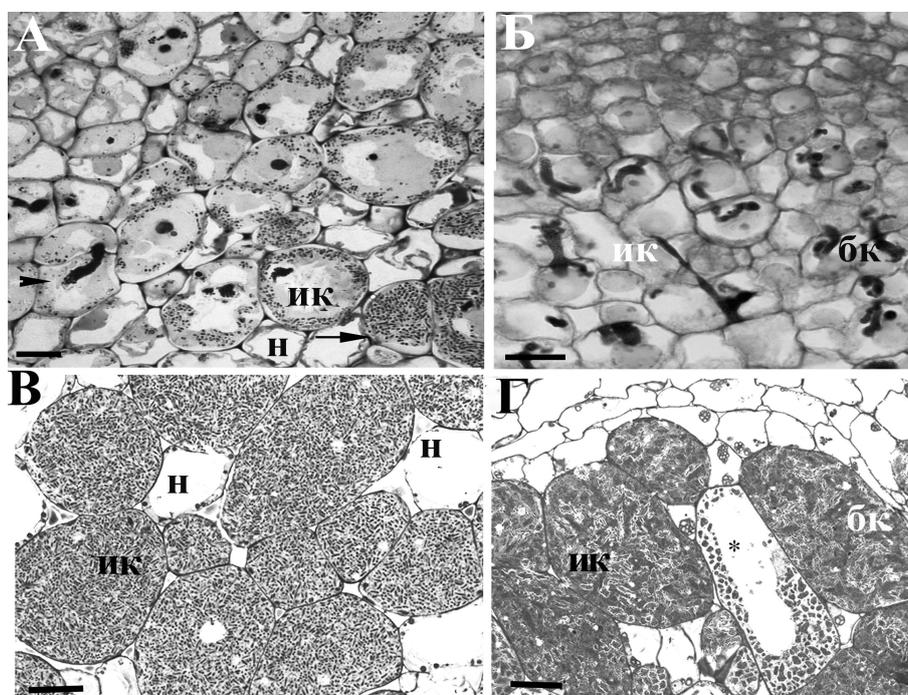


Рис. 9. Фенотип трансгенных клубеньков люцерны и сои при нокауте генов пути экзоцитоза из группы *VAMP721*. Ткань клубеньков, контроль (А) и ткань трансгенных клубеньков с нокаутом генов группы *VAMP721* (Б) люцерны и контроль (В) и нокаут генов группы *VAMP721* в клубеньках сои (В, Г). ик-инфицированная клетка, н-неинфицированная клетка. Масштабная линейка: А, Б = 25 μm , В, Г = 50 μm .

Для выяснения, какие именно компоненты клеточной стенки зависят от транспорта, который обеспечен белками *VAMP721d/a*, были проанализированы компоненты клеточных стенок: целлюлоза, каллоза, метил-этерифицированный и де-этерифицированный пектин, арабиногалактан, рамногалактуронанан II (Gavrin et al., 2017), отличие было найдено только в распределении пектина. Ризобии в трансгенных клубеньках были погружены в матрицу, которая содержала как метил-этерифицированный, так и де-метил-

этерифицированный пектин, в отличие от контрольных клубеньков, где была найдена только метил-этерифицированная форма пектина.

При дальнейшем исследовании было показано, что VAMP721d-позитивные везикулы вовлечены в доставку ферментов ремоделирования клеточной стенки, а именно фермента пектат-лиазы (Gavrin et al., 2016). Уменьшение экспрессии приводило к обогащению стенок де-метил-этерифицированным пектином, менее эластичным и более адгезивным, что нарушало выход бактерий в цитоплазму клеток. Недавно наши результаты были подтверждены работой группы Томаса Отта (Su et al., 2023), которая показала роль специфической пектин метилэстеразы и пектат-лиазы в процессах выхода бактерий в симпласт клетки клубенька.

3.6. Механизмы таргетированного мембранного транспорта и регуляция доступности мембранных ресурсов в симбиозе. Поскольку цитоплазматическая мембрана неэластична и не может растягиваться более чем на 3% (Apodaca, 2002), то наблюдаемое кратное увеличение объема инфицированной клетки, также как формирование симбиотического интерфейса для нескольких тысяч бактерий, зависит от синтеза нового мембранного материала.

Увеличение площади мембраны у растений зависит от направленного экзоцитоза, классическими примерами являются рост кончиков корневых волосков и пыльцевых трубок. В регуляции слияния мембран участвуют синаптотагмины, кальциевые сенсоры, которые регулируют связь эндоплазматического ретикулула и цитоплазматической мембраны в ответ на растяжение мембраны (Benavente *et al.*, 2021).

Чтобы проверить гипотезу о возможном участии синаптотагминов в таргетированной доставке и изменении вектора движения мембран к симбиотическому интерфейсу, был выбран *MtSyt1*, гомолог белка арабидопсиса *AtSYT1* который участвует в восстановлении поврежденных мембран (Scharpire *et al.*, 2008), и два других гомолога *M. truncatula* с высокой экспрессией в корневых клубеньках: *MtSyt2*, *MtSyt3* (Gavrin et al., 2017).

Для анализа функциональной роли синаптотагминов были созданы промотор-GUS конструкторы, содержащие область 2,5 кб от начала трансляции *MtSyt1*, *MtSyt2* и *MtSyt3*, слитую с GUS (Рис.10). Наиболее высокий уровень экспрессии был показан для клеток, которые находятся в процессе деления, быстрого роста и растяжения, таких как клетки меристемы, молодые клетки в процессе инфицирования и роста. (Рис.10)(Gavrin et al., 2017).

Для изучения внутриклеточной локализации синаптотагминов в корневых клубеньках и корнях, были использованы генетические конструкторы, экспрессирующие GFP в С-концевой

позиции этих генов под контролем их соответствующих 2,5 кб нативных промоторов (рис.11).

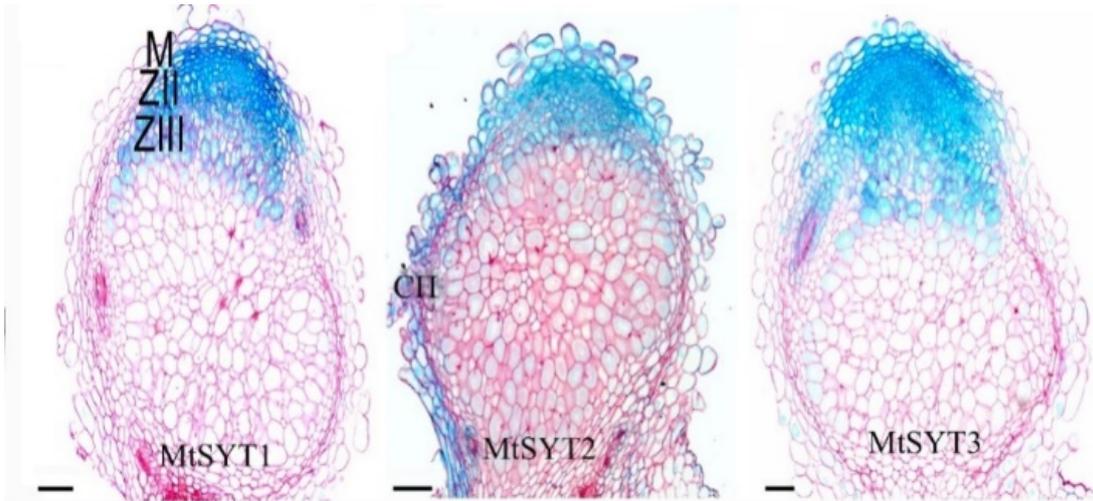


Рис.10. Экспрессия генов *Syt1*, *Syt2* и *Syt3* в клубеньках. Синим цветом помечены зоны экспрессии. Масштабная линейка=100 μ m.

