

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

На правах рукописи

ФЕДОРОВА Елена Эриковна

**ЭНДОМЕМБРАННАЯ СИСТЕМА КЛЕТОК КОРНЕВОГО КЛУБЕНЬКА
БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ АЗОТФИКСИРУЮЩЕГО
СИМБИОЗА**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени доктора
биологических наук

Москва - 2026

Оглавление

Введение.....	6
Актуальность проблемы.....	6
Степень разработанности темы.....	7
Цели и задачи исследований.....	8
Научная новизна полученных результатов.....	10
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Положения, выносимые на защиту	12
Методология и методы исследований.....	12
Основная часть.....	15
Глава 1. Обзор литературы	15
1.1. Биологическая азотфиксация в биосфере, нитрогеназа, роль бобовых в поддержании урожайности и улучшении почв	15
1.2. Азотфиксирующие бактерии в симбиозе	17
1.3. Эволюция симбиоза.....	19
1.4. Наиболее распространенные и экономически важные виды бобовых растений	20
1.5. Сигнальный путь факторов нодуляции (Nod-факторов).....	21
1.6. Ризобиальная инфекция и механическая стимуляция, а также другие системы обмена сигналами при контакте про- и эукариота.....	23
1.7. Защитные механизмы в процессе формирования симбиоза	24
1.8. Процесс внутриклеточной инфекции, переход ризобий в апопласт и симпласт растения-хозяина.....	26
1.9. Новообразованный симбиотический орган: морфология корневых клубеньков и тип роста.....	27
1.10. Фитогормоны в процессе формирования клубеньков	29
1.11. Авторегуляция формирования клубеньков.....	31

1.12. Зоны развития корневого клубенька и их функционал	31
1.13. Инфицированные клетки – уникальные эукариотические клетки	33
1.14. Симбиосома: новая органелла или патогенная вакуоль?	35
1.15. Органеллоподобные характеристики симбиосомы: композитное происхождение, дифференциация и мембранный комплекс	38
1.16. Изменение мембранных компартментов клетки в процессе симбиоза, идентичность мембран	41
1.17. Механизмы формирования и поддержания колонии бактерий внутри клетки-хозяина	42
1.18. Изменения цитоскелета инфицированной клетки.....	43
1.19. Транспорт к симбиосомной мембране: пространственное и временное разграничение секреции и мембранный транспорт	44
1.20. Специфичность клеточного транспорта: SNARE комплекс	45
1.21. Мембранный транспорт в корневых клубеньках: участники и особенности процесса.....	47
1.22. Прекращение симбиотических отношений: естественное старение и влияние стрессовых условий	47
1.23. Индуцированное старение клубеньков под действием нитратов и солевого стресса.....	52
1.24. Транспорт необходимых ионов в растительных клетках: солевой стресс и изменения метаболизма клубенька.....	53
<u>Глава 2. Методические подходы и использованные материалы.....</u>	<u>56</u>
2.1. Растения и бактерии, использованные в работе, условия проведения опытов	56
2.2. Подбор генов для исследований.....	56
2.3. Анализ экспрессии генов <i>in silico</i>	56
2.4. Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени	57
2.5. Праймеры.....	57
2.6. Клонирование генов и приготовление диагностических генетических конструкторов для исследований клубеньков люцерны усеченной.....	57
2.7. Трансформация	60
2.8. Клонирование генов и приготовление диагностических генетических конструкторов для исследований клубеньков сои	60

2.9. Анализ экспрессии методом ПЦР в реальном времени в клубеньках сои	61
2.10. Исследование ответа корневого клубенька на солевой стресс	62
2.11. Анализ распределения белка MtNHX6.....	62
2.12. Конфокальная микроскопия	62
2.13. Настройки конфокального микроскопа.....	62
2.14. Методы анализа с использованием антител.....	63
2.15. Первичные антитела	63
2.16. Исследование локализации каллозы.....	64
2.17. Исследование локализации пектина	64
2.18. Метод дифференциального окрашивания цитоскелета.....	65
2.19. Флуоресцентная маркировка актина.....	65
2.20. Иммулокализация белка MtSKOR / GORK.....	66
2.21. Оценка относительной интенсивности флуоресцентного сигнала.....	66
2.22. Окрашивание препаратов FM4-64.....	66
2.23. Подготовка проб для электронной микроскопии.....	66
2.24. Иммунодетекция с использованием электронной микроскопии.....	67
2.25. Регистрационные номера генов, использованных для клонирования	68
2.26. Анализ распределения ионов в ткани корневых клубеньков.....	68
2.27. Источники нуклеотидных и белковых последовательностей.....	69
2.28. Измерение ферментативной активности пектат-лиазы	69
2.29. Выделение симбиосом.....	71
2.30. Анализ азотфиксирующей активности по восстановлению ацетилена ...	71
2.31. Анализ протеолитической активности вакуолей корневых клубеньков .	71
<u>Глава 3. Результаты и их обсуждение.....</u>	<u>73</u>
3.1. Формирование симбиосом и изменения их морфологии в процессе развития симбиоза.....	73
3.2. Изменения в направленности транспорта белков, принадлежащих к пути эндоцитоза, и идентичности мембран симбиосом в процессе их созревания и старения: появление на мембране вакуолярных белков.....	75
3.3. Вакуоль инфицированной клетки в процессе развития симбиоза: необходимая катастрофа?	90

3.4. Протеолитическая активность вакуолей в корневых клубеньках	90
3.5. Кислотность вакуолей в инфицированных клетках.....	92
3.6. Молекулярные механизмы дефункционализации вакуоли инфицированной клетки, экспрессия и локализация генов вакуолярного комплекса HOPS.....	95
3.7. Изменения размеров и архитектуры инфицированной клетки в процессе роста и развития.....	100
3.8. Маркеры пути секреции на симбиосомной мембране люцерны и сои и их роль в развитии симбиоза	104
3.9. Механизмы таргетированного мембранного транспорта и регуляция доступности мембранных ресурсов в инфицированной клетке	122
3.10. Возможные причины избыточного синтеза мембран эндоплазматического ретикулума, как источника мембран симбиотического интерфейса.....	132
3.11. Молекулярные механизмы модификации цитоскелета в процессе развития симбиоза.....	138
3.12. Изменение транспорта и молекулярные механизмы распределения иона калия в ткани корневого клубенька люцерны усеченной <i>Medicago truncatula</i>	148
3.13. Влияние засоления на ионный транспорт в корневых клубеньках люцерны усеченной	161
Заключение	173
Выводы.....	184
Список таблиц	186
Список иллюстраций	187
Благодарности	195
Список литературы	197

Введение

Актуальность проблемы

Симбиоз между растениями и почвенными бактериями из группы ризобий это сложный тип растительно-микробного взаимодействия, имеющий большое значение для глобального баланса азота. Более трети азота, используемого в биосфере, поступает за счет корневых клубеньков, а в регионах, где минеральные удобрения малодоступны, симбиотическая азотфиксация является единственным источником азота. В течение многих тысяч лет эволюции человечества симбиотическая азотфиксация использовалась для улучшения почв и получения высокобелковой пищи. В современных условиях преимуществом этого источника азота является его экологичность, поскольку получение фиксированного азота этим способом не требует затрат энергии, высоких температур, и не загрязняет окружающую среду. Поэтому исследования в этой области, начатые в середине 20 века, являются актуальными.

При использовании этого способа получения фиксированного азота в сельском хозяйстве существуют технологические ограничения. Прежде всего это более низкая эффективность получения азота с помощью биологической фиксации, по сравнению с минеральными удобрениями. Так, поступление симбиотического азота ограничено многими факторами, среди которых следует назвать чувствительность корневых клубеньков к стрессам и нестабильным условиям окружающей среды, таким как недостаток или избыток влаги, высокое содержание минерального азота в почве, засоленность, недостаток кислорода, затененность, низкие и высокие температуры, недостаток ряда минеральных элементов и микроэлементов, необходимых ризобий в почве. Существуют и биологические ограничения, так, за счет процесса авторегуляции, растение-хозяин жестко лимитирует количество клубеньков и получает лишь физиологический минимум азота. Этот минимум может поддерживать жизнь растения в случае отсутствия других источников азота, но он недостаточен для поддержания современных

высокоурожайных бобовых культур, поэтому для выращивания этих культур используется минеральный азот.

В последнее десятилетие развитие технологии создало возможности для разработки промышленных методов, использующих природные процессы или модификацию существующих технологий, с целью создания искусственных природоподобных систем. Поэтому существует запрос на информацию о биологических системах, где происходят интересующие человека и приносящие пользу процессы. Биологическая азотфиксация в этом ряду стоит среди первых кандидатов, что делает изучение симбиоза актуальным и необходимым.

Степень разработанности темы

Поддержание в живой эукариотической клетке огромной колонии живых азотфиксирующих бактерий в течение нескольких недель является не только крайне интересным биологическим феноменом, но и обеспечивает значительную часть необходимого для жизни биосферы планеты фиксированного азота.

Будучи внутриклеточными симбионтами, ризобии получают доступ к ресурсам клетки-хозяина, таким как сахара, вода, необходимые ионы, и приобретают способность к фиксации атмосферного азота. При этом в клетках корневого клубенька, заселенных бактериями, не происходит быстрой элиминации бактерий за счет слияния с литическими компартментами, и клетка не переходит в состояние индуцированной клеточной смерти. Процессы адаптации инфицированных клеток к их необычному образу жизни и молекулярные механизмы регуляции внутриклеточных процессов клетки-хозяина, а также взаимной адаптации двух геномов пока мало изучены.

Продолжительность жизни клубеньков составляет лишь 6-8 недель, что недостаточно для поддержания растения в течение всего вегетационного периода до завершения созревания семян. Но причины, которые вызывают столь 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. Интеграция эндоэпителиальной системы клетки-хозяина и ее участие в процессах развития и поддержания внутриклеточной колонии азотфиксирующих бактерий, представляет собой важную часть растительно-микробных взаимодействий, которая до сих пор изучена недостаточно. Исследования особенностей эндоэпителиальной системы инфицированных клеток создают возможности к улучшению некоторых аспектов симбиотических отношений, повышения эффективности процесса и его стрессоустойчивости.

Реальные процессы, происходящие в корневом клубеньке, особенно способы, а также последствия сосуществования эукариотической клетки и живых бактерий в течение длительного времени, требуют изучения. Результаты могут быть использованы для увеличения эффективности процесса азотфиксации, а также улучшить выживание симбиосом в условиях различных стрессов.

Цели и задачи исследований

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

Для исследований были выбраны направления модификации эндоэпителиальных мембран, 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 слиянии 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 симбиосомному интерфейсу, зависящие от Ca^{2+} сенсоров из группы синаптотагминов, 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 усвойчивости 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 эндомембранной 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 репрессии 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 синаптотагминов, 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.

Впервые были показаны нарушения в распределении белков ионных каналов шейкерного типа MtAKT1 (канал входящего выпрямления) и MtSKOR/GORK (канал выходящего выпрямления) в инфицированных клетках, а также выявлена динамика экспрессии более 20 других генов, участвующих в транспорте ионов калия в корневых клубеньках люцерны усеченной.

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. 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 Arp2/3, 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 синаптотагминов, 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 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, а также 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», и 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 грантовой 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.

Основная часть

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Биологическая азотфиксация в биосфере, нитрогеназа, роль бобовых в поддержании урожайности и улучшении почв

Азот является необходимым компонентом биомолекул, а также лимитирующим элементом в питании живых организмов, поэтому доступ к этому ресурсу является определяющим для выживания и роста. Этот элемент в изобилии присутствует в атмосфере Земли в виде газа (N_2), однако большинство организмов не способны его метаболизировать. Растения получают азот из "фиксированных" форм, таких как аммиак или нитраты. Источники азота биосферы включают симбиотическую азотфиксацию, фиксацию азота в морях и океанах одноклеточными микроорганизмами, а также производство удобрений с помощью химического синтеза. На каждый из этих источников приходится приблизительно около трети от общего объема этого ресурса в биосфере в настоящее время, суммарно около 175-190 миллионов тонн азота (Rucker, Kaçar, 2023). Таким образом, биологическая фиксация атмосферного азота является доступным и иногда единственным способом получения азота во многих биосистемах Земли.

Изотопные исследования показывают, что биологическая фиксация азота впервые стала возможной 3,2 млрд лет назад (Stüeken *et al.*, 2015). Способность фиксировать атмосферный азот (дiazотрофия) присуща исключительно прокариотическим организмам, которые содержат нитрогеназный ферментный комплекс. К diaзотрофам относятся протеобактерии, цианобактерии и актинобактерии (Kneip *et al.*, 2007, 2008), высшие растения или животные не имеют ферментных систем, которые дают такую возможность. Уникальность реакции азотфиксации в том, что она проходит при нормальном атмосферном давлении и температуре, что делает процесс очень экологичным, хотя, по некоторым причинам, он не является высокоэффективным (Andrews, Andrews (2017)).

Бактериальный фермент нитрогеназа представляет собой двухкомпонентную систему, состоящую из белка MoFe, также называемого динитрогеназой или компонентом I, и белка Fe, называемого также динитрогеназредуктазой или компонентом II. Белки Fe и белок Fe и белок MoFe связываются и диссоциируют в каталитическом цикле с переносом одного электрона и гидролизом MgATP. Белок MoFe содержит железо-молибденовый кофактор (FeMo-co), который обеспечивает связывание субстрата и восстановления, и P-кластер, участвующий в переносе электронов от белка Fe к FeMo-co. Кроме того, были обнаружены альтернативные молибденовому кофактору нитрогеназы, в которых Mo из FeMo-co заменен на ванадий (V/Fe) или железо (Fe/Fe). В процессе реакции восстановления азота происходит гидролиз АТФ и обязательное образование 1 моль N_2 на 1 моль восстановленного N_2 , что является очевидной "потерей" двух восстановительных эквивалентов и четырех АТФ на восстановленный N (Hoffman *et al.*, 2014).

Получение азота высшими растениями через восстановление атмосферного азота в аммиак прокариотическими организмами с последующим переносом аммиака в клетки растения, появилось в процессе эволюции около 110 миллионов лет назад (van Velzen *et al.*, 2018, 2019, Rutten *et al.*, 2020). Эта ассоциация между высшими растениями и азотфиксирующими организмами получила название симбиоза, поскольку полезна как для растения, являясь источником азота, так и для бактерий, увеличивая возможности к росту их популяции в почвах. В настоящее время признается, что ассоциация бобовых растений с почвенными бактериями из группы ризобииум, называемая бобово-ризобияльным симбиозом, крайне важна для поддержания азотного баланса в планетарном масштабе, и является абсолютно необходимым источником азота (Борисов и др., 2011, Rucker, Kaçar, 2023).

Одной из ключевых особенностей симбиоза является ингибирование использования аммиака, продуцируемого в процессе работы нитрогеназы, самими ризобиями, находящимися в клетках растения-хозяина. Это происходит вследствие прекращения экспрессии глутаминсинтетазы ризобий, которые находятся в симпласте клетки-хозяина. Так, было показано, что гены NTR системы ризобий, *Rhizobium etli* NtrC, контролирующие экспрессию ризобияльной

глутаминсинтетазы GSII, не экспрессируются в бактериоидах в процессе их дифференциации (Patriarca *et al.*, 1996, Taté *et al.*, 1998, Spinosa *et al.*, 2000), что создает пул свободного аммиака, который и является ресурсом для растения-хозяина.

1.2. Азотфиксирующие бактерии в симбиозе

Группа прокариотических микроорганизмов, способных к азотфиксации, включает в себя различные синезеленые водоросли, свободноживущие почвенные бактерии, такие как *Azotobacter*, бактерии, которые образуют ассоциативные отношения с растениями, такие как *Azospirillum*, и, что наиболее важно, бактерии, известные под общим названием *Rhizobia*, которые устанавливают симбиоз с бобовыми растениями, а также и некоторыми небобовыми растениями, такими как древесное растение Параспония (Проворов и др., 2002, Geurts *et al.*, 2016). В этих ассоциациях участвуют как грамотрицательные бактерии из группы *Rhizobium*, которые фиксируют азот в корневых клубеньках бобовых, так и грамположительные бактерии *Frankia* (Pawlowski, Sirenberg. 2003), которые формируют так называемый актиноризный симбиоз на корнях некоторых древесных и кустарниковых растений, таких как облепиха (*Hippophae Rhamnoides Mill*).

Почвенные бактерии из группы *Rhizobium* способны к существованию как свободноживущие сапрофитные почвенные микроорганизмы, а также как биотрофные микроорганизмы в растительных клетках бобовых и некоторых небобовых растений (Masson-Boivin, Sachs, 2018).

Появление различных типов симбиотических отношений между эукариотами и diaзотрофными бактериями являлось эволюционным прорывом, поскольку позволило более широкую экспансию азотфиксирующих растений на бедных, лишенных достаточного уровня азота, почвах (Борисов и др., 2011, Сидорова и др., 2015, Тихонович и др., 2015).

Ризобии объединяют в несколько родов, относящихся к классам альфапротеобактерий и бетапротеобактерий. По частоте изоляции самым крупным

ризобиальным родом является род *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobiaceae*), представители которого также образуют клубеньки с самым широким спектром бобовых растений, включая такие распространенные виды как соя, а также небобовое растение Параспония (*Parasponia*) (Проворов и др., 2013, Parker, 2015, van Velzen *et al.*, 2018).

Виды брадиризовий широко представлены на всех континентах Земли (Sprenst *et al.*, 2017). Было высказано предположение, что *Bradyrhizobium* являются предковыми симбионтами бобовых (Parker, 2015), поскольку они доминируют во многих почвах в качестве несимбиотических сапрофитов. Предполагается, что *Bradyrhizobium* были первыми совместимыми с симбиозом протеобактериями, с которыми вступили в контакт новые эволюционирующие бобовые растения, когда они начали распространяться по всему земному шару (Sprenst *et al.*, 2017).

Группа бактерий *Rhizobium* и *Ensifer* (*Sinorhizobium*) из семейства *Rhizobiaceae* генетически имеет много общего с почвенным патогеном *Agrobacterium*, а также с другими патогенами и фитопатогенами из группы *Rhizobiaceae* (Kuzmanović *et al.*, 2022). Для этой группы бактерий характерно размещение генов инфекции на мобильных плазидах, симбиотических в случае ризобий, и вызывающих опухоли в случае фитопатогенных *Agrobacterium*.

Третий крупный род альфа-ризовий – *Mesorhizobium*. Как и брадиризовии, многие мезоризовии не имеют сим-плазмид, а вместо этого обладают мобильными симбиотическими "островками" на хромосоме (Laranjo *et al.*, 2014). Род ризобий - *Azorhizobium* из семейства *Xanthobacteriaceae*, специфично ассоциирован с несколькими видами тропического рода *Sesbania*, прежде всего с *Sesbania rostrata*, с которой образует фотосинтезирующие стеблевые клубеньки (Caroen *et al.*, 2010).

Бета-ризовии относятся к двум родам: *Burkholderia* и *Cupriavidus* (Andrews, Andrews, 2017), которые образуют клубеньки на корнях мимозы и других представителей семейства мимозовых и штаммы с хромосомными сим-генами, которые образуют клубеньки с различными видами бобовых.

1.3. Эволюция симбиоза

Симбиозом признается ассоциация, в которой один организм живет внутри другого, при этом метаболизм их скоординирован, что приносит пользу обоим участникам. Предполагается, что подобные ассоциации в процессе эволюции послужили основой для появления эукариотических организмов (Margulis, Chapman, 1998; Zimorski *et al*, 2014; O'Malley, 2015). Митохондрии и хлоропласты эукариотических клеток, как предполагается, возникли в результате эволюции древнего эндосимбиоза, в ходе которого некоторые бактериоподобные организмы были поглощены другими, но не были немедленно использованы как пища, что позволило им какое-то время находиться в симпласте клеток (Zimorski *et al*, 2014; Archibald, 2015). Следует указать, что бактерии в настоящее время лишены способности к поглощению целых клеток других бактерий.

В процессе развития эндосимбиоза происходит распознавание симбионтов, проникновение микросимбионтов в апопласт и симпласт, то есть физиологическая интеграция, при этом развитие защитных реакций, приводящих к уничтожению микроорганизма, либо ингибировано, либо блокировано (Margulis, Chapman, 1998, Иванова, Цыганов, 2014). Шагами к полной интеграции является возможность деления эндосимбионта в клетках хозяина и вертикальная передача микросимбионта потомству хозяина. В случае успешной интеграции, циклический эндосимбиоз становится постоянным или облигатным эндосимбиозом (McFadden, 1999, Parniske, 2000; de la Peña *et al.*, 2017, Drew *et al.*, 2021).

Симбиотические отношения между растениями и бактериями появились около 110 миллионов лет назад, и были тогда возможны для многих видов растений (van Velzen *et al.*, 2018, 2019, Ruttan *et al.*, 2020).

Предполагается, что в то время существовал планетарный дефицит фиксированного азота, что было вызвано достаточно теплым климатом, отсутствием зон оледенения и распространением растений по всем зонам планеты. Затем произошло значительное изменение условий окружающей среды, к которым можно отнести уменьшение уровня доступного CO₂, который снизился в 10 раз, и

последовавшим понижением планетарной температуры. Поскольку биологическая фиксация азота и поддержание клубеньков требуют значительных затрат энергии, то создавшиеся в этот период на планете условия стали лимитирующими для симбиоза, что привело к уменьшению числа видов растений, способных к установлению симбиоза и к утрате способности к азотфиксирующему симбиозу многими видами растений (Zhang, *et al*, 2013, van Velzen *et al.*, 2018, Libourel *et al.*, 2023).

1.4. Наиболее распространенные и экономически важные виды бобовых растений

Группа травянистых бобовых включает многие экономически важные бобовые, такие как горох обыкновенный (*Pisum sativum*), чечевица (*Lens culinaris*), несколько видов вик (*Vicia spp.*), несколько видов клевера (*Trifolium spp.*), виды люцерны, люцерна посевная (*Medicago sativa*), а также вид люцерны усеченной, *Medicago truncatula*, используемой как модельное растение. Эта большая группа содержит почти треть всех видов бобовых. Бобовые этой группы эволюционировали сравнительно недавно, около 39 млн лет назад (Sprent *et al.*, 2017). Центры их разнообразия находятся в основном в умеренных регионах Европы, и они остаются преимущественно группой Северного полушария (Si *et al.*, 2020).

Виды растений, способные образовывать азотфиксирующие клубеньки, относятся к одному из четырех порядков - *Fabales*, *Fagales*, *Cucurbitales* и *Rosales*, которые вместе образуют так называемую группу(кладу) азотфиксирующих растений (Sprent *et al.*, 2017). К этой группе относятся как растения, которые образуют корневые клубеньки с ризобиями, так и растения, которые образуют клубеньки с бактериями рода *Frankia* (Geurts *et al.*, 2016). Группа включает 28 семейств, но только 10 семейств включают виды, способные к образованию корневых клубеньков и симбиотическим отношениям.

1.5. Сигнальный путь факторов нодуляции (Nod-факторов)

Бобовые растения реагируют на микроорганизмы, находящиеся в ризосфере на физиологическом и молекулярном уровнях (Downie, Walker, 1999, Geurts *et al.*, 2005, Smit *et al.*, 2007, Wan *et al.*, 2007, Цыганов и др., 2010, Limpens *et al.*, 2015, Долгих и др. 2017, Roy *et al.*, 2018, Kirienko *et al.*, 2019). Процесс формирования симбиотических отношений инициируется выделяемыми корнями растений вторичными метаболитами, флавоноидами. Ризобии воспринимают соответствующие флавоноиды, и в ответ вырабатывают и выделяют липо-хито-олигосахариды известные как факторы нодуляции, Nod-факторы. Предполагается, что этот путь сигналинга кооптирован из более древнего симбиоза растений с арбускулярной микорризой (Geurts *et al.*, 2005, Ivanov *et al.*, 2012, Shen, Bisseling, 2020).

Обмен сигналами является решающим при определении специфичности ассоциации пары растение-хозяин/бактерия (Downie, Walker, 1999, Жуков и др 2008). В случае, если ризобии не способны образовать симбиотические отношения с данным растением, в клетках корней увеличивается экспрессия генов, индуцирующих те же защитные механизмы, что и ответ на патогенные микроорганизмы (Moling *et al.*, 2014, Roy *et al.*, 2018).

Первоначальное восприятие Nod-факторов происходит в эпидермисе корня, локально оно приводит к индукции органогенеза корневого клубенька в месте контакта с ризобиями. При взаимодействии совместимых партнеров Nod-факторы стимулируют деформацию корневых волосков, позволяющую включить колонию ризобий в апопласт корня, и индуцировать экспрессию генов, определяющих формирование корневого клубенька.

Nod-факторы воспринимаются рецептор-подобными киназами с N-ацетилглюкозамин-связывающими лизиновыми мотивами (LysM) во внеклеточном домене, такими как NFP / LYK3 / LYK4 в модельном растении люцерна усеченная (Limpens *et al.*, 2005, Цыганов и др., 2010, Moling *et al.*, 2014), рецептором Nod-фактора NFR5 / NFR1 в модельном растении лядвенец японский

(*Lotus japonicum*) (Kawaharada *et al.*, 2015), и в геноме гороха посевного (*Pisum sativum*) (Жуков и др., 2008, 2016, Borisov *et al.*, 2003, Ovchinnikova *et al.*, 2011, Dolgikh *et al.*, 2011, Долгих и др., 2017, Kirienko *et al.*, 2018, Sulima *et al.*, 2017, 2019). Эти рецепторы изменяют уровень и направление ионных потоков, что приводит к деполяризации цитоплазматической мембраны и колебаниям концентрации («всплеске») концентрации кальция (Ca^{2+} spiking) в ядре клетки-хозяина (Sieberer *et al.*, 2012). При контакте с ризобиями, индуцированные Nod-факторами изменения концентрации кальция происходят в нуклеоплазме и перинуклеарной плазме корневых волосков. Катионные каналы, DM11 у *M.truncatula*, Castor и Pollux у *L.japonicum*, были определены как гены, которые участвуют в индукции колебаний кальция в ответ на Nod факторы (Riely *et al.*, 2007).