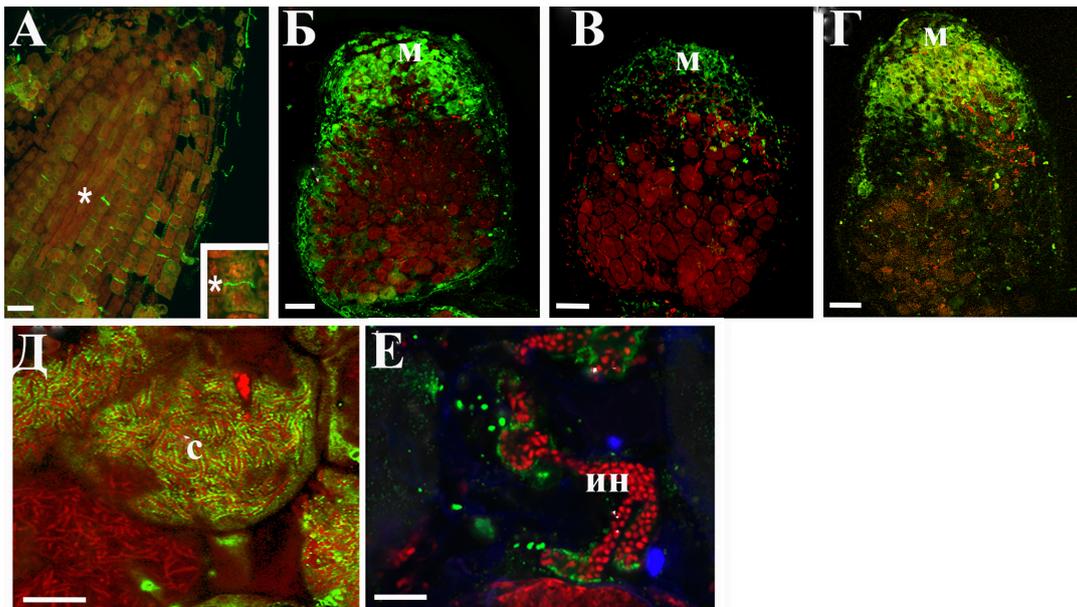


Рис.11. Синаптоагмины в корневом клубеньке. СП - сосудистый пучок; ВБ- выход бактерий; ИН - инфекционная нить; М - меристема; С – симбиосомы. Цветовые коды: синаптоагмины: зеленая флуоресценция, ризобии и ядра клетки-хозяина: красная флуоресценция. Масштабная линейка: (А-Г) = 100 μ m, (Д) = 25 μ m, (Е) = 5 μ m.

Высокий уровень флуоресцентного сигнала ProMtSyt1:MtSyt1-GFP (Б), ProMtSyt2:MtSyt2-GFP (В), ProMtSyt3:MtSyt3-GFP (Г) был отмечен в зоне меристемы корня (А) и клубеньков.

3.7. Возможные причины избыточного синтеза мембран эндоплазматического ретикулума, как источника мембран симбиотического интерфейса.

Эффективный азотфиксирующий симбиоз невозможен без изменения эндоmembран инфицированной клетки и формирование мембранного интерфейса между клеткой растения-хозяина и бактерией, дополнительный синтез мембран предполагает наличие специфичных индукционных механизмов (Fedorova, 2023). Эндоплазматический ретикулум (ЭР) всегда рассматривался как один из источников мембран для формируемых симбиосом (Roth, Stacey, 1989), но причины его избыточного синтеза в инфицированных клетках неизвестны. Одной из реакций растительной клетки на стресс ЭР являются структурные изменения выраженные в увеличение объема ЭР мембран (Zhang *et al.*, 2012). Таблица 1. Гены ЭР стресса, которые экспрессируются в клубеньках *M. truncatula* в зонах развития симбиоза.

Название гена	Номер	Функции	Экспрессия (%)				
			FI	FII _d	FII _p	IZ	ZIII
IRE1	Mt0005_109 18	Ответ на стресс ЭР	17	15	16	24	26
VIP3	Mt0009_007 22	Маркер ЭР-стресса, отвечающий на наличие неправильно сформированных белков	20	22	31	19	8
Bag7 (BCL-2-)	Mt0061_100 07	Участвует в ответе на ЭР-стресс	40	34	18	5	2
Hmg1p (Hmg1)	Mt0020_101 13	Karmella (участвует в увеличении объема сформированного ЭР в случае сверхэкспрессии).	44	32	12	3	8

Мы провели *in situ* анализ (Roux *et al.*, 2014) экспрессии генов индукции стресса ЭР (Semenova *et al.*, 2024) результаты анализа показали, что в зоне меристемы и в зонах инфицирования клубенька (FI, FII, IZ) индуцирована экспрессия генов-ER стресса IRE1, VIP3, Bag7, Hmg1p, также экспрессия IRE1 индуцирована в зоне азотфиксации (зоне III) (Read *et al.*, 2021, Li *et al.*, 2021), что может быть одной из причин избыточного синтеза мембран ЭР.

3.8. Молекулярные механизмы модификации цитоскелета в процессе развития симбиоза. Внутриклеточная архитектура растительных клеток в значительной степени

основана на функционировании цитоскелета клетки клубенька, формируемого из актиновых микрофиламентов и тубулиновых микротрубочек.

Изменение конфигурации актинового цитоскелета зависит от динамики сборки и роста актиновых волокон, что в свою очередь, зависит от формина (Aspenstrom, 2010), и комплекса ARP2/3, который участвует в создании разветвленных сетей микрофиламентов (Campellone, Welch, 2010). Манипулирование сетью актиновых микрофиламентов клетки-хозяина через ARP2/3 комплекс отмечено в клетках животных при бактериальной инфекции (Welch, Way, 2013). Нами была исследована функциональная роль гена *ARP3* в корневых клубеньках *M. truncatula* (Gavrin et al., 2015).

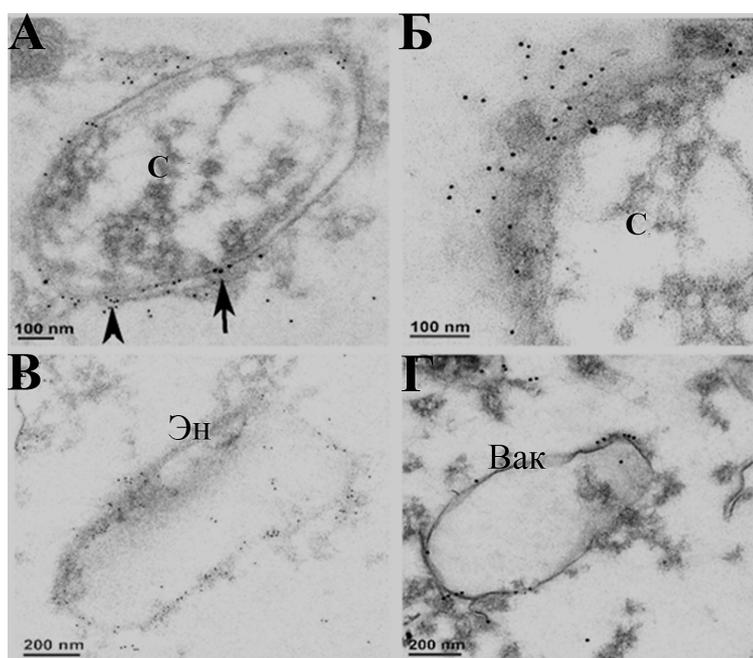


Рис.13. Распределение волокон актина (наконечник стрелки), меченого коллоидным золотом (10 нм), и белка ARP3(15 нм) (стрелка) в клетках клубенька (А,Б), показало, что метки расположены на мембране симбиосомы (С) и филаментах, включая филаменты, которые расходятся от точки, расположенной на симбиосомной мембране.

Частицы коллоидного золота, маркирующие белок ARP3(15 нм) и актин (10 нм) были отмечены также на мембранах эндосом (Эн) и молодых вакуолей (Вак) (Рис.13 В,Г). Масштабная линейка: А,Б=100 нм, В,Г=200 нм.

Для уточнения связи между этапом развития симбиосомы и ARP3, было использовано частичное блокирование экспрессии гена методом РНК-интерференции (Рис.14).

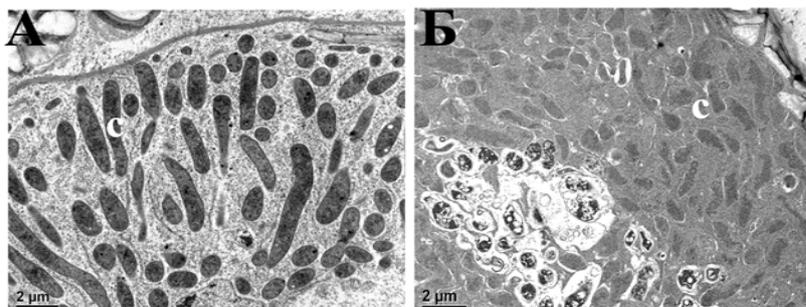


Рис.14. Фенотип клубеньков *Medicago truncatula* при частичном блокировании экспрессии ARP3. (А) – контроль, (Б) – частичное блокирование экспрессии ARP3. См-симбиосомы. Масштабная линейка = 2 μm

При анализе клубеньков, образованных на трансгенных корнях, были отмечены изменения в анатомии клубеньков, в частности, были нарушены заключительные этапы дифференциации симбиосом и их роста (Рис.14).

Можно заключить, что процесс изменения конфигурации актинового цитоскелета, который зависит от комплекса ARP2/3, необходим для роста и созревания симбиосом.

3.9.Изменение транспорта и молекулярные механизмы распределения иона калия в ткани корневого клубенька *Medicago truncatula*. Чувствительность корневых клубеньков к стрессам, связанным с диспаритетом некоторых ионов, например к солевому стрессу, хорошо известна (Chakraborty, Harris, 2022). Можно предположить, что такая высокая уязвимость ткани корневого клубенька может быть обусловлена дефектами ионного баланса, характерными для ткани клубенька.

Для проверки этого предположения мы проанализировали динамику содержания ионов в клетках корневого клубенька методом низкотемпературной сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского микроанализа (Fedorova et al., 2021, Trifonova et al., 2022). Анализировалось распределение калия, натрия, магния, фосфора, хлора, кальция, железа, меди и молибдена.

Основное различие, обнаруженное в инфицированных клетках, было в изменении содержания калия, содержание его снижалось в онтогенезе инфицированных клеток. Уровень K^+ был достоверно ниже в симбиосомах и вакуолях зрелых и стареющих инфицированных клеток в сравнении с молодыми инфицированными клетками (Рис.15). Содержание K^+ в неинфицированных клетках было стабильным (Fedorova et al., 2021).

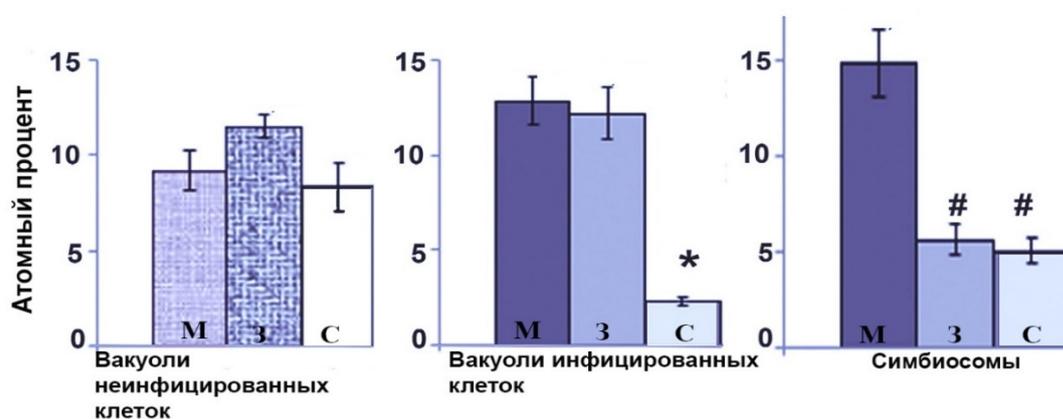


Рис.15. Распределение иона калия в вакуолях и симбиосомах молодых (м), зрелых (з) и старых (с) клеток корневых клубеньков. (*), (#) – отличие статистически достоверно.

За время жизни инфицированных клеток содержание K^+ в вакуолях и симбиосомах уменьшается в 3-5 раз. Исчерпание вакуолярного пула K^+ отмечалось в зоне прекращения

симбиоза (зоне 4), расположенной в базальной части клубенька, то есть через 15-18 дней (Рис.15).

Поскольку информация о регуляции транспорта K^+ в инфицированных клетках практически отсутствует, были изучены белки, вовлеченные в процессы транспорта калия в клубеньках люцерны усеченной (Fedorova et al., 2021). Для анализа были выбраны гены калиевых каналов растительных клеток, с противоположными векторами транспорта K^+ : внутренний выпрямляющий K^+ -канал, MtAKT1, и канал выходящего выпрямления (outward-rectifying) который опосредует высвобождение K^+ из клеток MtSKOR/GORK (Ragel et al., 2019, Fedorova et al., 2021).

Анализ экспрессии ProMtAKT1:GUS показал, что в клубеньках этот ген экспрессируется в меристематических клетках, коре и сосудистых пучках.

Для исследования распределения белка MtAKT1 в клетке клубенька использовали метку GFP с использованием собственного промотора гена: ProMtAKT1:GFP (Рис.16). Для выявления локализации белка MtSKOR/GORK использовали антитела, полученные против этого белка (Рис.17).

Таким образом, расположение белков MtAKT1 и MtSKOR/GORK в зрелых инфицированных клетках отличалось от распределения в неинфицированных или молодых инфицированных клетках. Оба белка в инфицированных клетках были частично утрачены с цитоплазматической мембраны (рис. 16, рис.17).

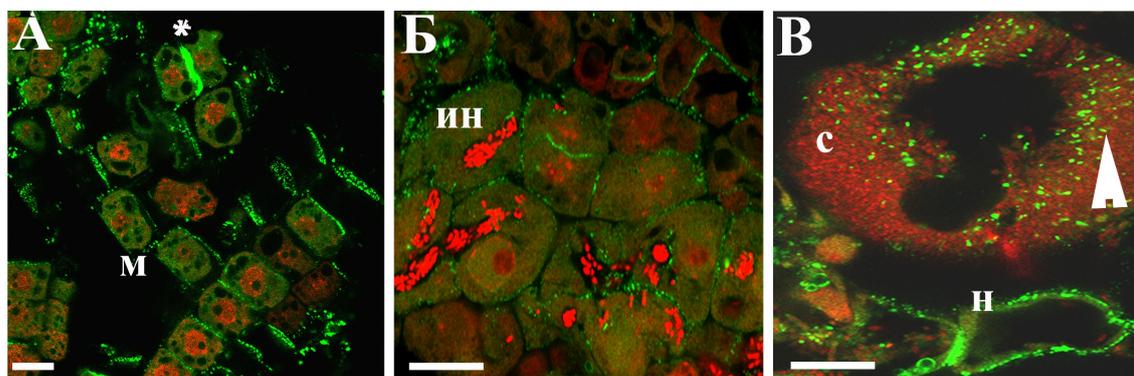


Рис.16. Иммуноцитологический анализ распределения белка MtAKT1 в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька. М-меристема, ИН-инфекционная нить, ИК-инфицированная клетка, Н-неинфицированная клетка. Ризобии и ядра контрастированы иодидом пропидия, красный флуорофор. Метка белка в меристеме (А) и молодых инфицированных клетках (Б) располагалась на цитоплазматической мембране. В зрелых инфицированных клетках (В) белок был потерян с цитоплазматической мембраны, и метка располагалась в виде точек в эндосомах, молодых вакуолях. В клетках меристемы (М) и в клетках, выходящих из цикла деления белок располагался на цитоплазматической мембране (Рис. 16 А, Б). Масштабная линейка: А=10 μm , Б=12,5 μm , В=25 μm . м-меристема, ин-инфекционная нить, с- симбиосомы