Сигнал всплеска концентрации кальция декодируется ядерной кальций/ кальмодулин-зависимой киназой CcaMK, CcaMK фосфорилирует CYCLOPS, ДНК-связывающий активатор транскрипции гена NODULE INCEPTION (NIN) (Geurts *et al.*, 2005, Ivanov *et al.*, 2010, Liu, Bisseling, 2020). Гены NSP1 и NSP2 пути сигналинга Nod-факторов образуют гетерокомплекс, который связывается с промоторами генов, индуцируемых Nod-фактором, этот транскрипционный комплекс способствует экспрессии гена NIN, ключевого регулятора симбиоза (Vu *et al.*, 2020, Lebedeva *et al.*, 2021).

Дефекты инфекционного процесса в растениях, мутантных по генам Nod-факторов, и по ряду других генов, участвующим в метаболизме клубенька, часто приводят к дефектам в органогенезе клубеньков (Wang *et al.*, 2010). Исследования фенотипов образовавшихся в этой ситуации клубеньков, и эндогенных белков клубеньков, являлись основой исследований функциональной роли генов, участвующих в пути сигналинга Nod-факторов (Fedorova *et al.*, 1998, Goggin *et al.*, 2003, Geurts *et al.*, 2005, Smit *et al.*, 2007, Ivashina *et al.*, 2010, Chiasson *et al.*, 2014, Долгих и др., 2017, Dolgikh *et al.*, 2020, Fedorova, Pueyo, 2024). Функциональная характеристика генов, участвующих в регуляции закладки и формирования клубеньков демонстрирует роль сигнального пути Nod-факторов и в процессах

внутриклеточной аккомодации бактерий (Limpens *et al.*, 2005, Smit *et al.*, 2007, Wan *et al.*, 2007, Antón *et al.*, 2006, Ovchinnikova *et al.* 2011, Moling *et al.*, 2014, Долгих и др., 2017, Sulima *et al.* 2017, van Zeijl *et al.*, 2018, Sulima *et al.* 2019, Geurts, Huisman, 2024).

Ряд исследований показывает, что компоненты сигнального пути экспрессируются и в зоне инфекции клубенька, нокаут этих генов приводит к нарушению выхода микросимбионтов в клетки хозяина и дифференциации микросимбионтов (Smit *et al.*, 2007, Zhukov *et al.*, 2008, Dolgikh *et al.*, 2011, Margaret *et al.*, 2013, Moling *et al.*, 2014, Limpens *et al.*, 2015, Kirienko *et al.*, 2018, Sulima *et al.*, 2019). Функциональная характеристика генов IPD3 и DMI3 демонстрирует роль сигнального пути Nod-факторов во внутриклеточном размещении бактерий (Ovchinnikova *et al.*, 2011, Zhernakov *et al.*, 2019).

1.6. Ризобиальная инфекция и механическая стимуляция, а также другие системы обмена сигналами при контакте про- и эукариота

Существует схожесть реакций растения на ризобиальную инфекцию и на механическую стимуляцию (Jayaraman *et al.*, 2014). Так, мутанты *dmi2* и *dmi3* *Medicago truncatula*, дефектные по формированию симбиотических отношений, также имеют дефекты в ответах на механическую стимуляцию (Esseling *et al.*, 2004). Это может указывать на кооптирование достаточно древней системы ответа на механическую стимуляцию для формирования симбиоза (Gavrin *et al.*, 2015).

Известно, что механическая стимуляция вызывает широко распространенные изменения в экспрессии генов, включая повышение уровня экспрессии классического набора индуцируемых прикосновением генов, которые кодируют кальмодулин и кальмодулиноподобные белки (Jayaraman *et al.*, 2014). Одним из признаков реакции служит также перемещение ядра клетки в направлении места контакта, которое является общей реакцией на механическую стимуляцию, а также на контакт с грибом или с бактерией, включая симбиотические бактерии и грибы.

Механическая стимуляция приводит также к накоплению фитогормона жасмоновой кислоты, которая является сигнальной молекулой при ранениях, атаках патогенов и первых этапах формирования симбиоза (Jayaraman *et al.*, 2014).

Помимо пути сигналинга Nod факторов, также важны сигналы компонентов стенки грамотрицательных бактерий (Kho *et al.*, 2024), они играют важную роль не только в процессе инфицирования и формирования бобово-ризобияльного симбиоза, но также, возможно, в процессе сигналинга, позволяющего растению дифференцировать бактерии способные к образованию симбиоза от патогенов и нейтральных сапрофитов. Интересны также недавно полученные данные о возможной роли амилоидогенных белков на ранней стадии симбиоза, которые также могут служить как сигнальные молекулы (Kosolapova *et al.*, 2019). Кроме факторов нодуляции, ряд соединений, например, карбонилсодержащие метаболиты, влияют на поддержание осмотического баланса в процессе формирования симбиоза (Shumilina *et al.*, 2022). Ризобияльные сигналы также включают свободные жирные кислоты ризобий, которые могут модулировать факторы нодуляции (Gladchuk *et al.*, 2020).

Некоторые ризобии также могут использовать систему секреции третьего типа (T3SS) для переноса бактериальных эффекторных белков непосредственно в клетки хозяина, что также индуцирует формирование симбиоза у определенных видов бобовых культур (Safronova *et al.*, 2020).

1.7. Защитные механизмы в процессе формирования симбиоза

Сложность микробных популяций - так называемых микробиомов - которые покрывают поверхность растений, свидетельствует о том, что растения постоянно сталкиваются с необходимостью регирования на сигналы тех или иных микроорганизмов, и от адаптационного потенциала растений в этих условиях зависит выживание растения (Проворов и др., 2002, Иванова и др., 2014, Тихонович и др., 2015).

Как и другие растительные организмы, бобовые обладают эффективной иммунной системой, оснащенной высокоспецифичными механизмами для

распознавания целого ряда микробов, как патогенов, так и симбионтов (Жуков и др., 2008). Реакция растения-хозяина на Nod-факторы симбионтов в сравнении с молекулярными паттернами патогенов, выявляет два уровня реакции растений, которые включают индукцию трансмембранных распознающих рецепторов на поверхности растительной клетки. Бактериальный флагеллин действует как мощный МАР в многих известных взаимодействиях между растениями и патогенами, где он распознается FLS2, лейцин-богатой (LRR) рецепторной киназой (Grundy *et al.*, 2023). Kouchi *et al.* (2004) показали, что при контакте лядвенца рогатого (*Lotus japonicus*) с ризобиями наблюдается быстро переходящая защитная реакция даже на совместимый штамм ризобий, проявляющаяся в экспрессии нескольких защитных генов. Однако в работе Kelly *et al.*, (2018) было показано, что изменения транскриптома при контакте с совместимым симбионтом и с патогеном у *L. japonicus* показывают значительные отличия.

Ризобии могут быть полезными партнерами, поставляя азот растению, но, в ряде случаев, корневой клубенек может содержать бактерии, которые, находясь в симпласте хозяина, не осуществляют процесса азотфиксации, то есть ведут сапрофитный образ жизни внутри клетки растения. В этом случае применяется термин “symbiotic cheaters”. Предполагается, что конкурентные ризобии эволюционировали, чтобы иметь возможность модулировать защитные механизмы хозяина для успешного проникновения в апопласт растения-хозяина (Provost *et al.*, 2008, Masson-Boivin, Sachs, 2018, Benezech *et al.*, 2020).

Другие защитные механизмы растения-хозяина, которые были обнаружены в процессе формирования симбиоза, это увеличение экспрессии генов резистентности, кодирующих R-белки, связанные с процессом патогенеза (PR), такие как хитиназы и пероксидазы, гены биосинтеза фитоалексинов, гены, отвечающие за выделение реактивных форм кислорода, а также гены, участвующие в модификации клеточной стенки (Knights *et al.*, 2021, Cardenas *et al.*, 2008, Trdá L *et al.*, 2015). Подобные реакции отмечаются при контактах растений с патогенами (Islamov *et al.*, 2021, Kravchenko *et al.*, 2021). При этом растение-хозяин, посредством процесса авторегуляции, также минимизирует число клубеньков, за

счет уменьшения количества вновь инфицированных примордиев (Nishida, Suzuki, 2018). Таким образом, очевидно, что образование клубеньков дает преимущество только в тех условиях, когда рост ограничен наличием доступного азота и когда выгода от получения азота через симбиоз превышает затраты на фотосинтез и поддержание роста клубеньков (van Velzen *et al.*, 2019).

1.8. Процесс внутриклеточной инфекции, переход ризобий в апопласт и симпласт растения-хозяина

Одним из важнейших последствий сигналов, полученных растением при контакте с микроколонией бактерий, является изменение фитогормонального баланса в месте контакта, что приводит к закладке и росту корневого клубенька (Ovtsyna *et al.*, 2000, Ovtsyna *et al.*, 2005, Smit *et al.*, 2005, Smit *et al.*, 2007, Wan *et al.*, 2007, Ovchinnikova *et al.*, 2011, Moling *et al.*, 2014). Новообразуемая меристема клубенька формируется в результате индуцированных делений в кортексе корня в течение 24 часов после инокуляции ризобиями (Parniske, 2018). При формировании корневого клубенька и бокового корня происходит индукция одних и тех же генов (Soyano *et al.*, 2019).

Чаще всего процесс перехода бактерий в апопласт и симпласт происходит в процессе скручивания корневого волоска. После прикрепления ризобий к корневому волоску происходит изменение вектора роста кончика корневого волоска. Проникновение в корневой волосок облегчается за счет направленного и локализованного лизиса клеточной стенки. После образования инфекционной нити она прорастает в примордий корневого клубенька, где и происходит освобождение бактерий в симпласт растительной клетки (Brewin, 2004).

Изменения в апопласте клубенька и локальный лизис клеточной стенки, обеспечивающий возможность входа бактерий в клетку растения-хозяина, является эволюционной инновацией, которая и обуславливает возможность существования симбиоза (Oldroyd *et al.*, 2011, Ivanov *et al.*, 2012, Parniske, 2018). При этом возможна индукция ответов на стресс как со стороны растения-хозяина, так и бактерии, как это было отмечено для патогенов (Petrova *et al.*, 2023).

У небобовых, таких как *Parasponia* и, возможно, других, проникновение бактерий происходит через трещину в эпидермальной зоне корня, при этом вход бактериальной колонии может включать гибель одной или нескольких клеток, из которых инфекционные нити способны прорасти в живые клетки примордия (Or den Camp *et al.*, 2011). Стоит отметить, что у относительно примитивных бобовых, таких как *Caesalpinioideae* и *Parasponia*, бактерии не высвобождаются из инфекционных нитей, а сохраняются в модифицированных инфекционных нитях, известных как «азотфиксирующие нити» (Or den Camp *et al.*, 2011, van Velzen *et al.*, 2018, van Zeijl *et al.*, 2018).

1.9. Новообразованный симбиотический орган: морфология корневых клубеньков и тип роста

Формирование клубеньков включает в себя координированные процессы: с одной стороны, это митотическая реактивация клеток корня (Xiao *et al.*, 2014), из которой образуется примордий корневого клубенька, и второй процесс, который включает непосредственно инфицирование клеток растения-хозяина.

Таким образом, для образования корневого клубенька необходима новая меристема, а пространственный паттерн меристемы определяет тип роста клубенька и основные различия между корневыми клубеньками разных видов растений (Hirsch, 1992).

В зависимости от расположения меристемы и продолжительности ее активного функционирования, а также от расположения меристемы в клубеньке, выделяют две основных формы клубенька (Рис.1 А,Б,В). Цилиндрические клубеньки (Рис.1А) относят к группе клубеньков с так называемым “недетерминированным типом роста”, который происходит за счет продолжительно (до 4-5 недель) действующей меристемы. К этой группе относятся цилиндрические корневые клубеньки с апикальной меристемой, которые формируются на корнях бобовых умеренного пояса, таких как *Pisum sativum* (горох полевой), *Trifolium pratense* (клевер красный), *Medicago truncatula* (люцерна усеченная) и других (Hirsch, 1992; Brewin, 2004; Patriarca *et al.*, 2004).

Пост-меристематические клетки клубенька в процессе дифференцировки проходят стадию полиплоидизации и инфицируются ризобиями (Cermola *et al.*, 2000, Vinardell *et al.*, 2003, Roudier *et al.*, 2000, Roudier *et al.*, 2003, Ivanov *et al.*, 2010). Размер инфицированных клеток в процессе роста и развития корневого клубенька значительно увеличивается, а симбиосомы достигают зрелости и становятся способны к азотфиксации. В базальной части клубенька расположена зона старения, где происходит прекращение симбиоза, дальнейший лизис инфицированных клеток, и ре-колонизация остатков клеток сапрофитными ризобиями, которые всегда находятся в апопласте клубенька (Berrabah *et al.*, 2023).

Другой тип наиболее часто встречающихся корневых клубеньков — это клубеньки сферической формы (Рис.1Б), которые формируются на корнях таких бобовых как соя (*Glycine max*), фасоль (*Phaseolus vulgaris*), лядвенец (*Lotus corniculatus*, *Lotus japonicus*). Меристема этих клубеньков, расположена в латеральной зоне клубенька, что и дает этим клубенькам сферическую форму. Меристема остается активной в течение 2-3 недель, на последующих этапах развития рост клубенька определяется скоростью роста и увеличением объема уже существующих клеток. Этот тип клубенька назван клубеньками с «детерминированным типом роста». Зоны развития симбиоза и дифференцировки микросимбионта в этих клубеньках можно выделить только у молодых клубеньков (2-3 недели). Более зрелый корневой клубенек содержит относительно однородную популяцию инфицированных клеток без четко видимой зональности (Brewin, 2004; Ferguson *et al.*, 2010, Op den Camp *et al.*, 2012, Margaret *et al.*, 2013, Gavrin *et al.*, 2016). Старейшая зона, зона терминации симбиоза, находится в центральной части клубеньков этого типа.

Еще один тип клубеньков, который формируется на корнях бобовых из группы люпинов (Fedorova *et al.*, 2007), а также у небобового растения *Parasponia* (Рис.1В) (Op den Camp 2012, van Velzen *et al.*, 2018, van Zeijl *et al.*, 2018), сочетает в себе признаки обеих описанных выше групп, зону азотфиксации и зону терминации симбиоза в базальной части.

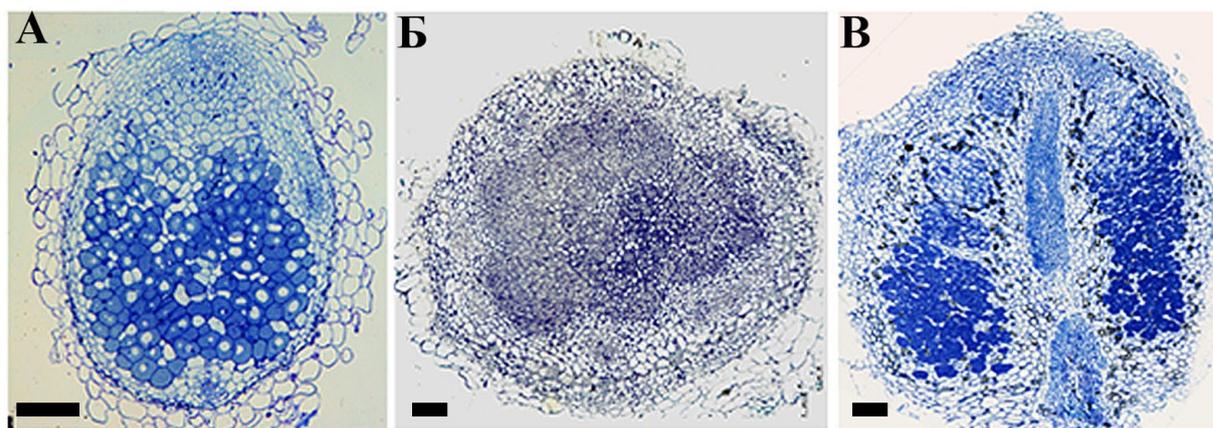


Рис. 1. Типы корневых клубеньков. (А)-клубенек люцерны, (Б)-клубенек сои, (В)-клубенек параспони. Масштабная линейка 50µm

1.10. Фитогормоны в процессе формирования клубеньков

Высокий уровень координации органогенеза корневого клубенька в процессе симбиоза связан с участием фитогормонов в регуляции этого процесса.

Фитогормоны, в основном цитокинины и ауксины, как факторы стимуляции, а также этилен, как ингибирующий фактор (Федорова и др, 1991, 1992, 2000, Oldroyd *et al.*, 2001, Mathesius *et al.*, 1998, Murray *et al.*, 2007), осуществляют как темпоральный, так и пространственный контроль процесса развития корневого клубенька (Liu *et al.*, 2018, Dolgikh *et al.*, 2019, 2020, Zorin *et al.*, 2023, Kohlen *et al.*, 2018). Локальное увеличение уровня цитокинина является необходимым фактором закладки и формирования корневого клубенька, а также создает возможность к выходу бактерий в симпласт клетки-хозяина (Tsyganov *et al.*, 1998; Voroshilova *et al.*, 2009; Tsyganova *et al.*, 2019). Исследования динамики цитокининов и ауксинов, проведенные на растениях гороха, мутантных по транскрипционным факторам IPD3/CYCLOPS и EFD (Dolgikh *et al.*, 2020), показали динамику в изменении содержания цитокинина в процессе развития симбиоза.

Цитокинины участвуют в индукции нескольких транскрипционных регуляторов формирования корневых клубеньков, таких как NSP2 и NIN (Vernié *et al.*, 2008, 2015, Ariel *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018). Индуцируемый цитокинином транскрипционный фактор NIN обеспечивает индукцию программы органогенеза клубеньков (Schiessl *et al.*, 2019). Образование примордиев корневых клубеньков,

индуцированное цитокинином, также зависит от экспрессии гена NIN. Обработка цитокинином вызывает экспрессию некоторых генов нодулинов, таких как нодулин 40 (ENOD40), необходимый для формирования клубеньков (Suzaki *et al.*, 2013, Gamas, *et al.* 2017).

Ауксин является важнейшим сигналом, контролирующим активность меристемы и скорость роста клубенька (Plet *et al.*, 2011, Suzaki *et al.*, 2014). При формировании клубенька ауксин участвует в контроле клеточного цикла, а также в формировании сосудистой системы клубенька (Kohlen *et al.*, 2018, Gao *et al.*, 2021). Развитие боковых корней и клубеньков сопровождается повышением экспрессии генов, отвечающих на ауксин: WOX5 и PLETHORAs в месте инициации обоих органов (Voivin *et al.*, 2016).

Согласно общепринятой концепции влияния цитокининов и ауксинов на развитие клубенька принято, что в процессе развития корневого клубенька индукция сигнала цитокинина блокирует полярный транспорт ауксина ниже места контакта корня с ризобиями, что приводит к формированию локального максимума концентрации ауксина в корне, координирующего органогенез клубеньков (Suzaki *et al.*, 2013, Gamas, *et al.* 2017). Исследование тканевой локализации и экспрессии альдегид-оксидазы, белка, который катализирует последний этап биосинтеза ауксина в растениях, в клубеньках белого люпина и люцерны усеченной, показало локальное увеличение синтеза альдегид-оксидазы и ауксина в меристеме и зоне инфицирования (Fedorova *et al.*, 2005). Низкий уровень экспрессии гена был обнаружен в клубеньках, у которых отсутствовала способность к азотфиксации (Fix-)(Fedorova *et al.*, 2005). Экспрессия промотора DR5::GUS, показала, что ауксин накапливается преимущественно в делящихся кортикальных клетках во время развития клубеньков (Suzaki *et al.*, 2013). Кроме того, уменьшение экспрессии генов транспортера ауксина MtPIN2/3/4 приводило к дефектам образования клубеньков у *M. truncatula* (Kohlen *et al.*, 2018, Schiessl *et al.*, 2019).

Дальнейший рост корневых клубеньков регулируется клеточным циклом клеток меристем, и зависит от экспрессии митотических циклинов (Jelenska *et al.* 2000, Roudier *et al.* 2003) синтез белков которых, в свою очередь, зависит уровня

ауксина. Гибберелины необходимы на поздних стадиях развития симбиоза, поскольку способны ингибировать старение клубенька (Serova *et al.*, 2019).

1.11. Авторегуляция формирования клубеньков

Поскольку поддержание клубеньков и азотфиксация являются энергоемкими процессами, у растений выработался системный механизм, подавляющий избыточное образование клубеньков, известный как авторегуляция формирования клубеньков. Цитокинин был предложен в качестве мобильного сигнала для этого процесса (Schiessl *et al.*, 2019). Некоторые члены семейства пептидов CLAVATA3/Embryo Surrounding Region (CLE), в частности MtCLE12 и MtCLE13, участвуют в системном пути авторегуляции (Osipova *et al.*, 2012, Gautrat *et al.*, 2019). Таким образом, цитокинин играет важную роль как в формировании и позиционировании клубеньков, так и авторегуляции их количества на корне (Suzuki *et al.* 2004).

1.12. Зоны развития корневого клубенька и их функционал

Классическое исследование Vasse *et al.* 1990, создало критерии классификации функциональных зон развития корневых клубеньков.

Это позволило, с помощью методов изоляции отдельных клеток из срезов клубеньков с последующим секвенированием полученной РНК, создать базу данных экспрессии генов (Roux *et al.* (2014), которая является актуальной до сих пор и позволяет оценить уровень экспрессии выбранных генов в зонах развития корневого клубенька люцерны усеченной (*Medicago truncatula*).

Зоны развития симбиоза у этого типа клубеньков хорошо изучены методами цитологии и транскриптомики (Vasse *et al.*, 2004, Roux *et al.*, 2018). В корневом клубеньке идентифицированы зона меристемы, зоны начала инфекции F1 и F2, интерзона, зона азотфиксации и зона старения (зона прекращения симбиоза). Зоны развития клубенька считаются метаболически различными, хотя степень различий пока полностью не охарактеризована. Транскриптомные исследования, проводимые в данной области, с целью выявить механизмы регуляции

метаболизма по мере развития корневого клубенька, позволили охарактеризовать динамику экспрессии ряда генов и синтеза некоторых белков.

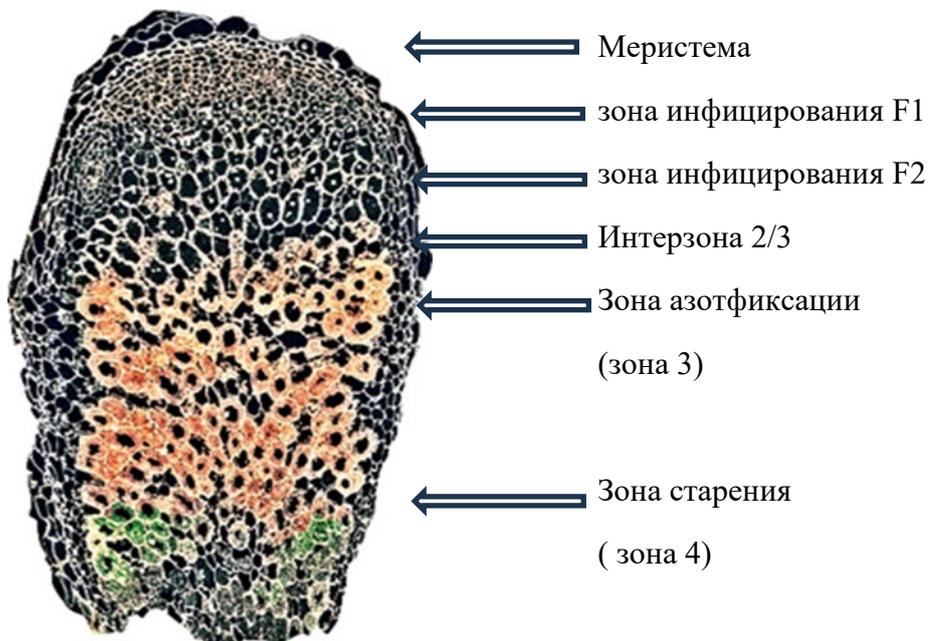


Рис. 2. Зоны развития симбиоза в корневом клубеньке люцерны

Так, нано-ультраэффективная жидкостная хроматография, в соединении с масс-спектрометрией, а также газовой хроматографией, были использованы для каталогизации белковых профилей целых клубеньков, корней, и трех фракций зон развития корневых клубеньков (Ogden *et al.*, 2017). Эти методические подходы позволили идентифицировать 361 белок *S. medicae* и 888 белков *M. truncatula*, а также 160 метаболитов. Исследование продемонстрировало отличия и изменения в зонах развития симбиоза, и позволило идентифицировать процессы скоординированного изменения углеводного метаболизма между симбионтами.

Наблюдения свидетельствуют о том, что *S. medicae* переходит от углеводного к зависимому от дикарбоновых кислот метаболизму в зоне II, согласно классификации Vasse *et al.* (1990).

Катаболизм углеводов растения-хозяина, *M. truncatula*, для производства C-4 дикарбоновых кислот через PEPС был активирован в зоне активной азотфиксации (зоне III, согласно классификации Vasse *et al.*, 1990), что

подтверждает роль C-4 дикарбоновых кислот в качестве основного источника углерода для азотфиксирующих бактериоидов.

Эти изменения также отражают неспособность зрелой инфицированной клетки синтезировать сахара в достаточных количествах, что указывает на определенные проблемы в поддержании ее жизнеспособности и является свидетельством модификации биологического состояния инфицированных клеток в процессе их онтогенеза.