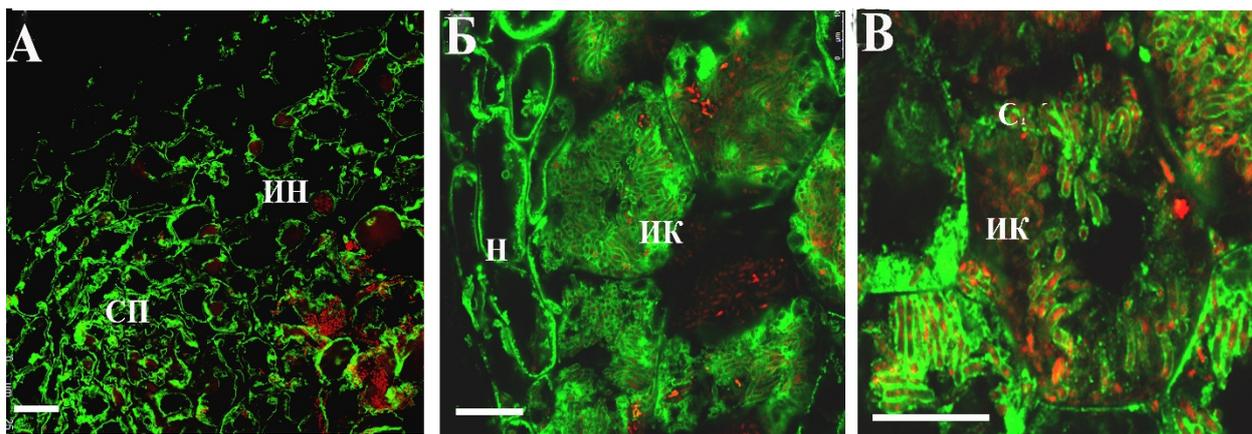


Рис.17. Распределение белка MtSKOR/GORK в корневом клубеньке. Белок MtSKOR/GORK в неинфицированных клетках был ассоциирован с цитоплазматической мембраной (А). В инфицированных клетках он был перераспределен на мембрану симбиосом, и частично утерян с цитоплазматической мембраны (Б,В). ИИ–инфекционная нить, ИК–инфицированная клетка, Н–неинфицированная клетка, СМ–симбиосомы. Масштабная линейка А=25µm, Б=25µm, В=10µm.

Для более точного выяснения распределения белков в цитоплазме инфицированных клеток был проведен анализ с использованием метки коллоидным золотом и электронной микроскопии. Анализ подтвердил данные конфокальной микроскопии, сигнал меченых золотом антител к MtAKT1 и MtSKOR/GORK был обнаружен на цитоплазматической мембране молодых клеток, в эндоплазматическом ретикулуме, в зрелых клетках сигнал был найден в эндосомах и вакуолях.

Таким образом, при исследовании расположения белков MtAKT1 и MtSKOR/GORK в клубеньках люцерны усеченной были отмечены различия в расположении белков обоих каналов между инфицированными и неинфицированными клетками клубеньков. В неинфицированных клетках клубенька уровень K^+ был стабильным, и они не подвергались преждевременному старению. Для проверки достоверности динамики наличия белка на цитоплазматической мембране была проведена сравнительная оценка интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью многоточечного анализа яркости в ImageJ. Анализ показал достоверное истощение белков обоих каналов на цитоплазматической мембране инфицированных клеток (Fedorova et al., 2021).

Потеря белков с мембран назначения представляет собой реальную инвалидизацию клетки растения хозяина, поскольку нарушает баланс ионов в клетке без возможности его восстановления. При этом наблюдаемые нарушения распределения обоих каналов – переносчиков калия были отмечены только в зрелых инфицированных клетках.

3.10. Влияние засоления на ионный транспорт в корневых клубеньках люцерны усеченной. Как было показано выше, наличие внутриклеточной бактериальной

колонии приводит к изменениям в ионном транспорте, отражением этого процесса служит изменение содержания калия в инфицированных клетках и симбиосомах.

Изменения доступности или избытка ряда ионов могут быть также причиной низкой толерантности корневых клубеньков к абиотическим стрессам, в частности, к солевому стрессу, и может быть связана с изменениями в механизмах, участвующих в исключении иона Na^+ из цитоплазмы хозяина, а также в недостатке K^+ , описанном выше. Данные о негативном влиянии солевого стресса на симбиоз хорошо известны и описаны в литературе (Chakraborty et al., 2021). Однако причины, лежащие в основе столь высокой чувствительности клубеньков к солевому стрессу, пока не выяснены.

Для выяснения динамики доступности ионов в корневом клубеньке при солевом стрессе был проведен анализ распределения ионов в зрелой азотфиксирующей части корневых клубеньков контрольных растений и растений, подвергшихся солевому стрессу. Спектр ионов измеряли в симбиосомах, вакуолях и цитоплазме клеток. (рис. 18А). Анализировали распределение натрия, калия, а также магния, фосфора, серы, хлора, кальция, железа, меди и молибдена (Trifonova et al., 2022). При анализе наблюдалось статистически значимое увеличение содержания Na^+ в цитоплазме, как инфицированных, так и неинфицированных клеток, а также в симбиосомах (Рис. 18).

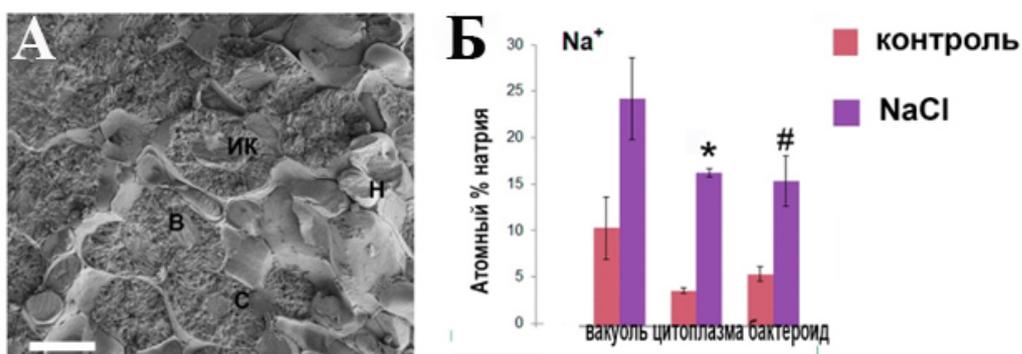


Рис.18. (А). Ткань корневого клубенька в процессе анализа. (Б) Уровень содержания натрия в вакуоли (В), цитоплазме и симбиосомах (СМ) в инфицированных клетках (ИК) и неинфицированных клетках (Н) клубенька в контроле и при солевом стрессе. (*),(#)-разница достоверна.

С учетом объема инфицированных клеток, при солевом стрессе они накапливали в 5 раз больше натрия, чем неинфицированные.

Поддержание баланса между натрием и калием зависит от белков/антипортеров $\text{K}^+/\text{Na}^+/\text{H}^+(\text{NHX})$ (Sze et al., 2018). В клетках арабидопсиса белки/антипортеры NHX способны транспортировать K^+ или Na^+ в вакуоль или эндосому в обмен на H^+ (NHX1-6), или осуществлять вынос ионов Na^+ из клетки в апопласт (NHX7/SOS1) (Bassil et al., 2018).

Для дальнейшего исследования нами были выбраны два белка группы NHX *M. truncatula*: MtNHX7 и MtNHX6. MtNHX7 является гомологом гена арабидопсиса AtNHX7(SOS1), белок *MtNHX6* является гомологом *AtNHX6* (Bassil et al., 2011,2018), в клетке он расположен на мембранах аппарата Гольджи, эндосом, пре-вакуолярного компартмента, и участвует в секвестрации K^+ или Na^+ с перенаправлением в просвет эндосом (Isayenkov et al., 2020). Для исследования локализации белка MtNHX7 (гомолог SOS1) в клетках клубенька использовали трансгенные клубеньки, несущие конструкт *ProNHX7:NHX7:GFP* (Trifonova et al., 2022), (Рис.19).