1.13. Инфицированные клетки – уникальные эукариотические клетки

Хотя молекулярный диалог между растением и симбионтом может отличаться у разных видов, бактерии в конечном итоге интернализируются хозяином и размещаются внутри симпласта клеток корневого клубенька.

Ризобии проникают в клетки через трансцеллюлярные, связанные с клеточной стенкой инфекционные нити (Brewin, 2004) или путем проникновения в трещины коры корня из колоний, расположенных в межклеточных пространствах.

Формирование крупной колонии бактерий в симпласте живой клетки эукариота является достаточно редким явлением, и филогенетически ограничено несколькими семействами бобовых и одним небобовым растением *Parasponia*. Продолжительное проживание бактерий из группы ризобий в симпласте клеток растений встречается только в корневых клубеньках.

Развитие корневых клубеньков сопровождается транскрипционным перепрограммированием, которое вызывает изменения в анатомии, физиологии, транскриптоме и метаболоме клеток корня растения-хозяина (Ivanov *et al.*, 2010, van Velzen *et al.*, 2018, Ferguson, *et al.*, 2019, Mergaert *et al.*, 2020, Roy *et al.*, 2020).

Инфицированные клетки поддерживают жизнедеятельность тысяч живых ризобий в течение длительного периода - до 6-7 недель, что уникально для клеток эукариотов. Поэтому к особенностям этих клеток следует отнести их высокую толерантность к бактериальной колонии, которая находится в симпласте. Эти клетки должны рассматриваться как особые биологические единицы - симбиотические клетки (Fedorova *et al.*, 2023).

Симбиотические клетки защищены от де-факто ответов на инфекцию набором генов, которые вызывают временное подавление реакций иммунитета, однако это подавление не является универсальным. Некоторые антимикробные пептиды, обогащенные цистеином (NCR), синтезируются в бобовых (Mergaert *et al.*, 2018). Эти пептиды вызывают терминальную дифференциацию внутриклеточных бактерий или прекращение несовместимого симбиоза (Yang *et al.*, 2017). Структурно пептиды напоминают дефенсины, древние эукариотические пептиды, используемые для защиты от микробных патогенов (Mergaert *et al.*, 2018). В геноме люцерны усеченной *M.truncatula* было определено наличие нескольких сотен подобных пептидов. При исследовании экспрессии двух пептидов в корневом клубеньке было показано, что пептиды NCR экспрессируются специфически в инфицированных клетках (Mergaert, 2018, Horváth *et al.*, 2023, Nicoud *et al.*, 2021). Пептиды с подобными функциями также идентифицированы в клубеньках гороха (Zorin *et al.*, 2022). Было показано, что синтез этих пептидов приводит к превращению сапрофитной бактерии в терминально дифференцированный бактериоид.

Терминальная дифференциация бактериоидов зависит от растения-хозяина, поскольку именно растение-хозяин синтезирует NCR пептиды и специфичную сигнальную пептидазу SPC22, которая отщепляет сигнальный пептид NCR и контролирует перенос NCR к симбиотам в инфицированных клетках. Пептидные гены NCR не встречаются в геномах секвенированных бобовых таких как соя (Mergaert *et al.*, 2017), но, возможно, в этих клубеньках существуют их функциональные аналоги, поскольку терминальная дифференциация бактериоидов происходит и в этих клубеньках.

Точная роль каждого пептида NCR неизвестна, но они обладают антимикробным действием *in vitro* и способны образовывать поры в микробных клеточных мембранах.

Таким образом, продуктивный симбиоз является результатом достигнутого в процессе эволюции равновесия между про- и эукариотом, которые выживают в сложных условиях, используя доступные им ресурсы. Активное участие

антимикробного "арсенала" хозяина в формировании продуктивного симбиоза может быть распространенным явлением, пока слабо изученным.

1.14. Симбиосома: новая органелла или патогенная вакуоль?

После выхода клетки ризобий из инфекционной нити образуется временная органелла, названная симбиосомой (Roth, Stacey, 1989), которая содержит бактериоид и окружающую мембрану-производное цитоплазматической мембраны клетки-хозяина, а также перибактероидное пространство между бактерией и мембраной.

Эта уникальная временная органелла является главным элементом в симбиозе, поскольку после формирования колонии симбиосом в симпласте клетки создаются условия для восстановления молекулярного азота воздуха до аммиака.

Ризобии входят в клетки клубенька в результате процесса, структурно напоминающего эндоцитоз. Бактериальное высвобождение опосредуется формированием т.н. «бесстенных капель», областей инфекционной нити с локально деградированной клеточной стенкой.

Модификации мембраны, лишенные структурной клеточной стенки, создают т.н. «симбиотический мембранный интерфейс», к которому нужно отнести мембраны бесстенных капель и симбиосом. Создание этого интерфейса, лишенного клеточной стенки, является одной из важнейших особенностей симбиоза, хотя и недостаточно изученной. Наличие этой модификации эндомембран позволяет бактериям вступать в тесный контакт с цитоплазматической мембраной хозяина и входить в симпласт клетки клубенька будучи окруженной только мембраной клетки-хозяина, которая получила название «перибактероидной» мембраны.

После входа в клетку растения-хозяина, ризобии интенсивно делятся, практически полностью заполняя симпласт растительной клетки (Fedorova *et al.*, 1990, Brevin, 2004, Vasse *et al.*, 1990; Timmers *et al.*, 1999, Timmers, 2008, 2014, 2015). Дифференциация симбиосом различается в разных типах корневых клубеньков, но

на ранней стадии все бактериоиды по размеру и форме похожи на свободноживущие бактерии (Roth, Stacey, 1989).

В цилиндрических клубеньках с продолжительно действующей меристемой, образуются симбиосомы с одним бактериоидом, который в процессе дальнейшего развития увеличивается в объеме приблизительно в 30-40 раз, по сравнению со свободноживущими бактериями (Brewin, 2005).

В инфицированных клетках сферических клубеньков, таких как фасоль и соя, после деления молодые симбиосомы сливаются вместе, образуя симбиосомы с несколькими бактериоидами, которые по размеру незначительно отличаются от свободноживущих ризобий, в симбиосоме может находиться от двух до восьми бактериоидов (Cermola *et al.*, 1990, Fedorova *et al.*, 1999). В клубеньках небобового древесного растения Параспония симбиосомы не покидают инфекционные нити, называемые азотфиксирующими нитями (Op den Camp *et al.*, 2012, van Zeijl *et al.*, 2017).

Симбиосома имеет некоторую структурную аналогию с патогенными вакуолями, в которых находятся микроорганизмы, проникшие в клетку животного (Herweg *et al.*, 2015). Бактериальные патогены, такие как *Salmonella*, *Mycobacteria*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Brucella* в случае успешного входа в клетку хозяина, временно обитают в мембранных компартментах, называемых содержащими бактерии вакуолями. Нахождение в клетке и пролиферация бактерий вызывает изменение мембранного транспорта, путей эндо- и экзоцитоза, а также способствует изменению идентичности мембран содержащих бактерии патогенных вакуолей. Так, после проникновения в клетку бактерии *Salmonella*, образуется содержащая бактерию вакуоль, которая приобретает мембранные маркеры поздней эндосомы, что, видимо, позволяет бактерии временно избежать лизиса. Пребывание бактерий в цитоплазме клетки животного ограничивается несколькими сутками, после чего бактерия элиминируется, поскольку патогенные вакуоли достаточно быстро сливаются с лизосомами клетки-хозяина с последующим уничтожением бактерий. Хотя, в случае хронического процесса

инфекции, подобного туберкулезу, пребывание бактерии в клетке может быть более долгим, и заканчиваться гибелью клетки-хозяина (Walch *et al.*, 2021).

В отличие от патогенных вакуолей животных, в инфицированных клетках корневых клубеньков большинство симбиосом сохраняются в виде отдельных единиц в течение нескольких недель и не элиминируются, сливаясь с вакуолям хозяина. Это указывает на наличие факторов, которые предотвращают уничтожение бактерии, что само по себе является экстраординарным для клетки эукариота. Комплексная модель процессов, препятствующих немедленному уничтожению симбиосом в инфицированных клетках еще не разработана. Но некоторые механизмы, препятствующие элиминации ризобий в клетке хозяина были описаны для корневых клубеньков *M. truncatula* нашей группой (Limpens *et al.*, 2009, Ivanov *et al.*, 2012, Gavrin *et al.*, 2014), и включают постепенное изменение идентичности мембраны симбиосомы, а также изменения в функциональности вакуоли инфицированной клетки (Limpens *et al.*, 2009, Ivanov *et al.*, 2012, Gavrin *et al.*, 2014, Gavrin *et al.*, 2015, Gavrin *et al.*, 2016, Gavrin *et al.*, 2017). В то же время лизис бактерий и прекращение симбиоза также может индуцироваться во многих других случаях, включающих несовместимые взаимодействия и экологические стрессы (Coba de la Peña *et al.*, 2017, Margaret *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2017, Fedorova, 2023, Fedorova, Pueyo, 2024). В большинстве корневых клубеньков формирование симбиосомы происходит после высвобождения бактерий из инфекционной нити.

У большинства изученных бобовых растений клетки хозяина перестают делиться после заражения ризобиями (Brewin, 1991), причины для этого пока не установлены. Тем не менее, деление инфицированных ризобиями клеток происходит в некоторых клубеньках, таких как корневой клубенек белого люпина (*Lupinus albus L.*) (Fedorova *et al.*, 2007), но это единичное явление и является особенностью клубеньков белого люпина.

Предполагается, что симбиосомы бобовых могут представлять различные стадии эволюционного процесса в направлении создания азотфиксирующей органеллы (De La Peña, *et al.*, 2018). Различие между эндосимбионтом и клеточной органеллой остается предметом дискуссий. Постулируется, что ключевые аспекты

отличия органеллы от эндосимбионта включают в себя перенос генов из симбионта в ядро хозяина (De La Peña *et al.*, 2018). Дальнейшая эволюция симбиотических партнерств в новом интегрированном организме должна быть обусловлена вертикальной передачей симбионтов в потомство хозяина, (Kiers, West, 2015), основным критерием процесса является контроль хозяина над делением и сегрегацией органелл (Keeling, Archibald, 2008, Keeling *et al.*, 2015). Так, в процессе деления клетки, митохондрии и пластиды, органеллы эндосимбиотического происхождения, сегрегируются в дочерних клетках с помощью цитоскелета клетки-хозяина. С этой точки сегрегация симбиосом, по динамике сходная с сегрегацией органелл клетки-хозяина, в клубеньках белого люпина может указывать на оптимизацию процесса симбиоза в направлении более глубокой интеграции партнеров симбиоза (Fedorova *et al.*, 2007).

1.15. Органеллоподобные характеристики симбиосомы: композитное происхождение, дифференциация и мембранный комплекс

Зрелая симбиосома является временной азотфиксирующей органеллой клетки бобовых. Восстановленный азот экспортируется в виде аммиака в цитоплазму растения-хозяина и в дальнейшем в другие части растения в виде глутамина и других аминокислот. Сахара, вода и другие другие метаболиты переносятся в клетки корневого клубенька, и доставляются к симбиосомам через окружающие их мембраны.

Дифференциация и рост симбиосом зависит от способности растения переносить белки и другие необходимые для роста бактерий молекулы и воду к мембранам, окружающим бактериоиды. Это достаточно сложный и пока слабо изученный процесс. Перибактероидная или симбиосомная мембрана является производным цитоплазматической мембраны клетки-хозяина, но имеет собственную идентичность, так, она несет ряд маркеров цитоплазматической мембраны, например, H^+ -АТФазу (Fedorova *et al.*, 1999, Wienkoop and Saalbach, 2003). Дополнительный уровень дифференциации достигается за счет включения в мембрану ряда белков и липидов, и происходит на протяжении онтогенеза

симбиосомы (Ivanov *et al.*, 2010, Gavrin *et al.*, 2015, 2017, Fedorova *et al.*, 2020, 2021, Fedorova 2023, Semenova *et al.*, 2024).

Изучению состава симбиосомной (или перибактероидной) мембраны и перибактероидного пространства посвящены исследования, проведенные в последние 20 лет методами цитологии, биохимического анализа, а также методами геномного и протеомного анализа (Fedorova *et al.*, 1999, 2014, Goggin *et al.*, 2003, Limpens *et al.*, 2005, Patriarca *et al.*, 2004, Ogden, *et al.*, 2017, Rutten, Poole, 2019, Udvardi, M., Poole, 2013, Clarke, *et al.* 2014, Ivanov *et al.*, 2012, Gavrin *et al.*, 2014, 2015, 2016, 2017).

В клетках клубенька, содержащих симбиосомы, транспортная и секреторная системы клетки-хозяина используются как для снабжения самой клетки-хозяина, так и для поддержания существования тысяч симбиосом, обитающих в симпласте клетки (Wang *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2017, Fedorova, 2023, Fedorova *et al.*, 2024. Механизмы, обеспечивающие регуляцию и адаптацию этих систем требуют дальнейшего изучения, поскольку объем имеющейся информации по данной проблеме недостаточен.

Продолжительность жизни симбиосомы, принимая во внимание то, что симбиосомы представляют собой клетки живых бактерий, которые находятся в симпласте живой клетки-хозяина, неожиданно велика и достигает 21-28 дней, хотя причины этого пока недостаточно изучены (Fedorova, 2023). Но продолжительность пребывания бактерий в симпласте указывает на определенную согласованность транспортных потоков к мембране симбиосомы и доступность необходимых для роста симбиосомы белков и ионов и энергетических ресурсов в отличие от вакуолей, содержащей патогенные бактерии, существование которых, в основном, измеряется часами (Castanheira *et al.*, 2017).

Выживание инфицированных клеток, хотя и краткосрочное, зависит от синтеза белков леггемоглобинов, которые, действуя подобно гемоглобину животных обеспечивают наличие кислорода в инфицированной клетке (Kosmachevskaja, Topunov, 2009, Kosmachevskaya *et al.*, 2021). Симбиотические гемоглобины, по-видимому, экспрессируются только в корневых клубеньках,

предполагается, что их основная функция - перенос O_2 в цитозоле инфицированных клеток к азотфиксирующим бактериям в стабильно низкой концентрации, совместимой с активностью нитрогеназы и бактериальным дыханием. Гемоглобины способствуют выживанию растений в условиях временной гипоксии корней, а также модулируют уровень оксида азота (NO), ключевой сигнальной газовой молекулы с множеством функций. Транскрипционные факторы NIN-подобных белков (NLP) NLP2 и NIN напрямую активируют экспрессию леггемоглобинов в процессе развития симбиоза (Jiang *et al.*, 2021).

После появления ризобий в симпласте клетки, метаболизм клетки быстро изменяется. Так, если в начале инфицирования, непосредственно после выхода из инфекционной нити, молодые симбиосомы потребляют углеводы, то уже в следующей зоне развития они переходят от углеводного к зависимому от дикарбоновых кислот метаболизму, что, возможно, является ответом на недостаток сахаров и гипоксию в инфицированной клетке (Ogden *et al.*, 2018).

Катаболизм углеводов растения-хозяина для производства C-4 дикарбоновых кислот через PEPС активируется в зоне активной азотфиксации (зоне III, согласно классификации Vasse *et al.*, 1990), и это состояние клетки изменяет углеводный метаболизм, смещая его к использованию C-4 дикарбоновых кислот в качестве основного источника углерода для азотфиксирующих бактериоидов (Ogden *et al.*, 2018).

В инфицированной клетке были диагностированы изменения в процессах экзоцитоза и эндоцитоза, которые составляют основы гомеостаза и взаимодействия с окружающей средой. К местам взаимодействия растений и микробов переносятся различные ресурсы и материалы клетки-хозяина, но специфичность и регуляция этого транспорта пока не изучены. Отмечено изменение в составе микродоменов цитоплазматической мембраны, суб-компарментов, обогащенных сфинголипидами и стеролами, имеющих в своем составе ряд специфических белков. Реморины, флотиллины и другие белки, ассоциированные с мембранными микродоменами, вероятно участвуют в процессах адаптации инфицированной клетки к бактериальной колонии и органогенезе клубеньков, что указывает на

динамичность ответов клетки растения-хозяина в процессе развития симбиоза (Ott, 2011, Moling *et al.*, 2016, Jarsch, Ott, 2017).

1.16. Изменение мембранных компартментов клетки в процессе симбиоза, идентичность мембран

Все органеллы эукариотических клеток, имеющие мембраны, обладают собственной идентичностью, которая определяет особенности мембраны (Behnia, Munro, 2005). Идентичность клеточных органелл определяется специфическими мембранными белками, которые в основном участвуют в процессе слияния мембран. Это регуляторные ГТФазы семейства Rab и взаимодействующие с Rab интегральные белки семейства растворимых рецепторов белков прикрепления NSF (SNARE), (Behnia, Munro, 2005, Bassham, Blatt, 2008, Lipka, *et al.*, 2007). Исследования на растениях показали, что большинство SNARE ассоциированы с определенными внутриклеточными компартментами. Во время слияния везикул с мембраной соответствующие типы SNARE образуют высокостабильную белковую ассоциацию, называемую SNARE-комплексом (Behnia, Munro, 2005, Bassham, Blatt, 2008).

У животных некоторые внутриклеточные патогены используют стратегию «подмены идентичности мембран», например, вакуоли, содержащие сальмонеллы, приобретают белки Rab и, таким образом, принимают идентичность ранних/поздних эндосом (Vaughn, Abu Kwaik, 2021), что, возможно, продлевает время существования бактерий в симпласте клетки-хозяина.

К симбиосоме поставляется огромное количества белков, ионов и других необходимых для ее жизнедеятельности соединений (Fedorova, 2023). Регуляция специфичного для симбиотических тканей системы транспорта, переноса мембран, перенаправление везикул и необходимых белков именно к симбиосомной мембране давно вызывает значительный интерес исследователей симбиоза.

1.17. Механизмы формирования и поддержания колонии бактерий внутри клетки-хозяина

Наиболее быстрый рост симбиосом происходит в клеточных слоях, расположенных ближе к зоне фиксации азота в интерзоне 2-3 (Roux, *et al.*, 2014). Инфицированные клетки растут одновременно с ростом популяции симбиосом. В результате объем инфицированной клетки увеличивается в несколько раз по сравнению с объемом неинфицированной клетки в пределах 2-3 клеточных слоев (Gavrin *et al.*, 2014). Такое быстрое увеличение объема клетки предполагает наличие или появление мембранных ресурсов, а также индукции механизмов клетки-хозяина, формирующих эти ресурсы. Еще одно необходимое изменение это перенаправление к симбиотическому интерфейсу белков и мембран, которые изначально должны были направлены к цитоплазматической мембране, а также к мембранам эндосом и тонопласту.

Быстрый рост инфицированных клеток и размножение внутриклеточных бактерий ставит также вопрос о механизмах индукции синтеза мембран клетки-хозяина. Ресурсы мембран клетки-хозяина, которые могут быть использованы и заново синтезированы, это везикулы пост-Гольджи (Roth, Stacey, 1989, Gavrin *et al.*, 2016, Limpens *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010, Harrison, Ivanov, 2017) и эндоплазматический ретикулум, который уже давно считается одним из источников мембраны для симбиосом (Roth, Stacey, 1989). В молодых инфицированных клетках отмечается большое количество как цистерн, так и каналов эндоплазматического ретикулума. Контакты везикул ER с мембранами симбиосом были многократно подтверждены с помощью электронной микроскопии (Roth, Stacey, 1989, Wang *et al.*, 2010, Gavrin *et al.*, 2017, Harrison, Ivanov, 2017). Кратное увеличение поверхности симбиотического мембранного интерфейса, который включает симбиосомную мембрану, мембраны, окружающие инфекционную нить, а также бесстенные капли, в течение 24-48 часов является беспрецедентным уровнем синтеза мембран для клетки. Известно, что цитоплазматическая мембрана неэластична и не способна растягиваться более чем

на 3% (Arodasa, 2002), поэтому этот рост должен быть обеспечен именно высоким уровнем синтеза новых мембран, что предполагает индукцию, и сигналинг, которые бы стимулировали этот процесс.

Очевидно, что мембраны симбиосом благодаря этим процессам имеют изменяемую и мозаичную идентичность и сочетают в себе различные маркеры плазматической мембраны и эндосомы/вакуоли. На мембране симбиосом разных бобовых были идентифицированы транспортер железа (Brear *et al.*, 2020, Escudero *et al.*, 2020), активируемый железом транспортер цитрата (Kryvoruchko *et al.*, 2018), транспортер молибдена (Gil-Díez *et al.*, 2019), цинк-железная пермеаза (Abreu, *et al.*, 2017), сульфатный транспортер SST1 (Schneider *et al.*, 2019, транспортер меди (Senovilla *et al.*, 2018), пептидный транспортер Soybean Yellow Stripe-like 7 (Gavrin *et al.*, 2021) и несколько предполагаемых кандидатов в транспортеры малата (Booth, *et al.*, 2021). Таким образом, симбиосомная мембрана несет на себе постоянно изменяющийся комплекс мембранных белков разной природы, от белков, отвечающих за слияние мембран, до ионных транспортеров (Udvardi *et al.*, 2013, Clarke *et al.*, 2014, Fedorova, 2023).

В недавно представленной работе Luo *et al.* (2022) описали количественный протеомный анализ мембран симбиосом корневых клубеньков сои и представили схему предполагаемых изменений маршрутов транспорта к мембране симбиосомы и механизмов регуляции этого транспорта, но вопрос специфичности и направленности этого переноса, а также функциональности этих белков на мембране симбиосомы остается открытым. На настоящее время нет информации о молекулярных механизмах, индуцирующих и регулирующих этот процесс.

1.18. Изменения цитоскелета инфицированной клетки

После входа в клетку бактерий, происходят явные изменения в крайне важной для клетки системе клетки, отвечающей за транспорт везикул и поддержание целостности клетки, системе клеточного цитоскелета. Перестройка системы актиновых микрофиламентов и тубулиновых микротрубочек в

инфицированных клетках, которая связана с позиционированием органелл и влияет на форму клетки, обеспечивает транспортные пути мембранных везикул.

Механизмы, которые адаптируют архитектуру клетки хозяина для размещения внутриклеточных бактерий, пока неясны, однако то, что цитоскелет клетки хозяина реорганизуется после проникновения бактерий в клетку хозяина является признанным фактом (Fedorova *et al.*, 2007, Kitaeva *et al.*, 2016, Kitaeva *et al.*, 2022, Hlaváčková, *et al.*, 2023).

Нод-факторы могут влиять на изменение паттерна тубулинового цитоскелета на раннем этапе закладки примордия клубенька за счет активации цитокининов (Vandenbussche *et al.*, 2005, Jardinaud *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2018, Pozhvanov *et al.*, 2021). На более поздних этапах ауксин и этилен могут участвовать в реформации актинового цитоскелета (Pozhvanov *et al.*, 2016, Pozhvanov *et al.*, 2021, Sinha *et al.*, 2024).

Перестройка цитоскелета происходит на разных этапах симбиотического взаимодействия ризобий с растениями-хозяевами: во время роста и скручивания корневых волосков, формирования инфекционных нитей, интернализации бактерий из корневых волосков в клетки клубеньков, организации симбиосом в инфицированных клетках, но молекулярные механизмы, вызывающие эти процессы пока не исследованы, хотя существуют литературные данные относительно роли цитоскелета, как актиновых микрофиламентов, так и тубулиновых микротрубочек, для доставки мембранных компонентов и материалов, необходимых для роста симбиосом и распределении симбиосом в клетке (Timmers *et al.*, 1998, Cardenas *et al.*, 1998, Yokota *et al.*, 2009, Gavrin *et al.*, 2015, Kitaeva *et al.*, 2021, Liang *et al.*, 2021).

1.19. Транспорт к симбиосомной мембране: пространственное и временное разграничение секреции и мембранный транспорт

Внутреннее пространство органелл симбиотического происхождения (митохондрий и пластид), по мнению Bellucci *et al.*, (2017), можно определить как «внешнее внеклеточное пространство», аналогичное апопласту. Вполне вероятно,

что симбиосома также может быть определена как «внеклеточное пространство», а траффик в направлении симбиосомной мембраны представляет собой процесс секреции в апопласт. Недавние данные, полученные с помощью безметочной количественной протеомной технологии для мембраны симбиосомы сои, перибактероидного пространства и корневой микросомальной фракции, указывают на вероятную внеклеточную природу симбиосомы (Luo *et al.*, 2022).

При этом, естественно, встает вопрос о том, насколько специфичным в этом случае будет перенос различных белков в направлении симбиотического интерфейса, и насколько будет сохранен функционал этих белков, и ответа на этот вопрос мы пока не имеем. Трудно оценить количество белков, которые могут выделяться таким образом в пространство симбиосомы в разные моменты времени. Белки, находящиеся в эндоплазматическом ретикулуме, могут удерживаться в этом отсеке, перемещаться по секреторному пути, транспортироваться в вакуоли растений (минуя аппарат Гольджи), или выводиться во внешнее (внеклеточное) пространство (Bellucci *et al.*, 2017), и, в случае клеток клубенька, в симбиосому.

Механизмы специфической сортировки белков, перенаправляемых к симбиотическому интерфейсу (если таковые существуют), к настоящему времени не выяснены. Но можно предположить, что транспорт через эндоплазматический ретикулум является важным способом коммуникации между симбиотическими партнерами.

Встает вопрос как происходит разделение путей секреции во внеклеточное пространство и к симбиосоме, и как эти процессы регулируются в одной и той же клетке, поскольку две целевые мембраны - одна из них обозначающая границу клетки, и другая, окружающая внутриклеточные бактерии - должны быть каким-то образом разграничены.