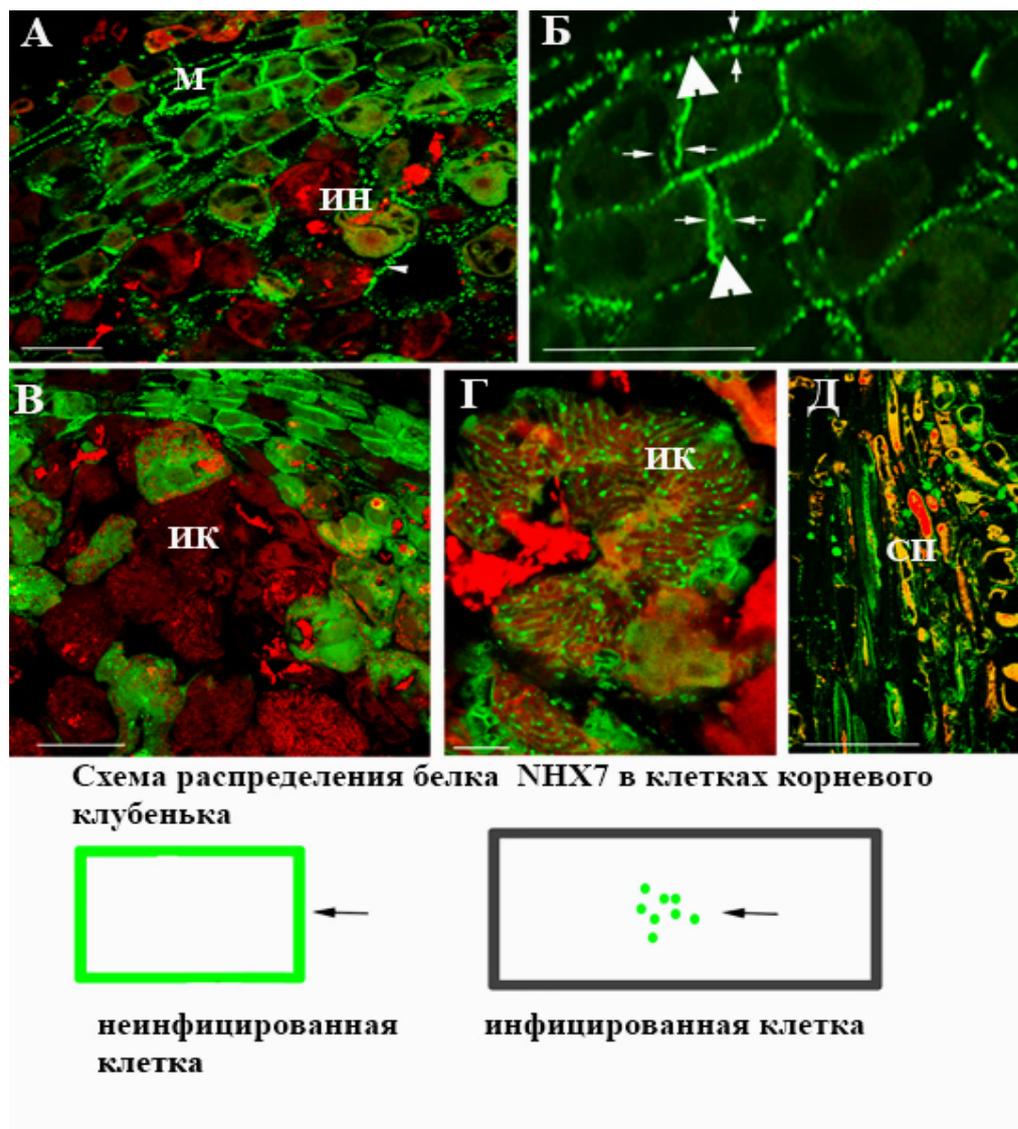


Рис.19. Иммуноцитологический анализ распределения белка MtNHX7 в клетках корневого клубенька. Цветовой код: красная флуоресценция - бактерии и ядра, окрашенные йодистым пропидием, зеленая флуоресценция –белок MtNHX7, меченый GFP. М–меристема, ИИ–инфекционная нить, ИК–инфицированная клетка, Н–неинфицированная клетка. Масштабная линейка:(А,Б,Д)=50 μ m ,В=25 μ m ,(Г)=10 μ m.

Сигнал белка MtNHX7 присутствовал на цитоплазматической мембране клеток коры, сосудистых пучков, меристематических клеток и молодых клеток клубеньков. Но в зрелых

инфицированных клетках уровень сигнала MtNHX7 на цитоплазматической мембране клетки был низким или отсутствовал, что указывает на дефекты распределения белка в сравнении с неинфицированными клетками (Рис. 19).

В клетках меристемы и дистальной зоне инфицирования иммуносигнал белка MtNHX6 присутствовал в цитоплазме и в тонопласте молодых вакуолей как в неинфицированных, так и в инфицированных клетках (Рис.20). В молодых клетках (меристема, зона инфицирования) сигнал присутствовал на небольших точечных структурах с размером 50-100 нм, то есть на эндосомах/везикулярных тельцах сети транс-Гольджи, а также на мембране тонопласта (стрелка), что отражает высокий уровень слияния эндосом с тонопластом. В зрелых инфицированных клетках происходила потеря сигнала белка MtNHX6 с тонопласта, что, возможно, связано с изменением уровня синтеза белка, при этом в неинфицированных клетках коры и в сосудистых пучках сигнал на тонопласте сохранялся. Это может свидетельствовать о перераспределении транспорта везикул пути эндоцитоза от вакуоли к другим структурам клетки, либо об уменьшении интенсивности эндоцитоза.

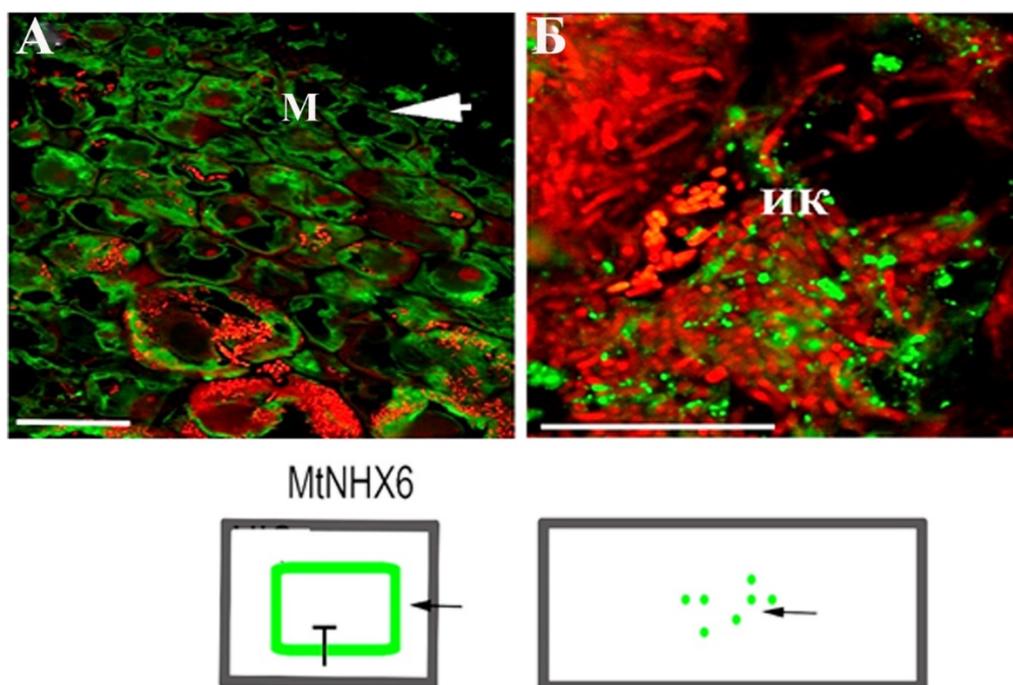


Рис.20. Иммуноцитологический анализ распределения белка MtNHX6 в клетках корневого клубенька (А,Б). Цветовой код: красная флуоресценция - бактерии и ядра, окрашенные йодистым пропидием, зеленая флуоресценция –белок MtNHX6, меченый GFP. М– меристема, ИК–инфицированная клетка. Масштабная линейка:(А)=50μm,В=10μm

Для выяснения динамики состояния белков NHX7 и NHX6 был проведен анализ этих тканей с использованием электронной микроскопии. Согласно анализу, иммуносигнал белков MtNHX7 и MtNHX6 кроме мембран был найден в люменах молодых вакуолей, что указывает на деградацию белков после потери с мембран (Trifonova et al., 2022). Возможно,

что изменения локализации белков NHX, которые наблюдались в инфицированной клетке, свидетельствуют о начальных признаках деградации этих клеток, также они могут быть индуцированы гипоксией в этих клетках, поскольку негативное влияние гипоксии на экспрессию ионных каналов отмечено неоднократно (Wang et al., 2016, Fernandez-Encarnacion et al., 2017).