1.20. Специфичность клеточного транспорта: SNARE комплекс

Одним из возможных способов регуляции специфичности мембранного транспорта в инфицированной клетке может являться контроль таргетирования мембран с помощью белков из группы SNAREs (SNAReceptor), специфичных

протеинов, расположенные на мембранах клетки: цитоплазматической мембране, мембране митохондрий, пластид, эндосом, некоторые SNAREs также локализованы в двух или более органеллах (Kwon *et al.*, 2020). SNAREs являются ключевыми молекулами, участвующими в транспорте везикул и слиянии мембран, и они также вовлечены в различные процессы пути транспорта везикул, например, антероградный/ретроградный транспорт, транспорт с участием аппарата Гольджи (т.н. сеть транс-Гольджи (TGN), к цитоплазматической мембране, а также в пути эндоцитоза к эндосомам и к вакуоли клетки. Белки SNAREs также опосредуют транспорт везикул в ответ на изменения условий окружающей среды, одним из которых является и взаимодействие в микроорганизмами (Lipka *et al.*, 2007).

В соответствии с их субклеточной локализацией, белки SNARE подразделяются на два типа: связанные с мобильными везикулами (v-SNARE) и связанные с мембраной мишени, то есть находящиеся на мембранах органелл и цитоплазматической мембране (t-SNARE) (Kwon *et al.*, 2008). В зависимости от остатка глутамина (Q) или аргинина (R) в середине домена SNARE, они могут быть разделены на Q- и R-SNARE. Фактически, t-SNAREs и v-SNAREs соответствуют Q-SNARE и R-SNARE. R-SNARE, расположенные на везикулах, обычно называются везикула-ассоциированными мембранными белками (VAMPs) (Jahn, Scheller, 2006).

Комплекс Qa-Qb-Qc-cis SNARE и R-SNARE (v-SNARE) создают функциональное слияние комплекса trans-SNARE на мембране-мишени. После слияния мембран, SNARE-комплексы трансформируются из транс- в цис-конфигурацию. Затем α -растворимый белок присоединения NSF (α -SNAP) опосредует разрушение комплекса SNARE путем рекрутирования этилмалеимид-чувствительного фактора (NSF) и активации его АТФ ферментной активности, тем самым высвобождая компоненты SNARE, и после этого цикл может возобновиться (Bassham, Blatt, 2008, Zhang, *et al.* 2015).

В растительной клетке R-SNAREs 721 (VAMP721) и VAMP722 участвуют в транспорте к цитоплазматической мембране, а также в секреции ауксина PINFORMED 2 (PIN2) (Zhang *et al.*, 2021). PEN1 (SYP121), один из синтаксинов

цитоплазматической мембраны, образует SNARE комплекс с SNAP33 и VAMP721/722 на цитоплазматической мембране растений. Хотя этот секреторный путь участвует в процессах роста и развития растений, он также имеет решающее значение для иммунной активности в процессе контакта растения с патогеном, когда он накапливается на мембране в месте контакта с клетками патогена. AtSYP121 был первым SNARE, функционал которого был связан с иммунитетом у растений и доставкой белковкалийных каналов к цитоплазматической мембране (Honsbein *et al.*, 2009, Kwon *et al.*, 2008, Samaj *et al.*, 2005).

1.21. Мембранный транспорт в корневых клубеньках: участники и особенности процесса

В корневых клубеньках первоначальное обнаружение SNARE SYP132 на мембране симбиосомы методами протеомного анализа было зафиксировано достаточно давно (Limpens *et al.*, 2009).

Исследования показали (Limpens *et al.*, 2009), что белок SYP132 на цитоплазматической мембране и белок на мембране симбиосомы являются двумя различными изоформами белка, происходящими от одного и того же гена. В условиях симбиоза экспрессируется дополнительный гомолог, SYP132A, который локализуется на мембране симбиосомы и является необходимым компонентом симбиотических отношений. Ингибирование его экспрессии методом РНК-интерференции приводило к формированию корневых клубеньков, имеющих фенотип Fix-, то есть неспособных к азотфиксации. Предположительно, этот фенотип обусловлен отсутствием успешной доставки белка в развивающиеся бактериоды.

1.22. Прекращение симбиотических отношений: естественное старение и влияние стрессовых условий

Зрелые симбиотические клетки частично гипоксичны, что позволяет поддерживать в клетке условия, благоприятные для экспрессии и функционирования фермента нитрогеназы ризобий и фиксации атмосферного

азота (Jiang *et al.*, 2021). Зона, состоящая из зрелых симбиотических клеток, определяется как зона азотфиксации. В наиболее отдаленных клеточных слоях, в базальной части клубенька, азотфиксация прекращается, и инфицированные клетки лизируются. Эта зона определяется как зона старения (Roux *et al.*, 2014). По моему мнению, было бы более уместно назвать эту последнюю зону «зоной прекращения симбиоза», поскольку другие ткани клубеньков, а также клетки корней, из которых происходит корневой клубенек, не подвергаются старению одновременно с инфицированными клетками.

Корневой клубенек является короткоживущей структурой, при этом он очень быстро прекращает азотфиксацию в случае наступления неблагоприятных условий среды, недостатка воды, избытка и недостатка ряда ионов, наличия нитрата, недостатка кислорода, похолодания, затенения. Время жизни клубенька как максимум составляет 8 недель. Причем в 8-недельном клубеньке несколько клеточных слоев в базальной части клубенька уже подвергаются лизису, а общая азотфиксирующая активность заметно снижается. Встает вопрос, что же вызывает столь быструю гибель корневого клубенька?

Сигнальные механизмы, так же, как и пути формирования корня и клубенька идентичны, но корень продолжает существовать после гибели клубенька, и, при отсутствии смены времен года, срок его жизни составляет годы, тогда как клубенек существует 6-8 недель, после чего опадает. Причины этого исследуются, но пока комплексного описания процесса не получено. Но продолжительность симбиоза недостаточна для покрытия потребностей растения-хозяина по протяжении всех фаз развития и созревания семян.

В условиях, если бобовые растения не имеют доступа к минеральному азоту, то есть выращиваются только на симбиотическом азоте, они имеют риск азотного голодания, поскольку уровень азотфиксирующей активности резко снижается после цветения. То есть растение теряет доступ к азоту гораздо раньше, чем завершится созревание семян. Поэтому, в условиях промышленного сельского хозяйства, выращивание бобовых на симбиотическом азоте не практикуется. Исследователи симбиоза в настоящее время делают попытки направленного

изменения параметров старения корневого клубенька с целью продления срока азотфиксации. Продуктивным подходом к повышению эффективности азотфиксации может быть задержка старения клубеньков и увеличения количества азота для обеспечения бобовых культур азотом в репродуктивный период (Serova *et al.*, 2017, 2018, Ivanova *et al.*, 2022, Tsyganova *et al.*, 2023).

Натуральное, не индуцированное внешними стрессами старение клубеньков, начинается в корневой проксимальной части зоны фиксации азота, зоне IV (Rua *et al.*, 2014), и характеризуется розово-зеленым цветовым сдвигом, обусловленным изменением окисления леггемоглобина, что является макроскопическим маркером прогрессирующего старения. Наряду с этими изменениями, отмечается индукция литических ферментов и транспорта в другие части растения белков, сахаров и других ресурсов (Purpo *et al.*, 2005, Cabeza, *et al.*, 2014, Navascués *et al.*, 2012). На микроскопическом уровне деградация клеточных структур инфицированных клеток является двухэтапным процессом, причем бактериоиды начинают лизироваться и разрушаться раньше растительных клеток (Yu *et al.*, 2023). На уровне ультраструктуры цитоплазма стареющих клеток клубенька постепенно становится менее электронно-плотной, появляются многочисленные везикулы.

Состав и структура органелл также изменяются в процессе старения, увеличивается количество пероксисом, а митохондрии начинают формировать сложные вытянутые структуры. Кроме того, симбиосомы меняют размер и форму по мере разрушения. В результате разрушения клеток хозяина и симбиосом наблюдаются многочисленные везикулы и пустые мембраны после лизиса симбиосом. Проксимальнее зоны старения находится область полной деградации клеток (зона V), заселяемая сапрофитными бактериями (Timmers *et al.*, 2000).

Исследование транскриптома стареющих клубеньков (Matamoros, Purpo *et al.*, 2005, Vecana, 2021, Minguillón *et al.*, 2022) показало, что в зоне старения бактериоиды находятся в состоянии стресса, и что в этой зоне экспрессируются протеины индуцируемые в ответ на патогены, а также глюконазы и пероксидазы, то есть индуцируются защитные механизмы клетки-хозяина, отвечающие на патогенную атаку. Поиск условий, которые являются триггерами старения

клубеньков, показал, что при действии абиотических стрессов и натуральном старении в тканях клубеньков отмечается повышение уровня реактивных форм кислорода (ROS), и именно эти изменения предполагаются на роль триггеров старения.

Конечным этапом старения является распад клеток обоих симбиотических партнеров. В клубеньках с недетерминированным типом роста зона прекращения симбиоза расположена в базальной части, но постепенно распространяется на весь клубенек. В сферических клубеньках с детерминированным типом роста, старение начинается в центре клубенька, и затем постепенно расширяется, достигая, через несколько недель, периферических клеточных слоев.

В стареющих клубеньках увеличивается также содержание окисленного глутатиона и гомоглутатиона, происходит каталитическое Fe-перекисное окисление липидов, а также появляются окислительно модифицированные белки и ДНК (Matamoros, Vecana, 2021, Minguillón *et al.*, 2022, Sauviac *et al.*, 2022). Натуральное старение корневых клубеньков в основном происходит как этап их развития и метаболизма, в то время как стрессы могут индуцировать этот процесс и на ранних этапах развития симбиоза.

В процессе исследований старения клубеньков были выявлены гены растений, дифференциально экспрессирующиеся как во время развития, так и во время индуцированного старения клубеньков, в том числе цистеиновые протеазы, пептидазы, и транскрипционный фактор NAC (Zélicourt *et al.*, 2012, Serova *et al.*, 2017, Deng *et al.*, 2019, Ivanova *et al.*, 2022, Tsyganov *et al.*, 2024). Среди генов растения-хозяина, которые активируются во время старения клубеньков, отмечены гены цистеиновых протеаз, тиоловой протеазы, транскрипционный фактор bZIP, ферменты, участвующие в биосинтезе этилена (ACS2 - ACC-синтаза и ACO1 - ACC-оксидаза) и АВА (АОЗ - альдегид-оксидаза), а также фермент, участвующий в катаболизме гиббереллинов (GA 2-оксидаза) (Fedorova *et al.*, 2007, Serova *et al.*, 2017).

Транскриптомный анализ клубеньков сои также показал экспрессию 4 генов цистеиновых протеаз: GmCYP (GmCYP35, GmCYP37, GmCYP39 и GmCYP45). Как

и в случае с GmNAC039 и GmNAC018, сверхэкспрессия или нокаут генов GmCYP в клубеньках приводили к преждевременному или замедленному старению соответственно (Yu *et al.*, 2023). У бобовых растений, кроме цистеиновых протеаз, индуцируются также другие гены, связанные со старением, такие как транскрипционные факторы, а также белки, участвующие во взаимодействии растений с патогенами (Zhou *et al.*, 2021).

Анализ экспрессии специфических маркеров защиты от патогенов или старения (цистеиновые протеазы) показал, что старение и иммунитет, по-видимому, являются антагонистами в корневых клубеньках, что было показано при исследовании мутантов люцерны усеченной, которые не способны фиксировать азот (fix- фенотип).

Применение стресса (ранение) на корневых клубеньках дикого типа приводило к гибели внутриклеточных ризобий и сопровождалось совместной стимуляцией маркеров защиты и старения (Berrabah *et al.*, 2023). В мутантных (fix-) клубеньках иммунный ответ был связан с репрессией генов DNF2 (Defective in Nitrogen fixation 2), симбиотической SymCRK (Cystein Receptor-like kinase1) и RSD (Regulator of symbiosome differentiation) - ключевых генов, участвующих в подавлении иммунитета в процессе симбиоза. Прекращение репрессии иммунитета приводит к прекращению симбиоза и образованию нефункциональных корневых клубеньков (Berrabah *et al.*, 2023).

Считается, что транскрипционные факторы регулируют многие аспекты развития клубеньков и симбиоза у бобовых, включая и прекращение симбиоза. Так регулятор дифференциации симбиосом (RSD) *M. truncatula*, член семейства цистеин-2/гистидин-2 (C2H2) растительных транскрипционных факторов, необходим для нормальной дифференциации симбиосом во время развития клубенька (Sinharoy *et al.*, 2013). RSD экспрессируется специфично в клубеньке с максимальным уровнем транскрипта в зоне инфицирования. Мутант *rsd* продуцировал клубеньки не способные фиксировать азот и содержащие неполноценные дифференцированные симбиосомы и бактериоиды.

Таким образом, старение корневого клубенька представляет собой процесс терминации симбиоза, а последствиями этого является ремобилизация питательных веществ из клубенька в другие органы растения (Purro *et al.*, 2005; Serova, *et al.*, 2018, Серова, Цыганов, 2014, Berrabah *et al.*, 2023). Из органа, который используем значительное количество углеводов и других ресурсов, клубенек на короткое время превращается в источник питательных веществ для растения, а деградация белков позволяет получить дополнительные ресурсы азота.

1.23. Индуцированное старение клубеньков под действием нитратов и солевого стресса

Абиотические стрессы являются одним из основных ограничивающих факторов в сельском хозяйстве, влияющих на урожайность сельскохозяйственных культур, и также играют ключевую роль в регуляции старения корневых клубеньков. Поскольку корневые клубеньки плохо переносят негативные изменения в условиях окружающей среды, такие как уменьшение светового потока, наличие нитратов, засоление, избыточное или недостаточное увлажнение, то стрессы такого рода давно используются для экспериментального индуцирования старения клубеньков. Sauvias *et al.*, (2022) использовали двойной транскриптомный подход "растение-бактерия" в условиях старения, индуцированного нитратом или солевым стрессом.

Клубеньки, находившиеся под солевым или нитратным стрессом, демонстрировали профили экспрессии, отличающиеся от профилей экспрессии в необработанных клубеньках, при этом обработка нитратом показала наибольшее число дифференциально экспрессированных генов.

В общей сложности 13673 гена *M. truncatula* и 2176 генов *S. meliloti* были дифференциально экспрессированы по крайней мере в одном из этих двух условий, в том числе 53% генов растения-хозяина и 29% генов микросимбионта были экспрессированы как при нитратном, так и при солевом стрессе. Гены ризобий с высокой экспрессией в натурально стареющих клубеньках и в клубеньках в условиях стресса, включали несколько генов, связанных со стрессом, так была

отмечена активация бактериального общего стрессового ответа (Sauviac *et al.*, 2022).

Со стороны растения-хозяина, в отличие от бактерий, гены, отвечающие за пролиферацию клеток, были репрессированы, о чем свидетельствует снижение экспрессии генов циклинов, белков, регулирующих клеточный цикл в клубеньках (Roudier *et al.*, 2000, 2003).

1.24. Транспорт необходимых ионов в растительных клетках: солевой стресс и изменения метаболизма клубенька

Транспорт необходимых соединений и ионов, а также воды, является наиболее динамичной системой поддержания жизни любого растения.

Изменения условий окружающей среды, почвы и освещенности немедленно вызывают ответ со стороны растения, который опосредуется активацией имеющихся переносчиков, либо синтезом новых белков, а также молекулярных регуляторов. Ионные каналы классически понимаются как посредники в ответе на изменения окружающей среды, опосредуя поток ионов через цитоплазматическую мембрану. Поглощение различных ионов в растениях зависит от специфических транспортеров, которые различаются по кинетической регуляции и энергии связи, и располагаются на внутриклеточных мембранах, регулируя функции органелл и клетки. Такие органеллы как митохондрии, ядро, хлоропласты и пероксисомы, выполняют специфические клеточные функции и находятся в симпласте, ионные каналы и транспортеры функционально присутствуют на мембранах всех органелл (Xu *et al.*, 2015).

Растения обладают адаптивной стратегией регуляции катионных транспортеров цитоплазматической мембраны для поддержания ионного гомеостаза, что является жизненно необходимым во время солевого стресса. Они обладают набором транспортеров и каналов, расположенных на цитоплазматической мембране, тонопласте и мембранах эндосом. Транспортеры калия могут иметь разнонаправленные вектора транспорта, перенося калий внутрь и вовне клетки, это могут быть НКТ транспортеры, НАК/KUP/КТ K^+ транспортеры,

TANDEM-PORE K^+ (TPK) каналы и Shaker-type K^+ каналы, например, АКТ1, каналы SKOR и GORK, которые регулируют отток калия в клетках устьиц и транспорт ионов калия из клеток (Adem *et al.*, 2020).

Изучение ионного транспорта в значительной степени связано с попыткой минимизировать ущерб от солевого стресса, от которого страдают практически все сельскохозяйственные растения. Высокая соленость индуцирует ионный дисбаланс у растений в связи с накоплением натрия, который отрицательно влияет на доступность калия, что приводит к падению продуктивности. Калий является необходимым моновалентным катионом в клетках, который регулирует фотосинтез, тургорное давление, ионный и водный гомеостаз, а также выступает в качестве кофактора для более чем 50 ферментов. (van Zelm *et al.*, 2020, Zhao *et al.*, 2021, Joshi *et al.*, 2022). Для поддержания более высокого соотношения K^+/Na^+ внутри клетки растения контролируют Na^+-K^+ транспортеры, а также активность протонных насосов (Shabala, Pottosin, 2014). В условиях стресса увеличивается накопление реактивных форм кислорода, происходит утечка электролитов, нарушается осмотическое равновесие (Joshi *et al.*, 2022). В растительных клетках K^+ в основном депонирован в вакуолях и цитозоле, цитозольный K^+ -гомеостаз является важным механизмом для поддержания тургорного давления в клетках (Hryvusevich *et al.*, 2021).

Особенностью корневого клубенька является низкая толерантность к стрессам, и солевой стресс является состоянием терминальным для симбиоза. В случае наступления стрессовых условий, уровень азотфиксации очень быстро и значительно снижается, и растение в короткое время в пределах нескольких суток прекращает симбиотические отношения (Chakraborty *et al.*, 2021). Молекулярные механизмы этих реакций пока недостаточно изучены и в настоящее время мы обладаем достаточно фрагментарными знаниями касательно ионного транспорта в корневом клубеньке. Имеющаяся информация базируется на исследованиях отдельных факторов, и некоторых генов (Fedorova *et al.*, 2021, Trifonova *et al.*, 2022).

При исследовании клубеньков прогнозирование физиологического ответа должно также учитывать особенности тканей корневого клубенька, а именно то, что инфицированные клетки находятся в состоянии гипоксии. А гипоксия растений негативно влияет на метаболизм клеток, затрудняет аэробное дыхание и синтез АТФ, а значит, оказывает серьезное влияние на выживание и обеспечение мембранного транспорта в случае ответа на стресс.

Информация, касающаяся молекулярных механизмов ответа, может помочь в отборе или конструировании более устойчивых сортов растений, клубеньки которых будут способны к азотфиксации в условиях солевого стресса.

Данные о изменении локализации и функционала некоторых ионных каналов в инфицированных клетках были представлены нашей группой в последние годы. Нами было показано, что в корневых клубеньках даже без наложения ионного стресса происходит нарушение транспорта калия к симбиосомам, а также потеря ионных каналов с мембран корневого клубенька (Fedorova *et al.*, 2021, Trifonova *et al.*, 2022), то есть клубеньки имеют эндогенный дефект транспорта калия внутрь клетки.

Проведение скрининга при культивировании бобовых на выносливость по отношению к таким стрессам, как солевой стресс и нитраты, могло бы способствовать повышению эффективности симбиоза.

Таким образом, выраженные изменения мембран в инфицированной клетке в процессе формирования симбиоза, включают ремоделирование цитоплазматической мембраны, цитоскелета, везикулярного транспорта и, связанные с этими процессами изменения эндоплазматического ретикулума (Цыганова., Цыганов, 2019, Rosado, Bayer, 2021).

Глава 2. Методические подходы и использованные материалы

2.1. Растения и бактерии, использованные в работе, условия проведения опытов

Растения люцерны усеченной (*Medicago truncatula*) и сои (*Glycine max*) выращивали в вегетационной камере при 16-часовом освещении и температуре 21°C. Растения люцерны инокулировали бактериями *Sinorhizobium meliloti* 2011. Использовался сорт *Medicago truncatula* Jemalong A17, для инокуляции использовали *Sinorhizobium meliloti* 2011 (дикого типа), либо Sm2011-mRFP, экспрессирующий красный флуоресцентный белок mRFP (Smit *et al.*, 2005, Limpens *et al.* (2004). Для получения клубеньков сои 2-дневные проростки сои инокулировали *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Для инокуляции использовалась живая культура ризобий.

2.2. Подбор генов для исследований

Для поиска генов люцерны и сои предварительно были идентифицированы гены *Arabidopsis thaliana* в доступных база данных геномных и кДНК-последовательностей (<https://www.uniprot.org>), полученные последовательности использовались для поиска гомологов люцерны *M. truncatula* и сои *Glycine max*. Выбранные белковые последовательности были использованы для поиска гомологов в общедоступных биоинформационных ресурсах: <https://www.uniprot.org>, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.3. Анализ экспрессии генов *in silico*

Уровень экспрессии генов, намеченных для исследований, предварительно оценивали в различных зонах развития клубеньков, используя базу данных портала Symbimics <https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics> (Roux *et al.*, 2014), созданную на основе анализа РНК, полученной путем микродиссекции с лазерным захватом клеток в разных зонах развития корневого клубенька.

2.4. Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

РНК выделяли из корней и корневых клубеньков с помощью набора E.Z.N.A. Plant RNA Mini Kit, 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 iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

2.5. Праймеры

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.

2.6. Клонирование генов и приготовление диагностических генетических конструкторов для исследований клубеньков люцерны усеченной

Открытые рамки считывания генов *Rab5A1*, *A2*, *B* и *Rab7A1*, *A2*, *SYP22*, *VTI11*, *SYP132*, *SYP4*, *MtNHX7*, *MtAKT1* были амплифицированы методом ПЦР из кДНК 10-дневных клубеньков с использованием высокоточной Phusion Taq-полимеразы (New England Biolabs) и направленно клонировали в pENTR-D-TOPO (Invitrogen).

Гены *MtSYP22* и *MtVTI11* были направленно клонированы с помощью *HindIII-KpnI* и *BamHI-EcoRI*, соответственно, в модифицированный вектор pENTR (pENTR2), содержащий сайт множественного клонирования. pENTR клоны *Rab5A1*, *Rab5A2*, *Rab7A1*, *Rab7A2*, *SYP22*, *VTI11*, *SYP132* и *SYP4* были рекомбинированы в один из следующих Gateway-совместимых бинарных векторов с использованием LR Clonase (Invitrogen): 35S-pK7WGF2-R (содержащий промотор 35S) (Smit *et al.*, 2005), UBQ3-pK7WGF2-R, E12-pK7WGF2-R и LBpK7WGF2-R, создавая N-концевые слияния GFP-X. pENTR клон *Rab5B* был рекомбинирован в 35S-pK7FWG2, E12-pK7FWG2, и LB-pK7FWG2; pENTR клоны

d-TIP и g-TIP были рекомбинированы в UBQ3-pK7FWG2, создавая C-концевые X-GFP слияния. Для RNAi pENTRRab7A1 рекомбинировали в pK7GWIWG2(II)-Q10:DsRED (Limpens *et al.*, 2005).

Открытая рамка считывания и предполагаемый промотор MtAKT1 были направленно клонированы в плазмиду pENTR-D-ТОРО (Invitrogen). Система клонирования Gateway (Invitrogen) была использована для создания генетических конструкций для слияния промотора:GUS (β -глюкуронидаза) и GFP (зеленый флуоресцентный белок). pENTR-D-ТОРО, несущий MtAKT1, был рекомбинирован с помощью Gateway LR Clonase II (Invitrogen) в целевой вектор Gateway pKGW-GGRR с помощью реакции LR для создания слияния ProMtAKT1:GUS. Для создания трансляционного слияния ProMtAKT1:MtAKT1:GFP, MtAKT1 был вырезан из pENTR-D-ТОРО с помощью ферментов рестрикции NotI и AscI, очищен в геле и лигирован в pENTR 4. После этого конструкции pENTR, содержащие ProMtAKT1 и MtAKT1, и pENTR 2, 3, содержащие GFP, были введены путем многосайтовой LR-рекомбинации в Gateway-вектор назначения pKGW-MGW.

Последовательности ДНК синаптотагминов *M. truncatula*, названных MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3 были найдены с помощью BLAST на основе гомологии с геном арабидопсиса SYT1 (Schapire *et al.*, 2008). Гены MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3 и их предполагаемые промоторы были амплифицированы методом ПЦР на кДНК геномной ДНК *M. truncatula*, соответственно, с использованием полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) и специфических праймеров. ПЦР фрагменты были введены в pENTR-D-ТОРО (Invitrogen) и секвенировали. Далее каждый промотор был повторно клонирован в два различных вектора pENTR 4-1 (Invitrogen); один из них с GFP а другой - без GFP (Invitrogen).

Для создания N-терминального слияния GFP эти векторы вместе с pENTR-ТОРО, содержащим гены MtSyts, и pENTR 2-3 (с или без GFP) были впоследствии рекомбинированы в модифицированный вектор назначения pKGWUBQ10::DsRED (Limpens *et al.*, 2004) с использованием технологии Gateway (Invitrogen). Двойные конструкторы РНК интерференции были созданы путем слияния MtSyt1, MtSyt2 и

MtSyt3 ПЦР-генерированных последовательностей с использованием протокола взятого из Franssen *et al.* (2015).