Заключение

Целью данной работы было исследование изменений эндомембранной системы клеток корневого клубенька, которые происходят во время короткого, но весьма важного для биосферы нашей планеты сосуществования клеток растения и бактериального микросимбионта, которое называется азотфиксирующим симбиозом. Оценивался уровень экспрессии генов и распределения в клетках клубенька основных белков-маркеров процессов новообразования и поддержания эндомембран. Были исследованы гены и белки пути эндоцитоза: малые GTPазы Rab5, Rab7, регуляторы слияния мембран, и белки, относящиеся к комплексу слияния мембран, специфичному для мембран эндосом и тонопласта: (t-SNAREs): SYP21/22, SYP51/52, VTI11, VPS11, VPS15, а также гены пути секреции из группы VAMP7.

Было показано, что в процессе инфицирования и выхода в клетку клубенька из инфекционной нити, мембраны симбиосом не приобретают молекулярных маркеров пути эндоцитоза, что, вероятно, предотвращает немедленный лизис симбиосом на начальном этапе колонизации. Также была показана репрессия в инфицированной клетке генов VPS11 и VPS15, принадлежащих к вакуолярному комплексу HOPS, регулирующему транспорт и слияние с мембраной тонопласта. Эти изменения сопровождалась потерей кислого pH и литических свойств вакуоли инфицированной клетки. Был сделан вывод, что дефункционализация вакуоли клетки хозяина является общей биологической особенностью инфицированных клеток в симбиозе. Дефункционализация вакуоли также способствует созданию пространства для симбиосом в симпласте инфицированной клетки, объем вакуолей уменьшался, составляя лишь около 30% объема клетки, тогда как в неинфицированных клетках он составляет 60-90%. В клубеньках других растений (соя, люцерна, Параспония), центральные вакуоли полностью исчезали после инфицирования клетки ризобиями. Освободившийся объем клетки-хозяина в клубеньках любого типа занимали симбиосомы.

Для выяснения механизмов роста симбиотического интерфейса и транспорта, обеспечивающего этот рост, были исследованы процессы, обеспечивающие транспорт везикул в процессе секреции, с использованием ключевых генов группы VAMP71(v-

SNAREs). Было показано, что белки группы VAMP71 являются необходимым компонентом симбиотических отношений в разных типах симбиоза, и, среди других функций, обеспечивают доставку ферментов, участвующих в модификации клеточной стенки инфекционной нити.

Было показано, что рост симбиосомных мембран обеспечивается активными изменениями актинового цитоскелета, опосредованного генами и белками комплекса *Arg2/3*. При частичном нокауте генов *Arg2/3* рост симбиосом и азотфиксация были почти полностью ингибированы.

Для выяснения механизмов перенаправления вектора переноса мембран к симбиосомному интерфейсу в инфицированной клетке, исследовали роль генов из группы синаптоагминов, которые кодируют белки-сенсоры Ca^{2+} , участвующие в регенерации поврежденных мембран. Было показано, что вектор переноса мембранных материалов (везикул) изменяется в зависимости от изменения напряжения цитоплазматической мембраны, мембраны инфекционной нити и симбиосомной мембраны, что приводит к перенаправлению траффика мембранных везикул по вектору напряжения мембраны, и обеспечивает рост мембран-реципиентов.

Были исследованы механизмы избыточного синтеза мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР). Была отмечена высокая экспрессия генов стресса ЭР в зонах развития симбиоза, что дает основание полагать, что этот механизм обеспечивает избыточный синтез мембран ЭР, которые являются основным источником для формирования симбиотического интерфейса.

Для выяснения причин ускоренного старения клубенька, а также высокой чувствительности клубеньков к солевому стрессу, был исследован спектр ионов в симбиосомах, вакуолях и цитоплазме инфицированных и неинфицированных клеток, экспрессия и распределение белков ионных каналов шейкерного типа *MtAKT1* и *MtSKOR/GORK*, а также уровень экспрессии более 20 других генов, участвующих в транспорте ионов калия, и в секвестрировании и удалении натрия в случае солевого стресса. Было показано, что в инфицированной клетке наблюдается потеря калия как симбиосомами, так и вакуолями клетки-хозяина, тогда как в неинфицированной клетке уровень этих ионов был стабилен. При исследовании расположения белков каналов-транспортеров калия, было показано, что в зрелой инфицированной клетке оба белка в значительной степени были утрачены с цитоплазматической мембраны и секвестрировались в молодых вакуолях, в отличие от неинфицированных клеток. С целью выяснения причин чувствительности корневых клубеньков к солевому стрессу, был проведен анализ содержания ионов натрия в симбиосомах, вакуолях и цитоплазме инфицированных и неинфицированных клеток в

условиях стресса. Согласно данным анализа ионного спектра, в инфицированных клетках, с учетом объемов этих клеток, накапливалось в 5 раз больше натрия, чем в неинфицированных.

Было проанализировано влияние солевого стресса на экспрессию генов, связанных с выведением Na^+ из цитоплазмы: участвующих в секвестрации Na^+ в вакуолях (MtNHX1), эндосомах (MtNHX6), и гена MtNHX7, гомолога SOS1 из *A. thaliana*, участвующего в выведении ионов натрия в апопласт через цитоплазматическую мембрану, а также недавно аннотированных генов-гомологов MtNHX7-like и MtNHX8. Была отмечена потеря белков с целевых мембран, подобная тому, что было показано для белка MtAKT1 и локализация их в люмене молодых вакуолей инфицированных клеток. При этом правильный паттерн локализации был сохранен в неинфицированных клетках, расположенных рядом.

Нарушение ионного баланса инфицированных клеток, вероятно, способствует ускоренному старению как инфицированных клеток, так и всего клубенька по сравнению с клетками корня, на котором клубенек расположен.

Можно заключить, что поддержание внутриклеточной колонии бактерий и азотфиксация имеет свою цену, выраженную в биологических потерях, а именно в негативном влиянии на жизнеспособность и время жизни клетки растения хозяина, в которой поддерживается бактериальная колония, и ухудшении возможности этой клетки противостоять стрессам. Полученные данные позволили выяснить ключевые элементы, которые индуцируются клеткой-хозяином в ответ на пролиферацию бактерий в симпласте, и получить возможности модификации этих процессов в дальнейшем с целью увеличения длительности и эффективности азотфиксирующего симбиоза.

В результате работы были сделаны следующие выводы:

1. Мембрана симбиосом не приобретает белки-маркеры пути эндоцитоза на первых этапах входа бактерий в клетку, что, вероятно, способствует предотвращению лизиса симбиосом на начальном этапе колонизации растительных клеток.

2. Репрессия в инфицированной клетке генов комплекса HOPS, который регулирует селективный транспорт к тонопласту, приводит к дефункционализации вакуолей инфицированных клеток и созданию пространства для симбиосом в симпласте инфицированной клетки.

3. Белки группы VAMP71(v-SNAREs) являются необходимым компонентом симбиотических отношений в разных типах симбиоза, и, среди других функций, обеспечивают доставку ферментов, участвующих в модификации клеточной стенки инфекционной нити, что обеспечивает выход ризобий в симпласт клетки-хозяина.

4. Рост симбиосом зависит от передислокации на симбиосомную мембрану белков комплекса Arp2/3, который регулирует формирование и рост актинового цитоскелета.