Конститутивно-активные и доминантно-негативные Rab7A2 конструкты были получены с помощью двух последующих реакций ПЦР (Ivanov *et al.*, 2009, Gavrin *et al.*, 2014, 2016). Полученный фрагмент был направленно клонирован в pENTRD-TOPO (Invitrogen), проверен секвенированием и впоследствии рекомбинирован в 35S-pK7WGF2-R, E12-pK7WGF2-R и LB-pK7WGF2-R, совместимые с Gateway бинарные векторы, содержащие Ubiquitin3 (UBQ3), ENOD12 (E12) и промотор LB (леггемоглобин).

Для создания плазмидных конструктов для исследования распределения канала шейкерного типа MtAKT1, открытая рамка считывания MtAKT1 и ее регуляторная последовательность размером 2,5 кб были амплифицированы посредством ПЦР из кДНК и геномной ДНК клубенька, с использованием высокоточной полимеразы Phusion (Finnzymes). Предполагаемые промоторы MtAKT1 и MtAKT1 были направленно клонированы в плазмиду pENTR-D-TOPO (Invitrogen). Gateway (Invitrogen) была использована для создания генетических конструктов для промотор:GUS (β -глюкуронидаза) и создания конструктов под собственными промоторами, несущих GFP (Fedorova *et al.*, 2020). Вектор pENTR-D-TOPO, несущий MtAKT1, был рекомбинирован с использованием Gateway LR Clonase II (Invitrogen) в вектор назначения Gateway pKGW-GGRR с помощью реакции LR для создания слияния ProMtAKT1:GUS.

Для создания трансляционного слияния ProMtAKT1:MtAKT1:GFP, MtAKT1 был вырезан из pENTR-D-TOPO с помощью ферментов рестрикции NotI и AscI, очищен из геля и лигирован в pENTR 4, 1. После этого конструкты pENTR, содержащие ProMtAKT1 и MtAKT1 и pENTR 2, 3, содержащие GFP, были введены путем многосайтовой LR рекомбинации в Gateway вектор назначения pKGW-MGW.

2.7. Трансформация

Штамм *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 использовали для трансформации и получения волосатых корней согласно Limpens *et al.* (2004).

2.8. Клонирование генов и приготовление диагностических генетических конструкторов для исследований клубеньков сои

Суммарную РНК выделяли из корней и корневых клубеньков через 28 дней после инокуляции (dpi) с помощью набора E.Z.N.A. Plant RNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA) и транскрибировали в кДНК с помощью набора для синтеза кДНК iScript (Bio-Rad). ПЦР в реальном времени проводили в 20-луночной реакционной системе с использованием iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Ген-специфичные праймеры были разработаны с помощью программы PRIMER 3-PLUS (Untergasser *et al.*, 2007).

Открытые рамки считывания GmVamp721d (Glyma09g02310) и GmNPL1 (Glyma11g37620) были амплифицированы методом ПЦР из кДНК 28-дневных клубеньков с использованием Phusion high fidelity полимеразы (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Входные клоны были получены методом клонирования TOPO (Invitrogen). Открытая рамка считывания гена MtNHX7 и ее регуляторная последовательность длиной 2,5 кб были амплифицированы с помощью ПЦР из кДНК и геномной ДНК клубеньков, соответственно, с использованием полимеразы Phusion (Finnzymes). Кодированная последовательность MtNHX7 была направленно клонирована в модифицированный вектор pENTR (pENTR2), содержащий сайт множественного клонирования. Входные клоны для промотора MtNHX7 были сгенерированы методом клонирования TOPO (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Система клонирования Gateway (Invitrogen) была использована для создания генетического конструктора, содержащего GFP. Клон pENTR MtNHX7 был рекомбинирован в целевой вектор pKGW-GGRR используя LR Clonase (Invitrogen). Трансляционное слияние ProMtNHX7:MtNHX7:GFP было получено путем множественного клонирования гена и промоторных последовательностей в вектор pKGW-MGW.

Система клонирования Gateway (Invitrogen) использовалась для создания генетических конструкций для РНК-интерференции (РНКi) и слияния с зеленым флуоресцентным белком GFP. Клоны pENTR рекомбинировали в следующие векторы назначения с помощью LR Clonase (Invitrogen): pGmLBc3-pK7GWIWG2 для РНК-интерференции и pGmLBc3-pK7WGF2-R для N-концевого GFP-Х слияния. N-терминальное слияние с флуоресцентной меткой является оптимальным для поддержания правильной мембранной локализации и сохранения функциональной активности VAMP721 в конструктах, с использованием метки GFP (Ivanov *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015, Gavrin *et al.*, 2016). Для создания вектора РНК интерференции, управляемого промотором GmLBc3, участок pK7GWIWG2, фланкированный MluI и SacI, был амплифицирован методом ПЦР и клонирован в pCR8 (Invitrogen). Этот вектор был дополнительно модифицирован путем замены промотора 35S на промотор GmLBc3 сайтами рестрикции SacI-SpeI. После этого модифицированная область pK7GWIWG2 была введена в pK7GWIWG2 с помощью MluI-SacI, заменив коренную последовательность.

2.9. Анализ экспрессии методом ПЦР в реальном времени в клубеньках сои

Количественный анализ RT-PCR проводился на РНК, выделенной из 10-дневных и 3-недельных клубеньков, а также РНК из клубеньков растений после трансформации. РНК выделяли и обрабатывали ДНК-зой с помощью набора Plant RNeasy (Qiagen, в соответствии с инструкциями производителя), кДНК синтезировали из 1 мг тотальной РНК с помощью набора Taqman Gold RT-PCR (Perkin-Elmer Applied Biosystems) в общем объеме 50 мкл с использованием случайных гексамерных праймеров.

Анализ проводился в трех-шести повторностях, использовали 1 мкл кДНК с использованием набора Quantitative PCR Core kit for SYBR Green I (Eurogentec), детекцию в режиме реального времени проводили на приборе MyiQ (Bio-Rad) (40 циклов). Ген домашнего хозяйства GAPDH использовали в качестве контроля.

2.10. Исследование ответа корневого клубенька на солевой стресс

Восьминедельные растения подвергали солевому стрессу, поливая питательным раствором содержащим 100 мМ NaCl в течение двух недель. Для анализа использовали корневые клубеньки из второго поколения, которое образовалось на боковых корнях примерно на 4 недели позже, чем первое поколение, которое формируется на главном корне. В этих клубеньках не было видимой зоны старения.

2.11. Анализ распределения белка MtNHX6

Проводили с использованием специфических антител, изготовленных при иммунизации кролика GenScript (Piscataway, NJ, USA) с использованием пептида SENEISPADVHKAP из белковой последовательности MtNHX6 в разведении 1:100.

2.12. Конфокальная микроскопия

Трансгенные корни и клубеньки отбирали на основе экспрессии GFP или DsRED1с помощью бинокля Leica MZFLIII, оснащенного объективами HQ470/40, HQ525/50, HQ553/30 и HQ620/60 оптическими фильтрами (Leica Microsystems). Трансгенные клубеньки срезали вручную с помощью обоюдоострых бритвенных лезвий и монтировали на предметные стекла микроскопов в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 25 мг/мл сахарозы. Трансгенные корни и срезы клубеньков были проанализированы на конфокальных лазерных микроскопах Zeiss LSM 510 и Meta LSM 510 (Leica)

2.13. Настройки конфокального микроскопа

(DsRED1/mRFP/CY3); эмиссия GFP/Sytox Green/Alexa 588 селективно детектировалась с помощью полосно-пропускающего фильтра 505-530 нм; эмиссия DsRED1/mRFP/CY3 определяли в другом канале с использованием полосно-пропускающего фильтра 560-615 нм.

2.14. Методы анализа с использованием антител

Клубеньки или корни фиксировали в 1% свежего деполимеризованного параформальдегида в буфере PBS, pH 7,4, в течение 30 мин при 48С. Конфокальная визуализация белков, слитых с GFP, проводилась на трансгенных клубеньках, разрезанных по медиане клубенька вручную. Срезы клубеньков блокировали в нормальной козьей сыворотке или 3% BSA и далее инкубировали с первичным антителом в течение ночи при 5°С в PBS, содержащем 0,3% Triton X-100 для пермеабиллизации клеток (Fedorova *et al.*, 2005). Вторичные антитела (полученные против белков кролика или мыши) были помечены флуоресцентным красителем Alexa 488 или CY3 (Molecular Probes) использовали в соответствии с инструкциями поставщика. Контроли проводили в отсутствие первичных антител. Участки клубеньков, содержащие ризобии дикого типа Sm2011, окрашивали Sytox Green (Molecular Probes) или йодистым пропидием и просматривали с помощью конфокальной микроскопии.

2.15. Первичные антитела

Антитела разводили следующим образом: анти-GFP (полученные при иммунизации кролика) (Molecular Probes), 1:200; анти-GFP полученные при иммунизации мыши (Molecular Probes), 1:50; анти-Ara7 (полученные от профессора T. Ueda), 1:200; анти-Ara6 (T. Ueda), 1:100; анти-Rab7 полученные при иммунизации мыши (GenScript), 1:50 и 1:100; анти-VTI11 полученные при иммунизации кролика (GenScript), 1:100 и 1:200; анти-BP-80 (полученные от профессора N. Paris), 1:100. Аффинно очищенные поликлональные мышинные анти-Rab7 и поликлональные кроличьи анти-VTI11 были созданы компанией GenScript против пептидов FLIQANPSDPENFPC (Rab7) и RKMDLEARSLQPNIC (VTI11). Антитела против SKOR были изготовлены при иммунизации кролика против пептидной последовательности FHPWDPKEQRRNGI, и использовались в разведении 1:100, с последующим окрашиванием среза вторичными антителами, мечеными флуорофором Alexa 488. Для двойной иммунолокализации MtAKT1 и Rab7 смешивали антитела против GFP, полученные при иммунизации кролика с

антителами против MtRab7, полученными при иммунизации мыши (Limpens *et al.*, 2009), после чего использовали вторичные анти-кроличьи антитела, меченые флуорофором CY3 (максимум возбуждения 548 нм, максимум эмиссии 561 нм; Molecular Probes) и антитела против мышинных антигенов меченые Alexa 488 (максимум возбуждения 490 нм, максимум возбуждения 490 нм, максимум эмиссии 525 нм; Molecular Probes), соответственно. Использовали также специфичные первичные поликлональные антитела против VAMP721d/VAMP721e (GenScript, USA), полученные при иммунизации кролика (Ivanov *et al.*, 2012) в разведении 1:50-100 и вторичные антитела полученные при иммунизации осла белком кролика, меченые Alexa 488 (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) при разведении 1:200.

2.16. Исследование локализации каллозы

Для исследования локализации каллозы использовали моноклональные антитела (Biosupplies, La Trobe Uni, Bundoora, Вик, Австралия) (разведение 1:20) и вторичные антитела против белков мыши, меченые Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) в разведении 1:50.

Локализацию целлюлозы анализировали с помощью окраски Calcofluor White (Sigma-Aldrich) (1 г/литр в смеси с Эванс синий (0,5 г/ л).

2.17. Исследование локализации пектина

Для исследования локализации пектина использовали моноклональные антитела против изоформ пектина полученные при иммунизации крыс (LM19 и LM20 (PlantProbes) в неразбавленном виде, и вторичные антикрысиные антитела меченые Alexa488 Fluor Ab (Molecular Probes) в разведении 1:100. Срезы клубеньков блокировали в 1%(w/v) бычьего сывороточного альбумина. Срезы контрастировали либо FM4-64 (30 мг/ ml либо йодистым пропидием (PI) 0,01%.

2.18. Метод дифференциального окрашивания цитоскелета

Клубеньки резали вручную на срезы толщиной 70-150 мкм с помощью обоюдоострого бритвенного лезвия. Срезы фиксировали в течение 1 ч в 4%-ном араформальдегиде в буфере для стабилизации микротрубочек, содержащем 60 мМ PIPES, 10 мМ EGTA, 1 мМ MgCl₂, 0,3% Triton X-100, 10% диметилсульфоксида (DMSO), pH 6,9 (Timmers *et al.*, 1998), и постфиксировали в 4%-ном параформальдегиде в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) pH 7,4 в течение 30 мин. Срезы блокировали в 3% бычьим сывороточном альбумине (БСА) и инкубировали с первичнымимоноклональными антителами против тубулина, Sigma) (1:200) в течение 2 ч при 37 °C в PBS, содержащем 0,1% Triton X-100. В качестве вторичных антител использовали антимышиный IgG-Alexa 488 (Molecular Probes) (разбавленный 1:250 в PBS); инкубацию продолжали в течение 2 ч при комнатной температуре. Контрольные эксперименты проводили в отсутствие первичных антител. Срезы окрашивали йодидом пропидия (10 мкМ), заливали в Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences) и просматривали на инвертированном эпифлуоресцентном микроскопе Leits DM IRB, подключенном к конфокальной системе Leica TCS 4D.

2.19. Флуоресцентная маркировка актина

Актин маркировали с помощью Bodipy Pallacidin FL (MolecularProbes). Срезы клубеньков инкубировали (в течение 2 ч при комнатной температуре и в темноте) в фосфатном буфере pH 7,2 с 200 мкМ MBS (эфир N-гидроксисукцинимиды 3-малеимидобензойной кислоты, Sigma), 0,05% Triton X-100 и Bodipy Pallacidin FL (в разведении 1:100). Срезы контрастировали йодидом пропидия (10 мкМ), заливали в Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences) и просматривали на инвертированном эпифлуоресцентном микроскопе Leits DM IRB, подключенном к конфокальной системе Leica TCS 4D.

2.20. Иммунолокализация белка MtSKOR / GORK

Для иммунолокализации белка MtSKOR/GORK использовали разработанные на заказ антитела, полученные при иммунизации кролика (GenScript, USA) из пептидной последовательности FHPWDPKEQRRNGI. Анти-кроличьи антитела, меченые флуорофором Alexa 488 Ab (максимум возбуждения 490 нм, максимум эмиссии 525 нм; Molecular Probes), разбавленные 1:200, использовали в качестве вторичных антител (Fedorova *et al.*, 2005).

2.21. Оценка относительной интенсивности флуоресцентного сигнала

Оценку относительной интенсивности флуоресцентного сигнала проводили с помощью многоточечного анализа яркости ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Анализ сигнала для MtAKT1 и MtSKOR/GORK в инфицированных и неинфицированных клетках проводили на выборке из 10 клеток для каждой группы на одном и том же наборе изображений зеленого канала Tiff, полученных с помощью конфокальной микроскопии; каждая выборка содержала 45 точек.

2.22. Окрашивание препаратов FM4-64

Трансгенные клубеньки и корни отбирали с помощью флуоресцентного стереомакроскопа Leica MZFLIII стереомакроскопа, срезали с растения и непосредственно помещали в раствор FM4-64 (30 мг/мл), красителя для оценки динамики эндоцитоза, в фосфатном буфере (0,1 М, содержащем 25 мг/мл сахарозы) на льду в течение минимум 30 мин. Корни промывали два раза в фосфатном буфере (0,1 М, содержащем 25 мг/мл сахарозы), чтобы удалить избыток FM4-64, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10-30 минут непосредственно под микроскопом, чтобы наблюдать динамику перераспределения метки.

2.23. Подготовка проб для электронной микроскопии

Клубеньки и корни криофиксировали с помощью аппарата для замораживания под высоким давлением Balzers HPM 010, после чего образцы помещали в гептан. Замещение расворов проводили с помощью установки

FreasySub (Cryotech Benelux, Schagen-NL) в течение 68 ч. Замещающая среда содержала 0,3% глутаральдегида + 0,2% уранилацетата в ацетоне. Образцы заливали в смолу LR White с 0,5% бензоин метилового эфира в качестве катализатора и полимеризовали под ультрафиолетовым светом при минус 22°C. (Fedorova *et al.*, 1994, Fedorova *et al.*, 1999, Fedorova *et al.*, 1998).

Некоторые образцы фиксировали традиционным методом в 4% параформальдегиде, смешанном с 0,3% глутаральдегида в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, и заливали в смолу LRwhite, приготовленную согласно рекомендациям изготовителя смолы, и полимеризовали под ультрафиолетовым светом как описано выше (Fedorova *et al.*, 1999).

Для анализа структуры клубеньков ткань фиксировали традиционным методом в 4% параформальдегиде с 3% глутаральдегидом в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, постфиксировали 1% OsO₄.

2.24. Иммунодетекция с использованием электронной микроскопии

Тонкие срезы (60 нм) получали с помощью микротомы Leica Ultracut. Никелевые сетки со срезами блокировали в нормальной козьей сыворотке или 2% BSA в буфере PBS. Сетки инкубировали в течение ночи при 4° С с первичными антителами в соответствии с разведениями, указанными выше. Для детекции использовали вторичные антитела, помеченные коллоидным золотом с частицами размером 15-нм или 10 нм (BioCell, New Delhi, Индия) (разведение 1:50), анти-кроличьи, (15 nm) (1:50) или анти-мышинные, меченые 10-nm золотом (1:30) (Aurion). Сетки контрастировали 2% водным уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL JEM 2100, оснащенном камерой Gatan US4000 4K 3 4K (Fedorova *et al.*, 1998 Fedorova *et al.*, 1999). Антитела против рамногалактуронана II (RGII) было любезно предоставлено профессорами Т. Matoh и М. Kobayashi (Kyoto University). Для иммунолокализации пектина никелевые сетки блокировали в нормальной козьей сыворотке разведенной в фосфатном буферном солевом растворе (PBS) 1 : 1, а затем инкубировали с первичным Ab в соответствии с разведениями, описанными ранее.

Белок арабиногалактана бобовых (AGPE) выявляли с помощью AGPE-специфического антитела MAC265 выработанного при иммунизации крыс, (Rae *et al.*, 1992; Reguera *et al.*, 2010) и вторичного антитела, козьего антикрысиного, меченого 10-нм золотом (BioCell, New Delhi, Индия).

Для иммунолокализации рамногалактуронана II (RGII) и GmNPL1, использовали анти-RGII кроличьи поликлональные антитела и анти-GFP кроличьи поликлональные Ab (Molecular Probes) (1 : 50), соответственно меченые коллоидным золотом размером 15- или 10-нм (BBIsolutions). Срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе Jeol JEM 2100 (Jeol Ltd, Токио, Япония), оснащенный камерой Gatan US4000 4k 9 4k (Плезантон, Калифорния, США).

2.25. Регистрационные номера генов, использованных для клонирования

MtRab5A1, TC106962; MtRab5A2, TC106963; MtRab5B, TC93994; MtRab7A1, TC101145; MtRab7A2, TC94423; MtSYP4, TC96961; MtVTI11, TC95338; MtSYP22, TC100656; MtSYP132, TC86779; MtGAPDH, BT052418.1; MtSyt1: Medtr4g073400. Sequence ID: XM_003607150.1; MtSyt2: Medtr1g025550. Sequence ID: XM_003589467.1; MtSyt3: Medtr1g094810. Sequence ID: XM_003591831.1; MtAKT1 (MTR_4g113530), MtSKOR/GORK (MTR_5g077770), MtNHX7 (Medtr2g0384), MtSyt1: Medtr4g073400. Sequence ID: XM_003607150.1. MtSyt2: Medtr1g025550. Sequence ID: XM_003589467.1.

2.26. Анализ распределения ионов в ткани корневых клубеньков

Анализ проводили на низкотемпературном сканирующем электронном сканирующем микроскопе Zeiss DSM-960 с функциями энергодисперсионной спектроскопии и рентгеновского микроанализа (Pentafler, Оксфорд, Великобритания).

Для анализа использовали клубеньки в возрасте 28 дней после инокуляции. Клубеньки собирали с растения и немедленно замораживали в жидком азоте. Затем клубеньки скалывали по длинной оси, чтобы выявить все зоны развития, и сразу

же анализировали. Для анализа использовали ускоряющее напряжение 20 кВ, разрешение 133 эВ и точечный метод сбора сигнала. 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 анализа выбрали симбиосомы и вакуоли в соответствующих зонах развития клубенька (пост-меристематические клетки, клетки зоны активной азотфиксации, клетки зоны старения, а также в некоторых исследованиях и цитоплазму. Сравнение проводилось между одинаковыми структурами (симбиосомами или вакуолями). В тех же клетках анализировали цитоплазму. Для каждого анализа использовали 10 клубеньков, 10-15 клеток анализировали в каждом клубеньке, в клетках анализировали 7-12 симбиосом, цитоплазму и вакуоль.

Для определения значимости различий между средними значениями наборов данных использовался t-тест Стьюдента.

2.27. Источники нуклеотидных и белковых последовательностей

Нуклеотидные и белковые последовательности исследованных генов были получены из нескольких баз данных и геномных ресурсов растений: Национальный центр биотехнологической информации (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), Legume Information System (<https://legumeinfo.org/>), сайт генома белого люпина (<https://www.whitelupin.fr>), геномный проект (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Pisum>), и *Lotus japonicus* genome assembly site (<http://www.kazusa.or.jp/lotus>).

2.28. Измерение ферментативной активности пектат-лиазы

Активность измеряли по методу Collmer *et al.* (1988) путем оценки высвобождения из полигалактуроновой кислоты ненасыщенных олигогалактуронидов, поглощающих при 232 нм. Для калибровки использовали стандартную кривую разведений субстрата (полигалактуроновой кислоты).

Свежие клубеньки с трансгенных растений GmNPL1:GFP (300 мг) измельчали в жидком азоте, добавляли 400 мкл экстракционного буфера и образец центрифугировали 1 мин при 19 000 g. Экстракт (100 мкл на лунку) загружали в планшет GFP-multiTrap (Chromotek, Планегг-Мартинсрид, Германия) в трехкратной повторности, лунки подвергались экспозиции в течение 1 ч для увеличения количество белка, конъюгированного с антителом, присутствующим в лунке. После 3 ч общей экспозиции экстракт удаляли пипеткой и лунки трижды промывали буфером PBS. Субстрат разведенный в буфере (100 мкл) затем переносили в те же три лунки на 1 ч, что дает общую продолжительность ферментативной реакции 3 ч. Экстракционный буфер: TRIS pH 7,5, 0,1 М NaCl; субстратный буфер: 0,1% полигалактуроновой кислоты (P3889; Sigma) в 0,2 М TRIS/HCl, 0,2 мМ CaCl₂, pH 8,7. Образцы субстрата из GmNPL1:GFP трансгенных клубеньков после 3 ч экспозиции в планшетах GFPmultiTrap переносили в 96-луночные плоскодонные планшеты UV star (Greiner Bio-One GmbH). Смена плашек была обусловлена высоким фоновым поглощением при 232 нм пластикового материала пластин GFP-multiTrap. Экстракты дикого типа (WT) и трансгенных клубеньков, несущих конструкт пектат лиазы, были загружены прямо в УФ-планшеты с плоским дном и оставлены для экспозиции с субстратным буфером на 3 часа. Активность пектат-лиазы определяли спектрофотометрически на спектрофотометре I Infinite® 200 (Tecan Group Ltd, Zurich, Швейцария) при длине волны 232 нм. Концентрацию белка в каждой лунке измеряли с помощью спектрофотометра SimpliNano.

Удельную активность пектат-лиазы выражали в ферментных единицах на миллиграмм белка. Для выявления GFP в лунках использовали антитела анти-GFP, полученные при иммунизации кролика, меченые Alexa 488 в разведении 1 : 200 (Molecular Probes) которые добавляли в лунки, содержащие образцы, выделенные из трансгенных корней GmNPL1:GFP. Пластины фотографировали с помощью MB Biorad, используя настройку для обнаружения SYBRGreen, и с помощью микроскопа Leica DM 5500 Flu для получения цветного изображения.

2.29. Выделение симбиосом

Симбиосомы выделяли из клубеньков путем фракционирования с использованием сахарозного градиента в микроцентрифужных пробирках. Аликвоту клубеньков массой 5 г измельчали на льду в ступке в присутствии 5 мл экстракционного буфера [50 mM HEPES, pH 8,2, 1 mM дитиотритола (DTT), 5 mM меркаптоэтанол, 4 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 мкл мл⁻¹ коктейля ингибиторов протеаз Sigma и 5 мл поливинилпирролидона (PVPP)]. После соникации фракцию бактериоидов измельчали в ступке с жидким азотом и центрифугировали при 13 000 g в течение 10 мин.

2.30. Анализ азотфиксирующей активности по восстановлению ацетилен

Фиксацию азота измеряли методом восстановления ацетилен (Bergersen 1970). Корневую систему растения (выборка = 15 растений) промывали, отделяли от побега и помещали в 10-мл или пробирку, влажность поддерживали, помещая в пробирку лист влажной папиросной бумаги. Пробирки закрывали резиновыми пробками, отбирали 10% воздуха и заменяли его ацетиленом. Через 1 ч инкубации из каждого образца отбирали по 0,2 мл газа, и вводили в газовый хроматограф ChromPack, оснащенный колонкой Porapak R (от 80 до 100 меш; диаметр 2 на 2 мм) и пламенно-ионизационным детектором (Varian ChromPack; Нидерланды). Азот использовался в качестве газа-носителя со скоростью 20 мл/мин. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ SigmaStat (Systat Software, Сан-Хосе, Калифорния, США).

2.31. Анализ протеолитической активности вакуолей корневых клубеньков

Для всех анализов клубеньки заливали в 7% агарозу, и срезы толщиной 50-100 мкм получали с помощью вибратора (Micro-cutH1200, BIO-RAD, США). Срезы промывали в фосфатном буфере с 0.9% NaCl (pH 7.4) (буфер PBS) и помещали в раствор 10 мкм RPA или AMC на 3 ч. Затем срезы промывали в PBS, помещали на предметные стекла в растворе CitifluorAF1 (AgarScientific, США) и просматривали в эпифлуоресцентном микроскопе (Reichert Polyvar, Vienna,

Австрия) с блоком фильтров В4 (длина волны возбуждения 475-495 нм, эмиссия 520-560 нм) при использовании пробы RPA, блок V1 (возбуждение 400-410 нм, эмиссия >420 нм) для пробы АМС. Срезы также просматривали с использованием конфокального микроскопа (Sarastro 2000, MolecularDynamics, США) с аргоновым лазером 514 нм напряжение 10 мВ.