5. Изменение вектора транспорта мембран к симбиотическому интерфейсу, обеспечивающего рост мембран, регулируется сигналами белков-сенсоров Ca^{2+} группы синаптотагминов.

6. Избыточный синтез мембран эндоплазматического ретикулума в процессе формирования внутриклеточной бактериальной колонии, вероятно, является проявлением ответа клетки-хозяина на стресс эндоплазматического ретикулума.

7. Одной из причин ускоренного старения инфицированных клеток является нарушение распределения белков ионных каналов шейкерного типа MtAKT1 и MtSKOR/GORK на мембранах, а также изменение уровня экспрессии более 20 других генов, участвующих в транспорте ионов. Это обуславливает потерю калия симбиосомами и инфицированными клетками.

8. Высокая чувствительность корневых клубеньков к солевому стрессу, обусловлена нарушением механизмов выведения иона Na^+ , что приводит к накоплению в инфицированных клетках в 5 раз больше натрия, чем в неинфицированных. Этот эндогенный дефект вызван потерей с соответствующих мембран белков, участвующих в секвестрации Na^+ в эндосоме (MtNHX6), и выносу Na^+ в апопласт через цитоплазматическую мембрану (MtNHX7), что, вызвано, вероятно, частичной гипоксией этих клеток.

9. Поддержание внутриклеточной колонии бактерий и фиксация азота с использованием механизмов симбиоза позволяет растению выжить в условиях недостатка азота в почве, но имеет в целом негативное влияние на жизнеспособность и срок жизни инфицированных клеток и корневого клубенька.

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова по специальности по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки)

1. **Fedorova E.**, Thomson R., Whitehead L.F., Maudoux O., Udvardi M.K., Day D.A. Localization of H(+)-ATPases in soybean root nodules // *Planta*. – 1999. – vol. 209, no. 1. – pp. 25-32. – EDN: LFMYEX. – Импакт-фактор 0,994 (SJR); 0.81/0.70 п.л. (здесь и далее приведен общий объем работы и вклад автора в печатных листах).
2. Cermola M., **Fedorova E.**, Taté R., Riccio A., Favre R., Patriarca E.J. Nodule Invasion And Symbiosome Differentiation During *Rhizobium Etli-Phaseolus Vulgaris* Symbiosis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2000. – vol.13, no. 7. – pp. 733-741. – EDN: LGJCZB. – Импакт-фактор 1,118 (SJR); 1,04/0,90 п.л.
3. Roudier F., **Fedorova E.**, Györgyey J., Feher A., Brown S., Kondorosi A., Kondorosi E. Cell cycle function of *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin dependent kinase and a retinoblastoma protein // *The Plant Journal*. – 2000. – vol. 23, no. 1. – pp. 73-83. – EDN: LFFVXXL. – Импакт-фактор 2,275 (SJR); 1,16/0,35 п.л.
4. Roudier F., **Fedorova E.**, Lebris M., Lecomte P., Györgyey J., Vaubert D., Horvath G., Abad P, Kondorosi A., Kondorosi E. The *Medicago* species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs // *Plant Physiology*. – 2003. – vol. 131, no. 3. – pp. 1091-1103. – EDN: LHVHPD. – Импакт-фактор 2,162 (SJR); 1,39/0,25 п.л.
5. Vinardell J.M., **Fedorova E.**, Cebolla A., Kevei Z., Horvath G., Kelemen Z., Tarayre S., Roudier F., Mergaert P., Kondorosi A., Kondorosi E. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules // *The Plant Cell* – 2003. – vol.15, no. 9. – pp. 2093-2105. – EDN: LHVQFT. – Импакт-фактор 3,704 (SJR); 1,50/0,35 п.л.
6. Goggin D.E., Lipscombe R., **Fedorova E.**, Millar A.H., Mann A., Atkins C.A., Smith P.M. Dual intracellular localization and targeting of aminoimidazole ribonucleotide synthetase in cowpea // *Plant Physiology*. – 2003. – vol. 131, no. 3. – pp. 1033-1041. – EDN: LWQMIZ. – Импакт-фактор 2,162 (SJR); 1.04/0,20 п.л.
7. **Fedorova E.**, Redondo F.J., Koshiba T., Pueyo J.J., de Felipe M.R., Lucas M.M. Aldehyde Oxidase (AO) In The Root Nodules Of *Lupinus Albus* And *Medicago Truncatula*: Identification Of AO In Meristematic And Infection Zones // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2005. – vol. 1, no. 5. – pp. 405-413. – EDN: LJBWNN. – Импакт-фактор 1,118 (SJR); 1,04/1,00 п.л.
8. Geurts R., **Fedorova E.**, Bisseling T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2005. – vol. 8, no. 4. – pp. 346-352. – EDN: MFCXOD. – Импакт-фактор 3.193 (SJR); 0,81/0,35 п.л.
9. **Fedorova E.**, Brown S. Cytochemistry of proteolytic activity and pH status of vacuoles in *Medicago truncatula* root nodules // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2007. – vol. 54, no. 1. – pp. 25-31. – EDN: LKVAYN. – Импакт-фактор 0,296 (SJR); 0,81/0,75 п.л.
10. Smit P., Limpens E., Geurts R., **Fedorova E.**, Dolgikh E., Gough C., Bisseling T. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling // *Plant Physiology*. – 2007. – vol. 145, no. 1. – pp. 183-191. – EDN: LKRSSL. – Импакт-фактор 2,162 (SJR); 1,04/0,20 п.л.

11. Wan X., Hontelez J., Lillo A., Guarnerio C., van de Peut D., **Fedorova E.**, Bisseling T., Franssen H. *Medicago truncatula* ENOD40-1 and ENOD40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development // Journal of Experimental Botany. – 2007. – vol. 58, no. 8. – pp. 2033-2041. – EDN: IRJWWB. – Импакт-фактор 1,778 (SJR); 1,04/ 0,25 п.л.
12. **Fedorova E.E.**, de Felipe M.R., Pueyo J.J., Lucas M.M. Conformation of cytoskeletal elements during the division of infected *Lupinus albus* L. nodule cells // Journal of Experimental Botany. – 2007. – vol. 58, no. 8. – pp. 2225-2236. – EDN: LKLWAF. – Импакт-фактор 1,778 (SJR); 1,39/1,30 п.л.
13. Limpens E., Ivanov S., van Esse W., Voets G., **Fedorova E.**, Bisseling T. Medicago N₂-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity // The Plant Cell. – 2009. – vol. 21, no. 9. – pp. 2811-2828. – EDN: MWYKXX. – Импакт-фактор 3,704 (SJR); 2,08/1,90 п.л.
14. Wang D., Griffiths J., Starker C., **Fedorova E.**, Limpens E., Ivanov S., Bisseling T., Long S. A Nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis // Science. – 2010. – vol. 26, no. 327(5969). – pp. 1126-1129. – EDN: MXMAZR. – Импакт-фактор 10,416 (SJR); 0,46/0,37 п.л.
15. Ivashina T.V., **Fedorova E.E.**, Ashina N.P., Kalinchuk N.A., Druzhinina T.N., Shashkov A.S., Shibaev V.N., Ksenzenko V.N. Mutation in the pssM gene encoding ketal pyruvate transferase leads to disruption of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* - *Pisum sativum* symbiosis // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – vol. 109, no. 2. – pp. 731-742. – EDN: MXKJRN. – Импакт-фактор 0,779 (SJR); 1,39/0,45 п.л.
16. Ivanov S., **Fedorova E.**, Bisseling T. Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments // Current Opinion in Plant Biology. – 2010. – vol. 13, no. 4. – pp. 372-377. – EDN: NBDFFR. – Импакт-фактор 3,193 (SJR); 0,69/0,59 п.л.
17. 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. – vol. 24, no. 11. – pp. 1333-1344. – EDN: PECUSF. – Импакт-фактор 1,118 (SJR); 1,39/0,35 п.л.
18. Op den Camp R.H., Polone E., **Fedorova E.**, Roelofsen W., Squartini A., Op den Camp H.J., Bisseling T., Geurts R. Nonlegume *Parasponia Andersonii* Deploys A Broad Rhizobium Host Range Strategy Resulting In Largely Variable Symbiotic Effectiveness // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2012. – vol. 25, no. 7. – pp. 954-963. – EDN: RIFTNR. – Импакт-фактор 1,118 (SJR); 1,16/0,20 п.л.
19. Margaret I., Lucas M.M., Acosta-Jurado S., Buendía-Clavería A.M., **Fedorova E.**, Hidalgo Á., Rodríguez-Carvajal M.A., Rodríguez-Navarro D.N., Ruiz-Sainz J.E., Vinardell J.M. The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules // PLoS ONE. – 2013. – vol. 1, no. 8(10). – P. e74717. – EDN: RRHVJN. – Импакт-фактор 0,803 (SJR); 1,39/0,35. п.л.
20. Gavrin A., Kaiser B.N., Geiger D., Tyerman S.D., Wen Z., Bisseling T., **Fedorova E.** Adjustment of host cells for accommodation of symbiotic bacteria: vacuole defunctionalization, HOPS suppression, and TIP1g retargeting in Medicago // The Plant Cell. – 2014. – vol. 26, no. 9. – pp. 3809-3822. – EDN: UPFHVV. – Импакт-фактор 3,704 (SJR); 1,50/1,45 п.л.