Ацидотропное окрашивание Нейтральным Красным. Срезы толщиной 30-100 мкм были перенесены в раствор 0.001 % Нейтрального Красного в буфере PBS pH 7.4. После 1 часа инкубации срезы промывали в том же буфере, помещали на предметные стекла и фотографировали. Затем покровное стекло удаляли и добавляли 400 мкл смеси ионофоров: 20 мкМ карбонилцианида м-хлорофенилгидразона (СССР) и 1 мкМ валиномицина в том же буфере с добавлением 100 мМ КСl. Препараты затем просматривали через 10 мин и оставляли в растворе на 3 ч.

Для биохимического анализа клубеньки разрезали на три части: апикальную, среднюю и базальную, и размалывали в буфере, содержащем 0.025 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 MEDTA. Уровень протеолитической активности измеряли на флюоресцентном спектрофотометре Fluoroscanner II (Labsystem) с соответствующими фильтрами для RPA (возбуждение 485 нм, эмиссия 538 нм) и АМС (возбуждение 355 нм, эмиссия 460 нм) на микроплатах Costar.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Формирование симбиосом и изменения их морфологии в процессе развития симбиоза

При развитии клеток корневого клубенька ризобии переходят в симпласт клетки-хозяина и становятся временными внутриклеточными органеллами, каждая из которых окружена мембраной, производной цитоплазматической мембраны, образуя симбиосомы. В процессе развития размер симбиосом увеличивается (Рис.3) достаточно сравнить бактерии в инфекционной нити (Рис.3А) и симбиосомы в этой же клетке. В сферических клубеньках происходит слияние индивидуальных симбиосом с образованием структуры, включающей несколько бактериоидов (Рис.3Б,В) (Fedorova *et al.*, 1999, Cermola *et al.*, 2000, Coba de la Peña *et al.*, 2018, van Velzen *et al.*, 2018, Fedorova, 2023).

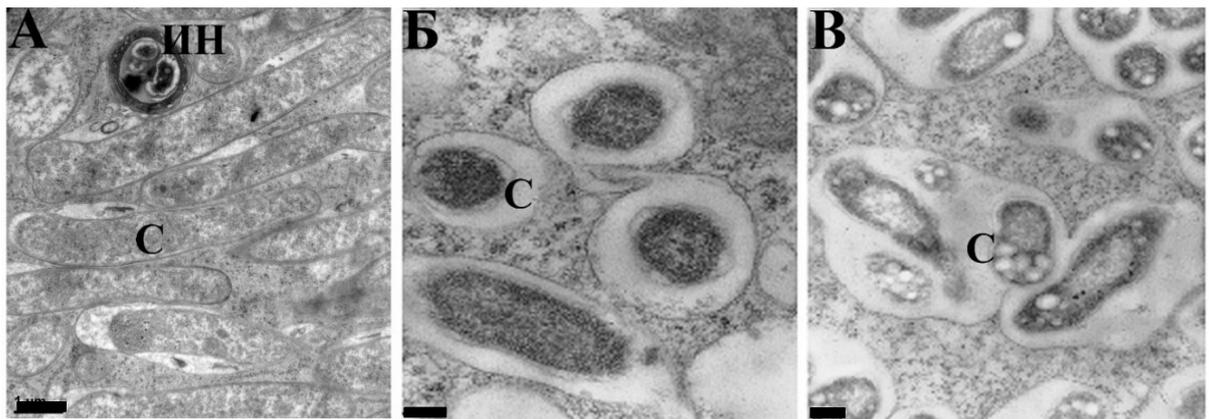


Рис. 3. Изменения размера и формы симбиосом в процессе развития симбиоза (А) – симбиосомы люцерны усеченной, ИН – инфекционная нить, содержащая ризобии. (Б,В) - симбиосомы сои в процессе слияния. Масштабная линейка (А) - 1 μm , (Б,В) - 200 nm

В клубеньках древесного растения Параспонии (Рис.4) бактерии не покидают инфекционных нитей, которые называются «азотфиксирующими нитями».

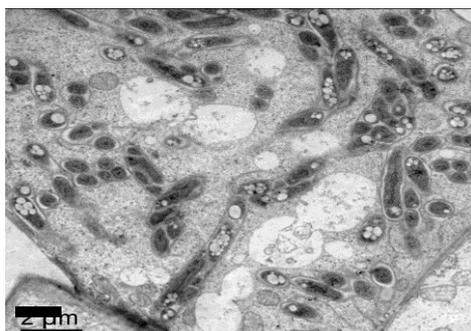


Рис. 4 Инфицированная клетка древесного растения Параспонии, заполненная «азотфиксирующими нитями». Масштабная линейка = 2 микрометра. (van Velzen *et al.*, 2018, van Zeijl *et al.*, 2018).

Во всех вышеописанных случаях следует отметить огромный размер формирующегося симбиотического интерфейса - мембраны, окружающей растущие в клетке бактерии

После окончания симбиотических отношений, которое в литературе называют «старением» инфицированной клетки, бактериальные клетки, а также и клетка-хозяин подвергаются лизису (Рис.3), при этом в клетке остаются пустые мембраны, т.н.мембраны-призраки.

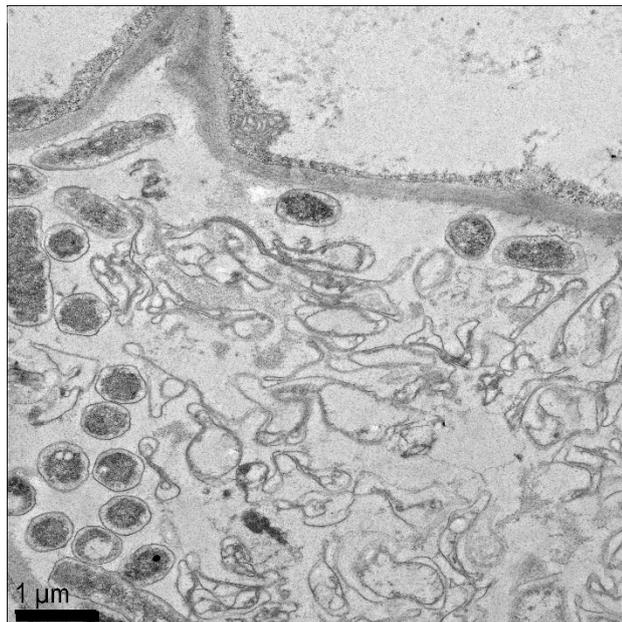


Рис. 5. Инфицированная клетка люцерны в процессе старения и лизиса.

Масштабная линейка=1 микрометр.

Также возможно изменение мембран и лизис симбиосом в случае мутаций генов, необходимых для развития симбиоза (Chiasson *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2017). Отмечено значительное количество мутаций пути сигналинга факторов клубенькообразования (Nod-factors) и сигнальных белков, которые вызывают изменения в морфологии симбиосом и инфицированных клеток, часто сопряженные с лизисом симбиосом и прекращением симбиоза (Limpens *et al.*, 2005, Geurts *et al.*, 2005, Ivashina *et al.*, 2006, Wan *et al.*, 2007, Smit *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2010, Margaret *et al.*, 2013, Moling *et al.*, 2014). Нарушение развития симбиосом и их лизис также отмечены в случае блокирования полиплоидизации инфицированных клеток (Roudier *et al.*, 2000, Vinardell *et al.*, 2003, Roudier *et al.*,

2003). Механизмы формирования популяции симбиосом в клетке включают контроль за размножением и лизисом симбиосом даже в случае, когда отдельные симбиосомы не образуются, например в клубеньках древесного растения Параспония, где бактерии располагаются в инфекционных нитях, где они способны к азотфиксации (Рис.2).

Фенотипирование изменений в процессе развития инфицированной клетки и симбиосом, а также иммуноцитохимическая локализация участвующих в процессах белков, является одним из наиболее эффективных и достоверных доказательств изменений симбиотической системы в ответ на ряд внутриклеточных факторов, таких как факторы сигналинга клубенькообразования (Nod-factors), а также ряд факторов окружающей среды, и позволяет сделать заключения о биологических основах этих изменений (Fedorova *et al.*, 1998, Fedorova *et al.*, 1999, Ivashina *et al.*, 2006, Wan *et al.*, 2007, Fedorova *et al.*, 2007, Cermola *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2010, Chiasson *et al.*, 2014, Ovchinnikova *et al.* 2011, Yang *et al.*, 2017, van Velzen *et al.*, 2018, van Zeijl, 2018, Fedorova *et al.*, 2021, Trifonova *et al.*, 2022).

3.2. Изменения в направленности транспорта белков, принадлежащих к пути эндоцитоза, и идентичности мембран симбиосом в процессе их созревания и старения: появление на мембране вакуолярных белков

Формирование симбиотического интерфейса в инфицированных клетках требует создания огромного объема новых мембран. Способы, которые позволяют индуцировать процесс создания этой структуры в инфицированной клетке до сих пор недостаточно исследованы. Симбиосомная мембрана представляет собой мембрану-мишень, которая имеет некоторые свойства цитоплазматической мембраны на границе внеклеточного пространства. Биогенез этой мембраны изучен цитологически, основой ее является цитоплазматическая мембрана, которая окружает ризобии при выходе из инфекционной нити, а также на этой мембране присутствуют дополнительные включения мембранных везикул и белков, которые эта мембрана получает в процессе созревания симбиосомы. Механизмы, которые

стимулируют клетку растения-хозяина к синтезу большого количества мембранных компонентов, а также специфичность и регуляция перенаправления белков клетки-хозяина к этой мембране пока в достаточной степени не исследованы.

Поскольку транспорт через любую клеточную мембрану опосредуется ее положением в клетке, то выявление идентичности мембраны является ключом к прогнозированию ее возможностей, поскольку идентичность обуславливает уровень и правильный спектр и направление транспорта через эту мембрану. В случае симбиотических отношений транспорт через мембрану симбиосомы обеспечивает выживание азотфиксирующих бактериоидов в симпласте клетки-хозяина и непосредственно в симбиосомах, а также возможность симбиотической азотфиксации как таковой.

В клетках эукариотических организмов присутствует спектр белков, которые участвуют в процессах транспорта и слиянии везикул. Группы этих белков, находящихся на определенных мембранах, определяют функционал транспорта через эти мембраны, а также рост и дифференциацию этих мембранных компартментов. В исследованиях биогенеза органелл и транспорта эти белки используются как маркеры идентичности мембран (Borchers *et al.*, 2021).

Так, эндоцитоз представляет собой широко распространенный клеточный процесс, включающий в себя опосредованный везикулами транспорт внеклеточного материала от цитоплазматической мембраны в литический компартмент: лизосому в клетках животных, вакуоль в растениях. Этот транспортный путь выполняется определенными мембранными компартментами, так называемыми ранними и поздними эндосомами, вовлекаемыми последовательно, и слиянием более раннего компартмента с последующим. При «классическом эндоцитозе» везикулы сначала получают мембранные маркеры как «ранние» эндосомы, в которых материал, который необходимо деградировать, сортируется и транспортируется далее в «поздние эндосомы», которые впоследствии сливаются с лизосомами или литической вакуолью (Pfeffer, Aivazian, 2004, Samaj *et al.*, 2005; Ebine, Ueda, 2009).

Эндосомальные компартменты различаются по наличию специфических маркеров мембранной идентичности, таких как регуляторные малые GTPазы семейства Rab, а также белки SNARE (N-этилмалеимид чувствительные белковые рецепторы факторов связывания (Pfeffer, Aivazian, 2004; Behnia, Munro, 2005; Lipka *et al.*, 2007; Pfeffer, 2007), которые контролируют специфичность процессов слияния мембран тех компартментов, в которых они расположены. Малые GTPазы Rab5 и Rab7, контролирующие взаимодействие ранних и поздних эндосом, соответственно, являются хорошо изученными маркерами идентичности пути эндоцитоза в клетках животных и дрожжей, поскольку расположены на мембранах эндосом и на тонопласте.

В растительных клетках маркеры мембранных компартментов пути эндоцитоза в целом те же, что и в животных клетках (Ueda *et al.*, 2001, 2004), хотя их спектр может отличаться. Считается, что в растениях Rab5-позитивные мембранные компартменты являются поздними эндосомами, как в дрожжах, а в клетках животных Rab5-позитивными являются ранние эндосомы (Surpin, Raikhel, 2004; Samaj *et al.*, 2005). Так, к наиболее изученным эндосомальным белкам растений относятся гомологи Rab5 Арабидопсиса (Ueda *et al.*, 2001,2004). Арабидопсис имеет 3 гомолога Rab5: Ara7/RabF2b и Rha1/RabF2a, наиболее гомологичные дрожжевым и животным и Ara6/RabF1, уникальный растительный гомолог Rab5 (Ueda *et al.*, 2001). Эндосомы, меченные Rab5, были названы превакуолярными компартментами (PVC), так как они содержат рецепторы, позволяющие сортировать транспорт вакуолярных белков от аппарата Гольджи к вакуоли (Tse *et al.*, 2004). В клетках Арабидопсиса было найдено 8 гомологов Rab7, что предполагает наличие у них нескольких специализированных функций, возможно, связанных с множественными типами вакуолей, найденных у растений (Sanderfoot *et al.*, 2007, Nielsen *et al.*, 2008).

На основании ранних цитологических исследований (Roth, Stacey, 1989) было постулировано, что ризобии входят в клетки клубенька посредством процесса эндоцитоза. Эндоцитоз-подобное вхождение ризобий в клетки растения-хозяина имеет структурное сходство с фагоцитозом бактерий в клетках животных. В

животных клетках этот процесс включает последовательное созревание содержащих бактерии вакуолей, которые, в конце их созревания сливаются с литическим компартментом (лизосомой), где и происходит элиминация бактерий. Продолжительность процесса различается в зависимости от биологии хозяина и бактерий, но процесс элиминации обычно составляет от нескольких минут до нескольких суток (Vieira *et al.*, 2002). Некоторые бактериальные патогены в клетках животных способны избегать быстрого слияния компартментов, содержащих патоген, с лизосомами, обеспечивая тем самым свое сохранение и размножение. Такие внутриклеточные патогены способны к манипуляции мембранными молекулярными маркерами пути эндоцитоза, принимая часть этих белков на внешнюю мембрану вакуоли, содержащей бактерии, и получая идентичность ранних или поздних эндосом.

Ранее не было известно, разделяют ли симбиосомы способность к изменению идентичности окружающих бактерии мембран, свойственную животным патогенам. В случае, если симбиосомы являются компартментами с идентичностью мембран пути эндоцитоза растений, вставал вопрос, как симбиосомы избегают быстрого слияния с литической органеллой клетки-хозяина - вакуолью?

В апексе клубеньков таких растений как люцерна постоянно функционирует меристема, добавляющая новые клетки к тканям клубенька, вследствие чего образуется градиент развития клеток от апикальной к базальной части клубенька, при этом к меристеме примыкают самые молодые клетки. Образующийся возрастной градиент представляет удобную экспериментальную модель для изучения свойств симбиосом на последовательных стадиях развития клубенька.

Для проверки гипотезы о том, что мембрана симбиосом в процессе развития приобретает мембранные маркеры пути эндоцитоза, нами было исследовано наличие этих белков в инфицированной клетке и на симбиосомной мембране. Для диагностики были выбраны «классические» маркеры такие как белки Rab5 и Rab7, хорошо изученные на клетках животных и дрожжей (Pfeffer, Aivazian, 2004; Behnia, Munro, 2005; Lipka *et al.*, 2007; Pfeffer, 2007). Процесс эндоцитоза был исследован

в клубеньках с недетерминированным типом роста на модельном бобовом растении люцерне усеченной (*M.truncatula*), а также на сферических клубеньках с детерминированным типом роста корневого клубенька сои (*Glycine max*) (Limpens *et al.*, 2009, Ivanov *et al.*, 2012, Gavrin *et al.*, 2014,2015)

В доступных базах геномных и cDNA последовательностях были идентифицированы три гомолога *Medicago truncatula* Rab5: MtRab5A1, MtRab5A2, MtRab5B. MtRab5A1 и MtRab5A2, они наиболее гомологичны двум консервативным последовательностям Rab5 Арабидопсиса, Ara7/RabF2b и Rha1/RabF2a, тогда как MtRab5B наиболее гомологичен уникальному для растений Rab5, Ara6/RabF1 Арабидопсиса. MtRab5A1 и MtRab5A2 содержат С-терминальный Cys-мотив, высоко консервативный в большинстве Rab ГТФаз и являющийся местом для изопренилирования. Напротив, у MtRab5B отсутствует С-терминальный Cys-мотив, но он содержит N-терминальный домен, характерный для Rab5, уникальных для растений, который скорее всего ацилирован (Ueda *et al.*, 2001),(Рис.6).

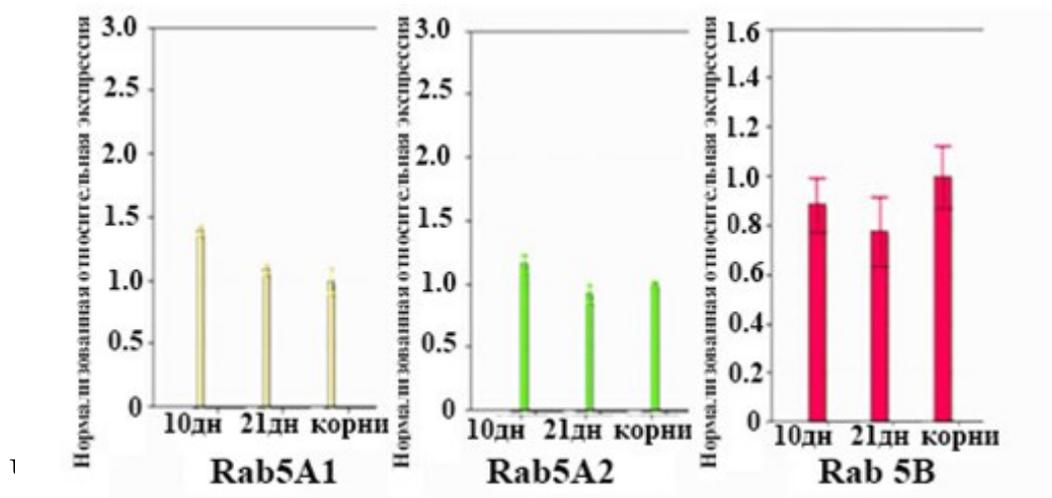


Рис. 6. Экспрессия трех генов MtRab5 в 10-дневных и 3-недельных клубеньках

Для цитологических исследований были созданы с помощью опосредованной *Agrobacterium rhizogenes* трансформации трансгенные корни люцерны, экспрессирующие конструкции, в которых белки были помечены GFP. Конструкции GFP-MtRab5 экспрессировались под контролем промоторов *CaMV*

35S, и субклеточная локализация гибридных белков изучалась с помощью конфокальной микроскопии в корневых волосках, корнях в зоне растяжения и в клубеньках. Белки MtRab5 были локализованы в небольших, подвижных точечных структурах в цитоплазме. Согласно размеру меченых структур, они являются эндосомами, подобно тому как описано у арабидопсиса (Ueda *et al.*, 2004). Кроме того, наблюдались также более крупные структуры, меченые белками MtRab5, вероятно, представляющие кластеры эндосом.

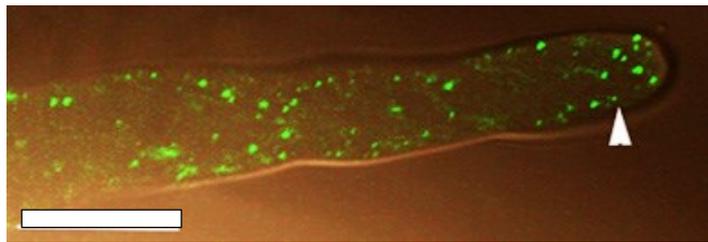


Рис.7. Корневые волоски, метка белка MtRab5. Масштабная линейка 10 μm

Чтобы подтвердить, что структуры, меченые MtRab5 представляют собой компартменты пути эндоцитоза, мы провели палс-чейс эксперимент с флуоресцентным эндосомальным маркером FM4-64 (Рис.8). FM4-64, липофильный стироловый краситель, флуоресцирует при погружении в мембраны и может проникать в клетки только путем эндоцитоза. Была отмечена частичная ко-локализация FM4-64 с GFP-MtRab5 приблизительно в течение 45 минут после начала экспозиции. Результат этого эксперимента свидетельствует о том, что MtRab5 маркирует эндосомы (Рис.8).

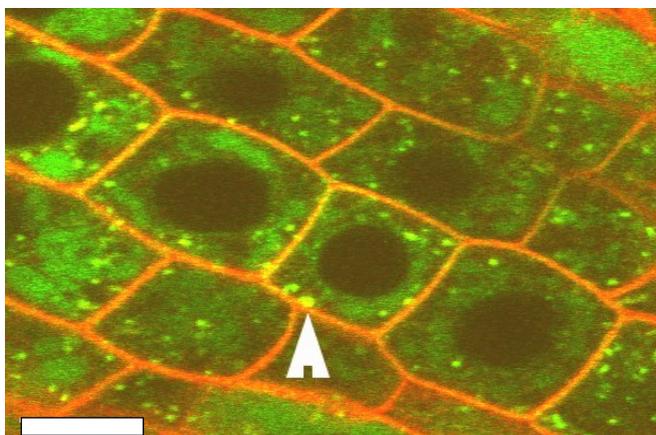


Рис. 8. Анализ процесса эндоцитоза с использованием красителя FM4-64 на ткани трансгенного корня. Белок Rab5 помечен GFP. Стрелка указывает на везикулу с интегральным желтым сигналом, за счет окрашивания FM64 (красный флуорофор) и GFP (зеленый флуорофор). Масштабная линейка = 10 μm .

Цветовой код: сигнал метки FM64 (красный флуорофор) и MtRab5 (зеленый флуорофор), ко-локализация приводит к появлению везикул с интегральным желтым сигналом (стрелка), что показывает, что мембранная структура является эндосомой.

Для определения ультраструктурных характеристик меченых MtRab5 компартментов, ткань трансгенных клубеньков была изучена с помощью электронной микроскопии. Чтобы локализовать белки, меченные GFP, в зоне растяжения трансгенных корней, применили метку с вторичными антителами, мечеными коллоидным золотом. структурно подобные мультивезикулярным телам

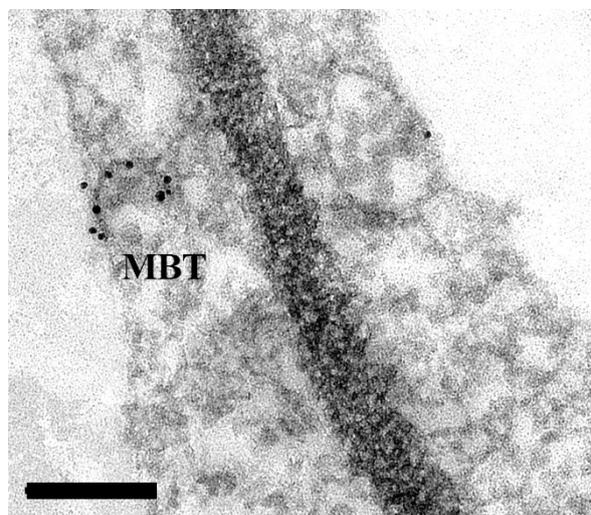


Рис.9. Мультивезикулярное тело, на мембране отмечено наличие метки белка Rab 5. Масштабная линейка = 100 nm

Белки MtRab5 были обнаружены на мембранных компартментах диаметром 100-300 нм, содержащих внутренние мембраны.

Молекулярный маркер Rab7 присутствует в геноме *M.truncatula* в количестве 8 гомологов. Нами были клонированы два гомолога MtRab7A1 и MtRab7A2.

Экспрессия генов была отмечена как в корнях (апикальная часть с меристемой), так и в клубеньках, собранных с молодых растений (10 дней после инокуляции) и со зрелых растений (21 дней после инокуляции). Подобно аналитическим процедурам с MtRab5, генетические конструкции для анализа MtRab7A1 и MtRab7A2 экспрессировались в корнях, трансформированных *A. rhizogenes*, под контролем промоторов 35S или Ubiquitin3 и были помечены GFP.

Экспрессия двух гомологов Rab7 была измерена методом ПЦР в молодых и зрелых клубеньках и молодых корнях (Рис.10).

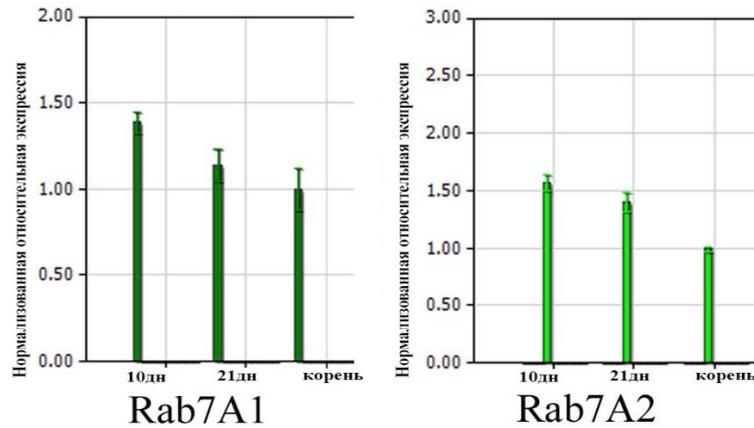


Рис. 10. Экспрессия малой GTP-азы Rab 7 в клубеньках (10 и 21 дн после инфицирования корней) и корнях (апикальная часть корня, включая меристему).

Локализацию белков в корневых волосках этих корней диагностировали методами конфокальной микроскопии. Флуоресцентный сигнал MtRab7 был обнаружен на подвижных точечных структурах в цитоплазме (Рис.11). Ко-локализация GFP-MtRab7(зеленый флуорофор) и белка MtRab5, помеченного специфичными антителами (красный флуорофор) показала, что MtRab7 ассоциировались с мембранными компартментами размером 300-500 нм(Рис.11). Эндосомы, меченые MtRab5 и MtRab7 были способны сливаться с образованием более крупной везикулы и образованием желтых точек (стрелка).

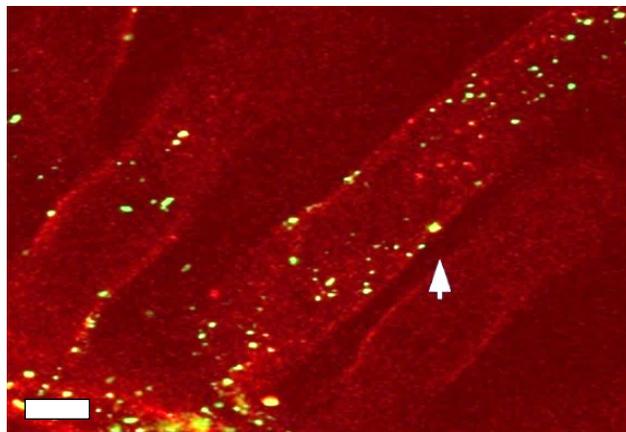


Рис. 11. Иммунолокализация белков Rab5 и Rab7 в корневых волосках.

Масштабная линейка = 10 μ m.

При исследовании структур, меченых Rab5 и Rab7 с помощью электронной микроскопии (Рис.12), сигнал белка MtRab7 был отмечен на эндосомах и мембранных компартментах размером в пределах 300-500nm, а также на тонопласте молодых вакуолей.

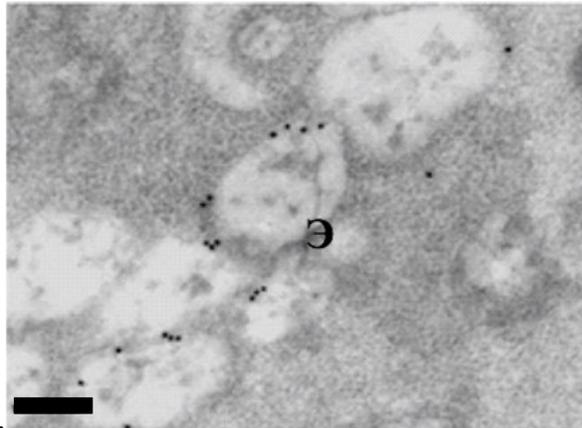


Рис. 12. Иммунолокализация белка методом иммунодекции с использованием антител к GFP и MtRab7 и метки коллоидным золотом. Эндосома(Э), сигнал-частицы коллоидного золота размером 15 nm, масштабная линейка = 200 nm.

Чтобы выяснить, являются ли структуры, мембраны которых несут белок MtRab7, частью пути эндоцитоза, мы провели эксперимент с окрашиванием трансгенных корней специфичным красителем-маркером эндоцитоза FM4-64. Примерно через 45 минут после введения FM4-64 была видна совместная флуоресценция GFP-Rab7A1/A2 и FM4-64 на мембранных структурах (Рис.13); спустя 3 часа после введения красителя метка появлялась и на тонопласте, указывая на то, что мембранные везикулы, содержащие MtRab7 участвуют в эндоцитозе.

Белок MtRab7 размещался на эндомембранных компартментах (стрелка), однако компартменты, содержащие MtRab7, были значительно крупнее (300-500nm), чем содержащие MtRab5 (50-100nm). Эти компартменты, вероятно, представляют собой различные популяции эндосом, которые частично перекрываются (Рис.13).

Белок также располагался на тонопласте молодых вакуолей. Окрашивание эндосомальным маркером FM4-64 показывает, что MtRab5 и MtRab7 участвуют в эндоцитозе.

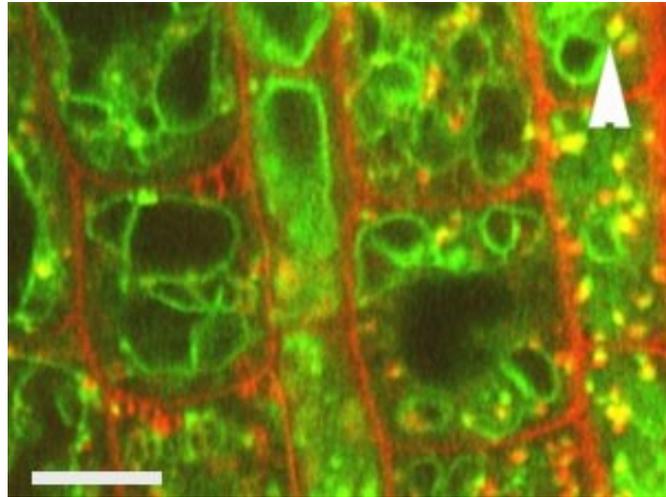


Рис. 13. Окрашивание специфичным красителем - маркером эндоцитоза FM4-64 тканей с экспрессией Rab7. Масштабная линейка = 100 μm . Стрелка- ко- локализация сигналов FM4-64 (красный) и Rab7(зеленый) с формированием желтого окрашивания.

Для выяснения статуса симбиосом в пути эндоцитоза исследовали наличие эндосомальных Rab-белков на симбиосомных мембранах.

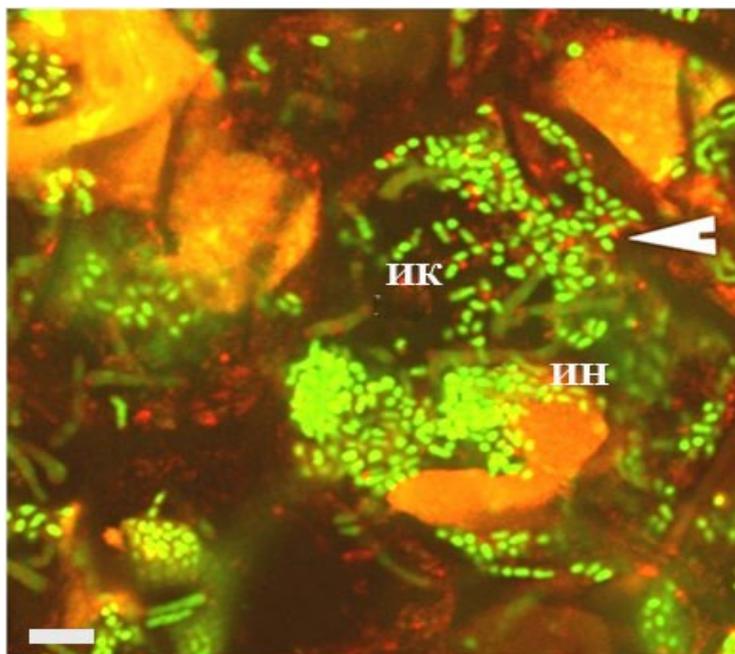


Рис. 14. Распределение белка MtRab5 в инфицированной клетке. Масштабная линейка = 10 μm . Стрелка указывает на сигнал белка Rab5, меченый красным

флуорофором, зеленый сигнал-бактерии *Rhizobium*, помеченные зеленым флуорофором. ИК-инфицированная клетка, ИН-инфекционная нить

Метка белка MtRab5 (красный флуорофор) была найдена на эндосомах в инфицированных и неинфицированных клетках (стрелка), но белок не был ассоциирован с молодыми симбиосомами, выходящими в цитоплазму клетки-хозяина, (окрашены зеленым флуорофором). И-инфицированная клетка, Н-неинфицированная клетка, ИН -инфекционная нить

Таким же путем была изучена локализация белков MtRab7A1/A2 в процессе развития симбиосом. Как и в корнях, GFP-Rab7A1/A2 находится на эндосомах, но на мембране молодых симбиосом непосредственно в момент выхода из инфекционной нити метки не отмечалось (Рис.15А).

Белок MtRab7A1/A2 появлялся на мембране симбиосом в проксимальной части зоны инфекции, где симбиосомы удлиняются и дифференцируются, и в зоне азотфиксации. Белок MtRab7 поддерживался на симбиосомах на протяжении всей зоны фиксации (Рис.15Б).

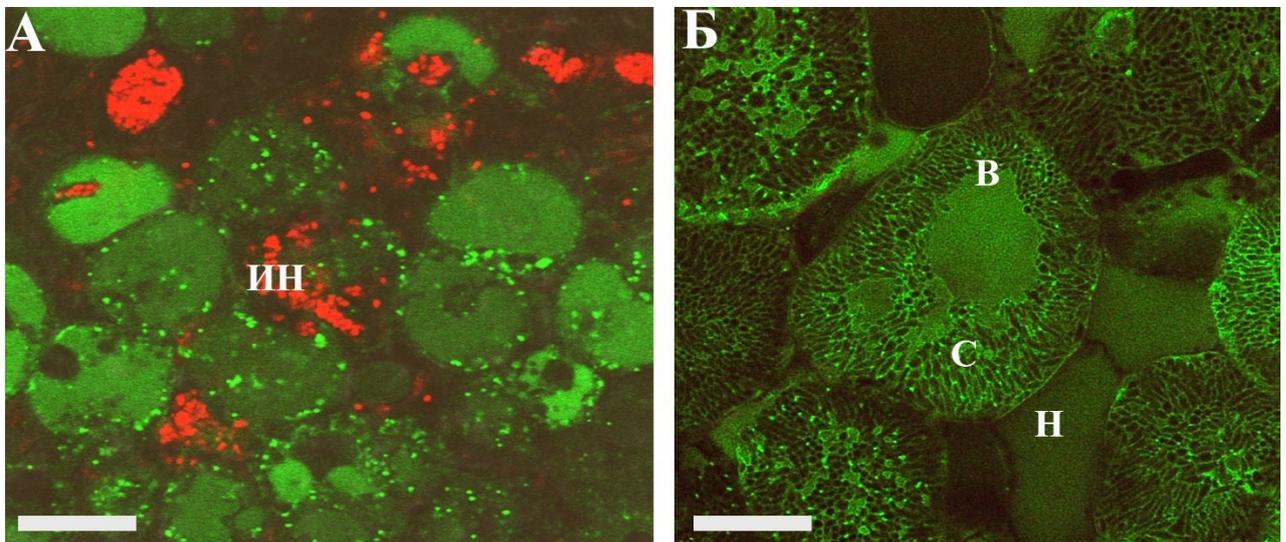


Рис. 15. (А,Б). Распределение белка MtRab7 в клетках корневого клубенька.

Иммуносигнал белка Rab7 (зеленый флуорофор) присутствовал на тонопласте и в эндосомах, но не ассоциировался с молодыми симбиосомами, выходящими из инфекционных нитей (ИН) (ризобии помечены красным флуорофором) (15А). По мере развития инфицированных клеток и заполнения их симбиосомами, белок Rab7 появлялся на мембранах симбиосом и на тонопласте в

инфицированных (ИК) и неинфицированных (Н) клетках (15Б). Белок появлялся на мембранах зрелых симбиосом (СМ), формирующих радиальный паттерн вокруг вакуоли в азотфиксирующих клетках клубенька (Б) (В-вакуоль, С-симбиосомы, Н -неинфицированная клетка, ИК- инфицированная клетка. Масштабная линейка = 50 μm .

На основе анализа было показано, что симбиосомы при вхождении в клетку не приобретают маркера ранней эндосомы Rab5, и поздней эндосомы Rab7 в отличие от процесса «классического» эндоцитоза. Но, в процессе роста и созревания симбиосом до состояния, когда начинается азотфиксация, мембрана симбиосом приобретает вакуолярный маркер Rab7, который оставался на симбиосомной мембране до стадии старения и прекращения симбиоза.

Таким образом, симбиосомы сохранялись в течение 10-12 дней как индивидуальные мембранные компартменты, с идентичностью эндосомы/ молодой вакуоли (Ivanov *et al.*, 2012), и при этом не сливались с вакуолью инфицированной клетки. То, что белок Rab5 отсутствует на симбиосомах, делает маловероятным, чтобы симбиосомы созревали путем последовательного взаимодействия начиная с эндосомы, несущей Rab5, подобно тому как это происходит в процессе входа патогенных бактерий в животные клетки. Наличие гомологов белка Rab7 на симбиосомной мембране было также показано в протеомном анализе клубеньков сои (Clarke *et al.*, 2015).

Присутствие MtRab7 на симбиосомной мембране предполагает, что симбиосома обладает идентичностью поздней эндосомы либо молодой вакуоли. Чтобы определить, приобретают ли симбиосомы вакуолярную идентичность, мы проанализировали, не ассоциируются ли другие маркеры вакуолярной идентичности с симбиосомой в процессе ее развития. Был выбран белок комплекса SNAREs (N-этилмалеимид чувствительные белковые рецепторы факторов связывания), который, согласно данным, полученным на растениях Арабидопсиса, образуют комплекс на тонопласте (Sanderfoot, 2007; Ebine *et al.*, 2008). Этот комплекс контролирует специфичность транспорта везикул к вакуоли. Используемые в данной работе маркеры мембранной идентичности были выбраны

на основе гомологии с хорошо изученными белками Арабидопсиса, а также на основе их экспрессии в инфицированных клетках клубенька. Гомолог *M.truncatula* белков этого комплекса, MtSYP22, был клонирован и его расположение в клетках корневого клубенька было исследовано с помощью конфокальной микроскопии (Рис.16).

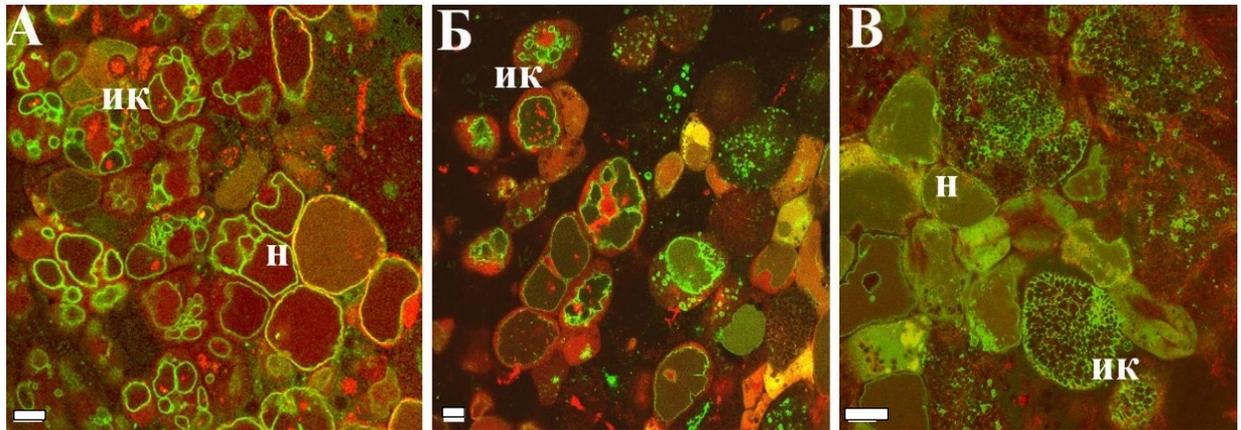


Рис. 16. Распределение белка MtSYP22 в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька в процессе развития симбиоза. (А) Молодая ткань клубенька, начало инфицирования, (Б) стадия развития инфицированных клеток, (В) зрелая часть клубенька, зона азотфиксации. ИК-инфицированная клетка, Н - неинфицированная клетка, белок MtSYP22 (зеленый флуорофор) находится на тонопласте (А,Б) в инфицированных и неинфицированных клетках, и на симбиосомной мембране в зрелых инфицированных клетках (В). Масштабная линейка = 10μm

Таким образом, белок GFP-MtSYP22 не был отмечен на мембранах симбиосом в молодых клетках в 14-дневных клубеньках (А), находящихся в процессе инфицирования, этот белок располагался на тонопласте и эндосомах (Рис.16А). В 5-недельных клубеньках GFP-MtSYP22 был найден на тонопласте небольших вакуолей в инфицированных клетках и на эндосомах (Рис.16А, Б) а также на некоторых симбиосомах. Но, по мере роста инфицированных клеток и созревания симбиосом, на более поздних сроках развития инфицированной клетки, белок был обнаружен не только на тонопласте инфицированных клеток, но появился на симбиосомной мембране (Рис.16 Б, В). То есть проявилась динамика, зависящая от степени созревания симбиосомы, а также и самой клетки-хозяина.

Можно предположить, что транспорт этого белка к симбиосоме не был постоянным, но зависел от условий созревания симбиосомы и, возможно, изменения каких-то условий в инфицированной клетке. Следовательно, симбиосомы не имели вакуолярной идентичности на раннем этапе развития. В периоде примерно от 3 до 4 недель после инокуляции, азотфиксирующие симбиосомы достигали функциональной зрелости, а клубеньки начали стареть. В этот период в некоторых клетках часть симбиосом демонстрировала метку на симбиосомной мембране, в то время как другие симбиосомы в той же клетке еще не имели этих белков на своих мембранах, то есть перенаправление вакуолярных белков к симбиосоме происходило постепенно (Рис.16Б, В). Процесс прекращения симбиоза обычно начинается со слияния симбиосом и формирования литических симбиосомных компартментов в наиболее проксимальных (старейших) инфицированных клетках в базальной части клубенька (Vasse *et al.*, 1991; Van deVelde *et al.*, 2006).

Эти наблюдения позволяют предположить, что поддержание бактерий как индивидуальных компартментов в форме симбиосом на стадии азотфиксации происходит за счет задержки появления на их мембранах вакуолярных белков. Причины этой аномалии пути эндоцитоза пока не выяснены.

Интересно, что на мембранах симбиосом не отмечены белки MtRab5, то есть молодые симбиосомы не несут маркеров идентичности, которые позволили бы клетке-хозяину определить их как ранние компоненты пути эндоцитоза. На более позднем этапе, симбиосомы, независимо от отсутствия MtRab5 на их мембране, приобретают маркер MtRab7A1/A2, который свойственен компартменту, находящемуся между Rab5-позитивными мультивезикулярным телом и вакуолью (Рис.16Б). Как следствие этого, симбиосомы оказываются “запертыми” на MtRab7-положительной стадии. Задержка в 10-12 дней в приобретении полной вакуолярной идентичности, когда на мембране появляются уже SNARE-белки, свойственные тонопласту, вероятно, способствует сохранению симбиосом в качестве индивидуальных мембранных компартментов, а также обеспечивает возможность существования симбиоза и азотфиксации.

Как белок Rab7 контролирует развитие и поддержание симбиосомы, остается неясным, но снижение экспрессии этого гена приводило к быстрому старению клубенька, недоразвитию симбиосом, и отсутствию азотфиксации (Limpens *et al.*, 2009).

Наличие эндосомального маркера Rab7 на мембране симбиосомы может объяснить и присутствие нескольких вакуолярных ферментов во внутрисимбиосомальном пространстве, которые, вероятно, транспортируются в вакуоль через поздние эндосомы. Например, цистеиновая протеаза, локализуемая в симбиосомном пространстве, была обнаружена и в вакуоли, и в цитоплазматических везикулах в корнях и клубеньках гороха (Vincente, Brewin, 2000), также показано наличие в клубеньке гороха цистеиновой протеазы 1, цистеиновой протеазы 15a и тиоловой протеазы (Serova *et al.*, 2017).

Можно заключить, что вход ризобий в клетку клубенька, согласно локализации белков-маркеров идентичности мембран, является процессом отличным от классического эндоцитоза или фагоцитарного поглощения бактерий в животных клетках, несмотря на их структурное сходство.

Во время процесса прекращения симбиоза, называемого старением клубенька, симбиосомы начинают сливаться и формировать литические вакуоль-подобные компартменты, на этой стадии белки комплекса вакуолярных SNARE накапливаются на мембранах симбиосом, что, возможно, обуславливает транспорт к этим структурам литических ферментов, как и к вакуолям.

Можно сделать вывод, что наличие ризобий в цитоплазме клетки-хозяина изменяет пути эндоцитоза инфицированной клетки, что может влиять на другие органеллы клетки-хозяина, например, на ее вакуоль, которая зависит от процессов эндоцитоза по своему биологическому статусу.

На следующем этапе исследований мы поставили задачу выяснить, изменяются ли функциональные параметры вакуоли в процессе развития инфицированной клетки.

3.3. Вакуоль инфицированной клетки в процессе развития симбиоза: необходимая катастрофа?

Согласно цитологическим исследованиям, проведенным на первых этапах начала исследования симбиоза (Verma, 1992), было постулировано, что ризобии входят в клетки через путь эндоцитоза. Встает вопрос, почему же клетки ризобий, после входа в клетку, не сливаются с вакуолью, как происходит во всех других растительных клетках с материалом, поступившим в клетку по пути эндоцитоза (Ebine, Ueda, 2009)?

Мы предположили, что одним из свойств корневых клубеньков, является ингибирование процесса удаления бактерий из цитоплазмы инфицированных клеток, что является крайне необычным для клетки эукариота. В пользу этой гипотезы говорит и то, что симбиосомы не приобретают ранние маркеры идентичности пути эндоцитоза, такие как малая ГТП-аза Rab5, на этапе входа в клетку клубенька, как показано в предыдущей главе.

Среди биологических механизмов, которые могут поддерживать это неожиданное состояние, а именно ингибирование процесса удаления бактерий, первым кандидатом стоит, естественно, модификация одного из основных литических компартментов растительной клетки, а именно, вакуоли.

На первом этапе исследований мы проанализировали протеолитическую активность вакуолей в корневых клубеньках люцерны (Fedorova, Brown, 2007).

3.4. Протеолитическая активность вакуолей в корневых клубеньках

Для анализа были использованы флуоресцентные зонды: 7-амино-4-метилкумарин, CBZ-L-фенилаланин-L-аргинин амид гидрохлорид (АМС)(субстрат сериновых протеаз) и родамин 110, бис-(CBZ-L-фенилаланин-L-аргинин амид дигидрохлорид (RPA) (субстрат цистеиновых и сериновых протеаз).

Флуоресцентные зонды RPA и АМС состоят из пептидов, присоединенных к флуорофору, при ферментативном расщеплении которого нефлуоресцентный субстрат превращается во флуоресцентный моноамид. Продукт гидролиза RPA проявляет спектральные свойства, сходные с флуоресцеином (зеленый

флуорофор). Зонд АМК обладает ярко-синей флуоресценцией после расщепления протеазами. АМК широко используется в качестве субстрата для определения ферментативной активности различных сериновых протеаз.

В клубеньках люцерны усеченной активность обоих зондов, как RPA, так и АМК, отмечалась в основном в вакуолях неинфицированных клеток и частично в вакуолях очень молодых инфицированных клеток в апикальной части клубенька (Рис.17). Накопление зонда в вакуолях зрелых инфицированных клеток практически не отмечалось, тогда как флуоресценция в вакуолярном просвете неинфицированных клеток указывала на сохранение неинфицированными клетками высокой протеолитической активности. Можно суммировать, что инфицированные и неинфицированные клетки отличались по функциональному состоянию их вакуоли, так, вакуоли инфицированных клеток теряли способность к протеолитической активности, что является явным отклонением от нормы для вакуолей растений.

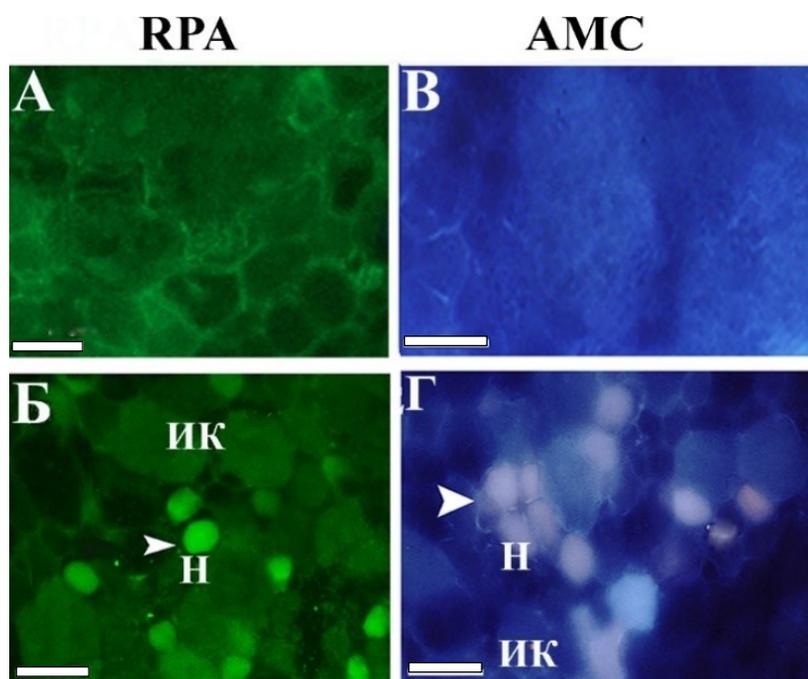


Рис. 17. Анализ распределения литической активности в клетках клубенька с использованием зондов RPA и АМК. (А,Б)– автофлуоресценция ткани до загрузки зондов, (В,Г) – распределение литической активности ткани после загрузки ткани зондами RPA и АМК. ИК- инфицированная клетка, Н-неинфицированная клетка.