21. Moling S., Pietraszewska-Bogiel A., Postma M., **Fedorova E.**, Hink M.A., Limpens E., Gadella T.W., Bisseling T. Nod factor receptors form heteromeric complexes and are essential for intracellular infection in *Medicago nodules* // *The Plant Cell*. – 2014. – vol. 26, no. 10. – pp. 4188-4199. – EDN: UQUEPT. – Импакт-фактор 3,704 (SJR); 1,39/0,30 п.л.
22. Gavrin A., Jansen V., Ivanov S., Bisseling T., **Fedorova E.** ARP2/3-Mediated Actin Nucleation Associated With Symbiosome Membrane Is Essential For The Development Of Symbiosomes In Infected Cells Of *Medicago Truncatula* Root Nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2015. – vol. 28, no. 5. – pp. 605-614. – EDN: UPFIZL. – Импакт-фактор 1,118 (SJR); 1,16/1,00 п.л.
23. Gavrin A., Chiasson D., Ovchinnikova E., Kaiser B.N., Bisseling T., **Fedorova E.** VAMP721a and VAMP721d are important for pectin dynamics and release of bacteria in soybean nodules // *New Phytologist*. – 2016. – vol. 210, no. 3. – pp. 1011-1021. – EDN: WPGEP. – Импакт-фактор 3,293 (SJR); 1,39/1,29 п.л.
24. Gavrin A., Kulikova O., Bisseling T., **Fedorova E.** Interface Symbiotic Membrane Formation In Root Nodules Of *Medicago Truncatula*: The Role Of Synaptotagmins Mtsyt1, Mtsyt2 And Mtsyt3 // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – vol. 8. – P. 201. – EDN: YYBQJF. – Импакт-фактор 1,163 (SJR); 1,16/1,10 п.л.
25. 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. – vol. 8. – P. 2229. – EDN: XXKJET. – Импакт-фактор 1,163 (SJR); 3,00/1,80 п.л.
26. van Zeijl A., Wardhani T.A.K., Seifi Kalhor M., Rutten L., Bu F., Hartog M., Linders S., **Fedorova E.E.**, Bisseling T., Kohlen W., Geurts R. CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis Of Four Putative Symbiosis Genes Of The Tropical Tree *Parasponia Andersonii* Reveals Novel Phenotypes // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – vol. 9. – P. 284. – EDN: XXWEPZ. – Импакт-фактор 1,163(SJR); 1,62/0,60 п.л.
27. **Fedorova E.E.**, Coba de la Peña T., Lara-Dampier V., Trifonova N.A., Kulikova O., Pueyo J.J., Lucas M.M. Potassium content diminishes in infected cells of *Medicago truncatula* nodules due to the mislocation of channels MtAKT1 and MtSKOR/GORK // *Journal of Experimental Botany*. – 2021. – vol. 72, no. 4. – pp. 1336-1348. – EDN: SDUGCH. – Импакт-фактор 1,778 (SJR); 1,50/1,45 п.л.
28. Trifonova N.A., Kamyshinsky R., Coba de la Peña T., Koroleva M.I., Kulikova O., Lara Dampier V., Pashkovskiy P., Presniakov M., Pueyo J.J., Lucas M.M., **Fedorova E.E.** Sodium Accumulation In Infected Cells And Ion Transporters Mistargeting In Nodules Of *Medicago Truncatula*: Two Ugly Items That Hinder Coping With Salt Stress Effects // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – vol. 23, no. 18. — P. 10618. – EDN: JBGZXD. – Импакт-фактор 1,273 (SJR); 2,43/2,30 п.л.
29. **Fedorova E.E.** Rapid Changes To Endomembrane System Of Infected Root Nodule Cells To Adapt To Unusual Lifestyle // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – vol. 24, no. 5. – P. 4647. – EDN: RXLMSH. – Импакт-фактор 1,273 (SJR); 1,50/1,50 п.л.
30. Semenova M.G., Petina A.N., **Fedorova E.E.** Autophagy And Symbiosis: Membranes, ER, And Speculations // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – vol. 25, no. 5. – P. 2918. – EDN: OLOJEM. – Импакт-фактор 1,273 (SJR); 1,62/1,55 п.л.
31. **Fedorova E.E.**, Pueyo J.J. Microbial Colonization Of The Host Plant: Cellular And Molecular Mechanisms Of Symbiosis // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – vol. 25, no. 1. – P. 639. – EDN: XXIMOJ. – Импакт-фактор 1,273(SJR), 0,58/0,50 п.л.

Прочие публикации

32. Limpens E., Mirabella R., **Fedorova E.**, Franken C., Franssen H., Bisseling T., Geurts R. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2 // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – vol. 102, no. 29. – pp. 10375-10380. – DOI:10.1073/pnas.0504284102. – Импакт-фактор 3,414 (SJR); 0,69/0,15 п.л.
33. Ivanov S., **Fedorova 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. – vol. 109, no. 21. – pp. 8316-8321. – DOI: 10.1073/pnas.1200407109. – Импакт-фактор 3,414 (SJR); 0,69/0,59 п.л.
34. Chiasson D.M., Loughlin P.C., Mazurkiewicz D., Mohammadidehcheshmeh M., **Fedorova E.E.**, Okamoto M., McLean E., Glass A.D., Smith S.E., Bisseling T., Tyerman S.D., Day D.A., Kaiser B.N. Soybean SAT1 (Symbiotic Ammonium Transporter 1) encodes a bHLH transcription factor involved in nodule growth and NH₄⁺ transport // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – vol. 111, no. 13. – pp. 4814-4819. – DOI: 10.1073/pnas.1312801111. – Импакт-фактор 3,414 (SJR); 0,69/0,25 п.л.
35. Yang S., Wang Q., **Fedorova E.**, Liu J., Qin Q., Zheng Q., Price P.A., Pan H., Wang D., Griffiths J.S., Bisseling T., Zhu H. Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – vol. 114, no. 26. – pp. 6848-6853. – DOI: 10.1073/pnas.1700460114. – Импакт-фактор 3,414 (SJR); 0,69/0,15 п.л.
36. van Velzen R., Holmer R., Bu F., Rutten L., van Zeijl A., Liu W., Santuari L., Cao Q., Sharma T., Shen D., Roswanjaya Y., Wardhani T.A.K., Kalhor M.S., Jansen J., van den Hoogen J., Gungör B., Hartog M., Hontelez J., Verver J., Yang W.C., Schijlen E., Repin R., Schilthuisen M., Schranz M.E., Heidstra R., Miyata K., **Fedorova E.**, Kohlen W., Bisseling T., Smit S., Geurts R. Comparative genomics of the nonlegume Parasponia reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2018. – vol. 115, no. 20. – pp. E4700-E4709. – DOI: 10.1073/pnas.1721395115. – Импакт-фактор 3,414 (SJR); 1,16/0,1 п.л.