Стрелками показаны вакуоли неинфицированных клеток, в люмене которых отмечается высокая флуоресценция зондов, связанная в высокой протеолитической активностью. Масштабная линейка = 50 μm .

3.5. Кислотность вакуолей в инфицированных клетках

С целью выяснения причин нарушения литических свойств вакуолей инфицированных клеток, была проанализирована их кислотность. Для этого использовали ацидотропный краситель Нейтральный красный (НК). Нейтральный красный накапливается в кислых компартментах и придает им интенсивно красный цвет. Отсутствие этого окрашивания указывает на отсутствие кислого рН.

Согласно анализу с использованием Нейтрального красного (Рис.18), кислыми были только вакуоли неинфицированных клеток. Для проверки достоверности транспорта Нейтрального красного через мембраны, была применена смесь протонифоров, нарушающих протонный градиент (Рис.18 А, Б, В, Г). Накопление нейтрального красного в вакуолях устранялось обработкой протонифором м-хлорофенилгидразоном (chlorophenylhydrazone, СССР) и валиномицином, которые вызывают диссипацию протонных градиентов (Fedorova, Brown, 2007). После добавления СССР, происходила потеря окраски вакуолями. Скорость реакции зависела от толщины среза. В срезах, толщина которых составляла 1-2 клеточных слоя, вакуоли неинфицированных клеток начинали терять нейтральный красный через 15 мин после нанесения СССР (рис.18 Б, В) и полностью обесцвечивались после часа экспозиции (Г).

Потеря вакуолярного окрашивания после обработки СССР и валиномицином подтверждает, что оно было основано на механизме ионной ловушки и зависело от рН люмена вакуоли (Fedorova, Brown, 2007), и что между вакуолями инфицированных и неинфицированных клеток существует разница в рН люмена вакуолей. Результаты анализа ацидификации вакуолей в корневом клубеньке представлены на Рис.18.

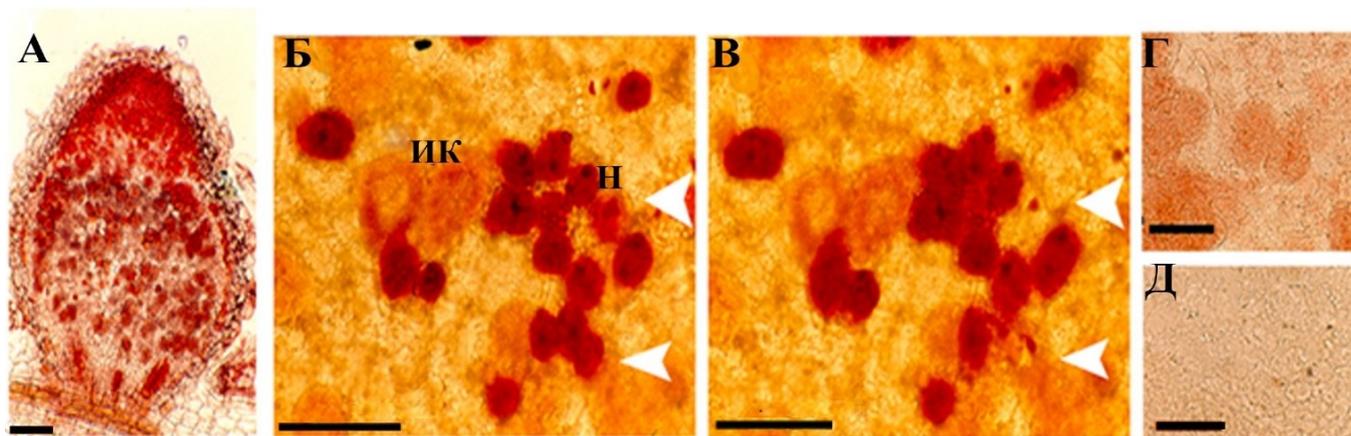


Рис. 18. Анализ ацидификации вакуолей с использованием Нейтрального красного (НК), контроль выполнен добавлением СССР.

(А) – клубенек, окрашенный НК. (Б) – накопление НР в вакуолях неинфицированных клеток (стрелка), и отсутствие метки в вакуолях инфицированных клеток (ИК). (В) -изменения в окраске ткани после добавления СССР, стрелки указывают на потерю окрашивания в клетках, (Г, Д) – последовательная потеря окрашивания после диссипации протонного градиента.

Масштабная линейка=100μm

Исследования модификации вакуоли в инфицированных клетках были продолжены с использованием конфокальной микроскопии поскольку этот анализ может быть сделан без искажений, вызванных наложением нескольких слоев клеток при световой микроскопии (рис. 19А, Б).

Согласно анализу с использованием Нейтрального красного, проведенному на клубеньках люцерны усеченной и сои, кислыми были вакуоли неинфицированных клеток, что подтвердило полученные ранее данные (Fedorova, Brown, 2007). Изменение биологии вакуолей затрагивало все клетки определенных клеточных слоев, и было пространственно связано с зонами развития клубенька, что дает основания связывать его с изменениями условий среды в инфицированных клетках в процессе развития симбиоза. Это позволило сделать заключение, что ингибирование кислотности вакуолей является особенностью бобово-ризобиального симбиоза.

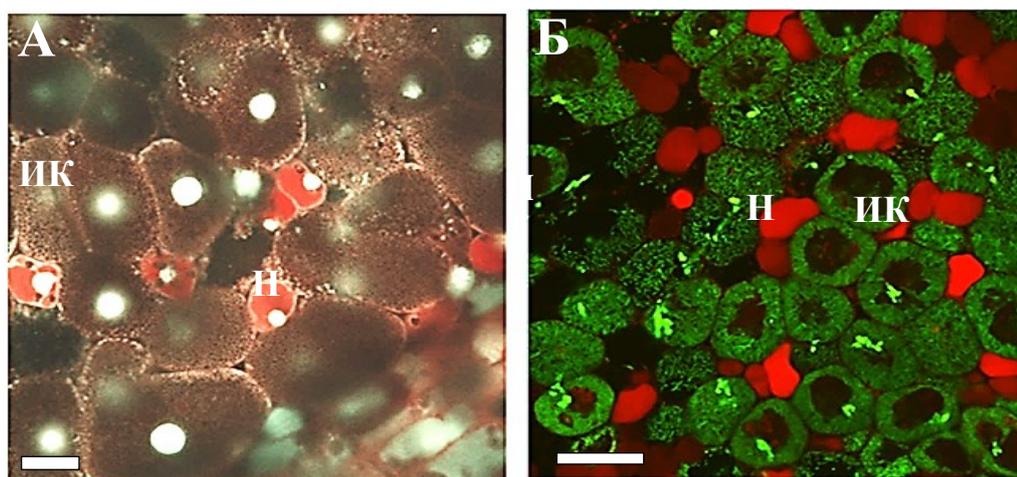


Рис. 19. Анализ кислотности вакуолей в клубеньках сои (А) и люцерны усеченной (Б) методом конфокальной микроскопии с использованием нейтрального красного. Масштабная линейка=А:20 μ m, Б: 50 μ m.

Можно заключить, что изменение в уровне кислотности вакуоли начинается уже на этапе выхода ризобий из инфекционных нитей и поддерживается на протяжении развития инфицированных клеток, тогда как вакуоли соседних неинфицированных клеток остаются кислыми. Как было показано выше, вакуоли инфицированных клеток также теряют способность к литическим функциям.

Для выяснения истинного рН была проведена калибровка рН вакуолей с использованием зонда LysoSensorYellow/BlueDND-160 (Han, Burgess, 2010). В кислой форме этот краситель флуоресцирует ярко-желтым цветом, а при нейтральном рН эмиссия сдвигается к синему спектру. Клубеньки разрезали вручную, сразу же переносили в раствор LysoSensorYellow/Blue (Рис.20). Согласно данным анализа (Рис.20), вакуоли неинфицированных клеток были кислыми, и имели рН от 5.0-5,5 в соответствии с калибровкой (Gavrin *et al.*, 2014), а рН вакуолей инфицированных клеток имели нейтральный рН (рН 7,2).

Таким образом, в процессе развития инфицированных клеток, их вакуоли теряли кислый рН и литические свойства, что является крайне необычным состоянием для вакуолей растительных клеток. Согласно данным анализа протеолитической активности вакуолей был сделан вывод о дефункционализации

вакуолей зрелых инфицированных клеток в процессе развития сиббиоза (Gavrin *et al.*, 2014).

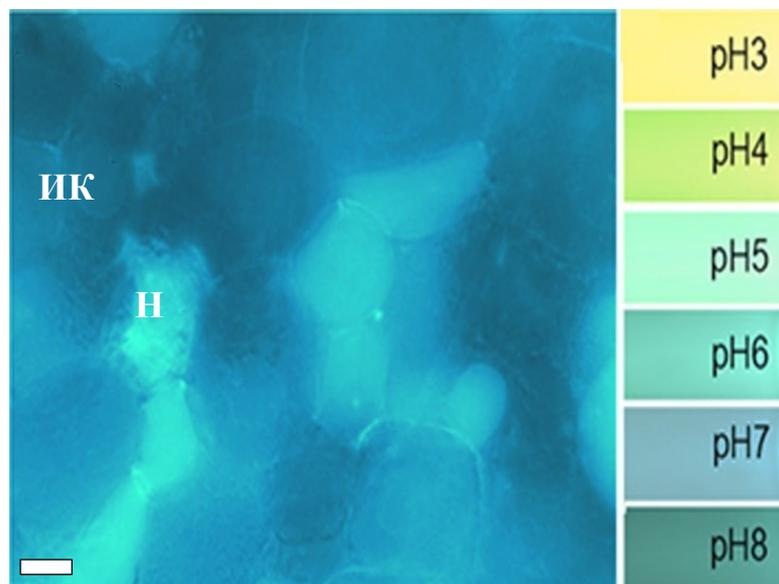


Рис. 20. pH вакуолей в ткани корневого клубенька. Масштабная линейка= 100 μm

На следующем этапе исследований были изучены молекулярные механизмы, которые приводят к дефункционализации вакуолей инфицированных клеток.

3.6. 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. Комплекс белков HOPS является ключевым регулятором, участвующим в формировании вакуоли растений и дрожжей и обеспечивает специфичность во время слияния везикул, несущих материал к тонопласту (Nickerson *et al.*, 2009; Balderhaar, Ungermann, 2013). В клетках дрожжей комплекс HOPS состоит из шести вакуолярных сортирующих белков (VPS): VPS11, VPS16, VPS18, VPS33, VPS39 и VPS41. В растениях белки HOPS участвуют в формировании вакуолей и

локализуются в тонопласте и превакуолярных компартментах. Нулевая мутация VPS16 вызывала эмбриональную летальность у арабидопсиса (Rojo *et al.*, 2001, 2003).

Для определения экспрессии комплекса HOPS в клубеньке была проанализирована экспрессия генов *M. truncatula*, кодирующих субъединицы комплекса HOPS: MtVPS11 и MtVPS39с помощью визуализации активности промотора, также была проанализирована локализация этих белков в клубеньках разного возраста. Промоторные области (2,5 кб от начала трансляции) MtVPS11 и MtVPS39 были слиты с β -глюкуронидазой (GUS) и трансформированы в корни люцерны усеченной (Рис. 21). Анализ распределения зон экспрессии показал, что промоторы этих генов были активны в неинфицированных клетках меристемы, в клетках периферических тканей и в неинфицированных клетках в зоне инфицирования. Но в инфицированных клетках в интерзоне 2/3 и в зоне азотфиксации экспрессия этих генов была подавлена.

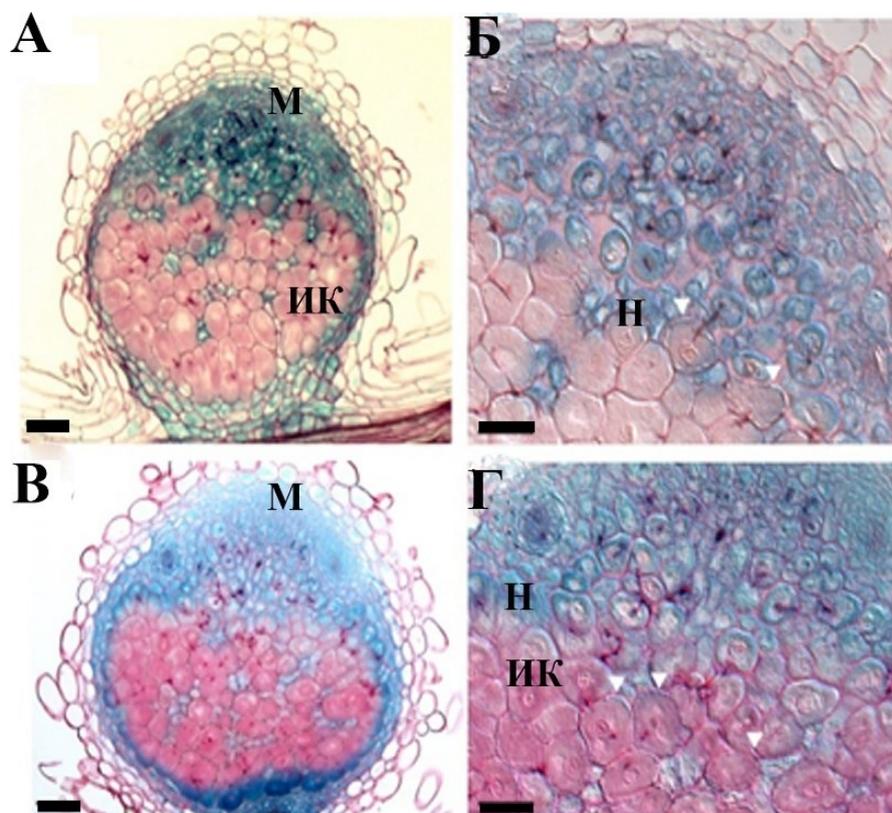


Рис. 21. Анализ распределения зон экспрессии MtVPS11 и MtVPS39 в клубеньках

Анализ окрашивания GUS в трансгенных корневых клубеньках, экспрессирующих ProVPS11:GUS (А, Б) или ProVPS39:GUS (В, Г). Экспрессия

(синее окрашивание), инфицированные клетки контрастированы эозином (розовый)(А, Б). Экспрессия промоторов *ProVPS11:GUS* и *MtVPS39::GUS*(В, Г) в 14-дневных клубеньках. М-меристема, ИК-инфицированные клетки, Н-неинфицированные клетки. Масштабная линейка=А, В: 75µm, Б, Г:25 µm.

Анализ показал, что промоторы генов *MtVPS11* и *MtVPS39* были активны в неинфицированных клетках меристемы, в клетках периферических тканей и в зоне инфекции. Но в инфицированных клетках в интерзоне 2/3 и в зоне азотфиксации экспрессия этих генов была подавлена.

Согласно расположению активности промоторов, выявленному с помощью метода окраски с использованием β-глюкуронидазы (GUS), экспрессия блокируется в инфицированных клетках, но сохраняется в клетках меристемы, сосудистых пучках и неинфицированных клетках, расположенных в кортексе клубенька.

Факт репрессии генов *VPS* в растительных клетках довольно необычен, так как отсутствие комплекса *HOPS*, согласно литературным данным, является фактором, вызывающим эмбриональную летальность растений (Rojo *et al.*, 2001, 2003).

Распределение белков *VPS11* и *VPS39* (Рис.22) в клубеньках было исследовано с использованием GFP-меченых генов под собственными промоторами: с помощью генетических конструкций: *ProVPS11:GFP-VPS11* и *ProVPS39:GFP-VPS39* (Gavrin *et al.*, 2014). Были использованы клубеньки, сформированные на трансгенных корнях, экспрессирующих конструкции белков *ProVPS11:GFP-VPS11* и *ProVPS39:GFP-VPS39*, собранные через 14 и 35 дней после инокуляции.

Для анализа функции генов *VPS* использовали метод РНК-интерференции (RNAi). Первоначально был использован промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (*Pro35S*), но трансгенные корни, экспрессирующие либо *Pro35S:RNAi-VPS39*, либо *Pro35S:RNAi-VPS11* не были получены.

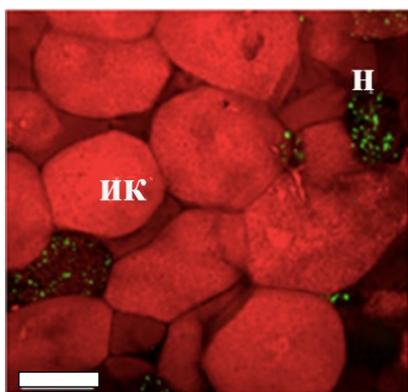


Рис.22. Распределение белка VPS39 в клетках клубенька.

Белок, меченый GFP, присутствует в неинфицированных клетках (Н), но отсутствует в инфицированных (ИК). Масштабная линейка = 5µm.

Это позволило предположить, что белки VPS необходимы для роста и развития корней, что подтверждает предыдущие исследования, которые показали, что мутация генов комплекса HOPS летальна на эмбриональном этапе (Rojo *et al.*, 2001). Поэтому были использованы промотор нодулина E12 (ProE12), который активен только в примордиях клубеньков и в самой молодой части инфекционной зоны клубенька, в 2-3 клеточных слоях (Vijn *et al.*, 1995). Уровень снижения экспрессии, согласно данным ПЦР анализа составил около 50%.

В трансгенных корневых клубеньках, несущих конструкции *ProE12:RNAi-VPS11* и *ProE12:RNAi-VPS39*, в инфицированных клетках молодой части инфекционной зоны клубенька, где происходит экспрессия промотора, было отмечено большое количество мелких вакуолей, слияние которых с образованием центральной вакуоли было частично ингибировано (Рис.23), что указывает на роль этих генов в процессе формирования центральной вакуоли.

Можно заключить, что вакуоли в инфицированных клетках клубеньков люцерны усеченной и сои теряли свою функциональность, кислый pH и способность к лизису. Это было обусловлено репрессией в инфицированных клетках генов комплекса HOPS, который регулирует селективный транспорт и слияние с мембраной тонопласта, при этом в неинфицированных клетках клубенька репрессии комплекса HOPS не происходило. Результаты исследования экспрессии комплекса HOPS в корневых клубеньках люцерны усеченной указывают на то, что развитие инфицированной клетки и продолжительность процесса азотфиксации коррелирует с временной репрессией вакуолярного комплекса HOPS.

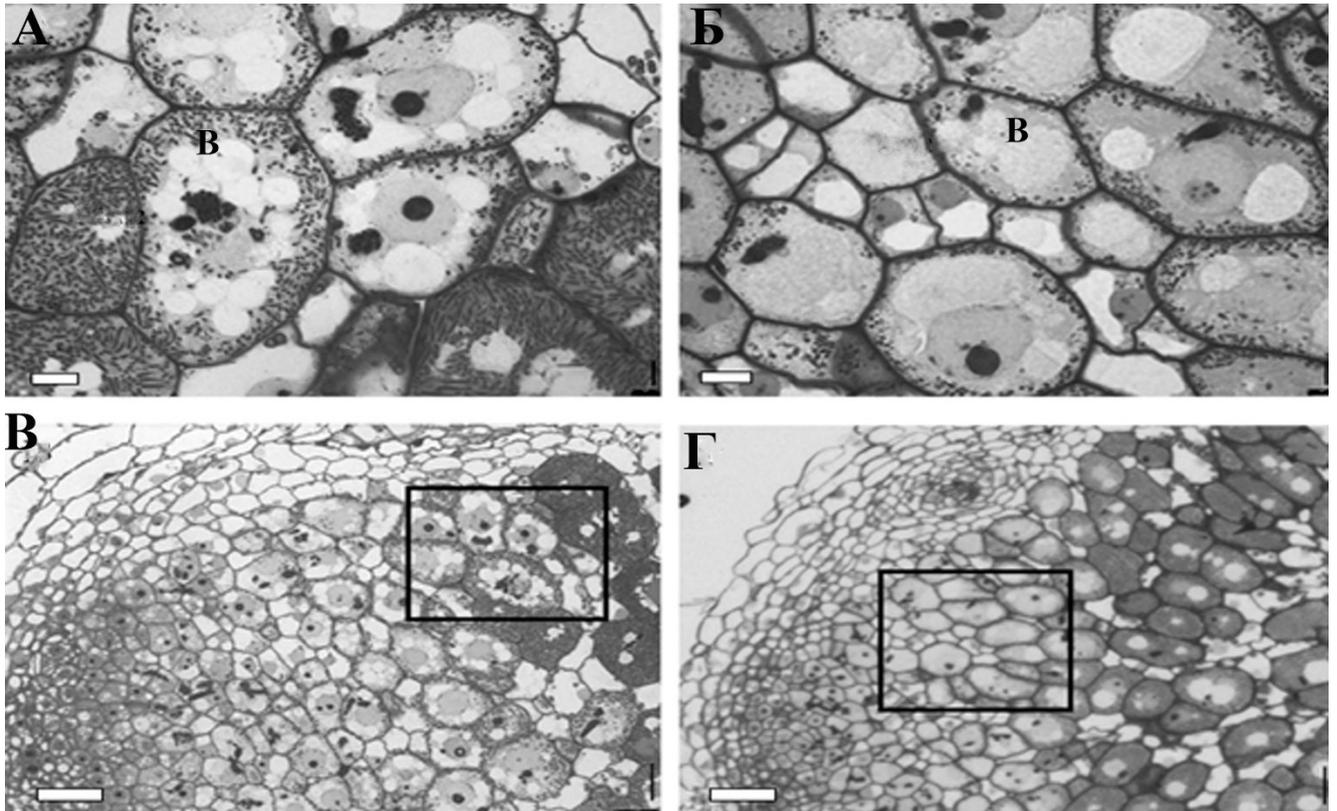


Рис.23. (А,Б,В,Г). Фенотип трансгенных (А,В) и контрольных клубеньков (В,Г) при частичном ингибировании экспрессии VPS39 методом РНК-интерференции. Масштабная линейка = А, В- 5 μ m, Б, Г- 25 μ m

Репрессия комплекса HOPS в инфицированных клетках клубеньков является одним из определяющих условий поддержания бактериальной колонии и азотфиксации, при этом происходило подавление в инфицированных клетках внутриклеточного траффика, специфичного для вакуоли клетки-хозяина. В то же время соседние, неинфицированные клетки, демонстрировали экспрессию гена и наличие белка.

Еще одним следствием отсутствия кислого рН вакуоли может являться нарушение транспорта малата в люмен вакуоли инфицированной клетки, поскольку малат в растительных клетках накапливается в вакуоли, этот транспорт, в свою очередь, зависит от кислого рН вакуолярного люмена (Hurth *et al.*, 2005; Etienne *et al.*, 2013). Поскольку малат является одним из основных источников углерода для зрелых симбиосом в зоне азотфиксации (White *et al.*, 2007), то деацидификация вакуолей может увеличить доступность малата для симбиосом. Можно сделать вывод, что развитие и поддержание инфицированной клетки, а

также способность внутриклеточной колонии ризобий к азотфиксации коррелирует с репрессией вакуолярного комплекса HOPS в инфицированных клетках и дефункционализацией их вакуолей.

Механизм, с помощью которого происходит ингибирование формирования кислого рН в вакуолях еще предстоит выяснить, но, по-видимому, процесс аналогичен тому, что происходит в животных клетках, инфицированных патогенами (Huang, Nazarova, 2019). В животных клетках также наблюдалось подавление слияния вакуолей, содержащих бактерии, с лизосомами и фагосомами, которые также подвергались деацидификации (Huynh, Grinstein, 2007).

Во время прекращения симбиоза и старения инфицированных клеток, экспрессия генов VPS возобновляется, вероятно, они участвуют в лизисе клетки-хозяина и симбиосом, и процессе слияния вакуоль-подобных структур в старых клетках.

3.7. Изменения размеров и архитектуры инфицированной клетки в процессе роста и развития

Чтобы прояснить механизмы адаптации симбиотических клеток к внутриклеточным бактериям и последствия изменения биологических свойств вакуоли, мы количественно оценили динамику объема и поверхности клеток, вакуолей и микросимбионтов во время развития клубенька (Gavrin *et al.*, 2014). Полученные с помощью конфокальной микроскопии фотографии, снятые в последовательности по вектору с поверхности вглубь ткани (Z-стеки) (Reisen *et al.*, 2005), использовались для трехмерной реконструкции и количественной оценки объемов, занимаемых вакуолями и симбиосомами с помощью программы Imaris 7.5 (Рис.24). При количественной оценке объема и площади клеток, симбиосом и вакуолей были использованы трансгенные клубеньки, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP)-меченый SYP22 (вакуолярный SNARE) (Gavrin *et al.*, 2014).

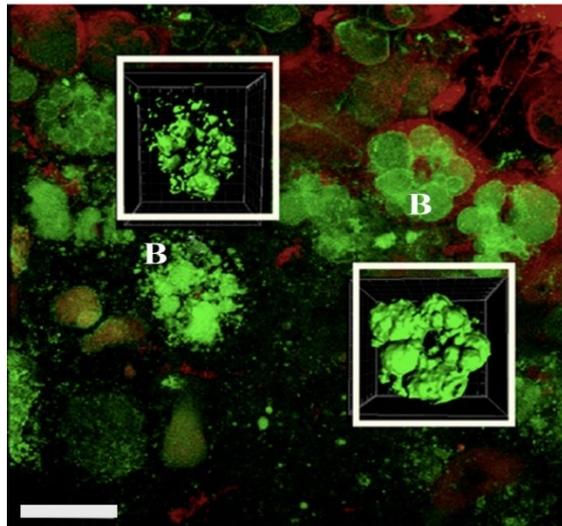


Рис. 24. Пример реконструкции объемов клеток с помощью программы IMARIS, белок SYP22, помечен GFP (зеленый флуорофор). В-вакуоль.

Масштабная линейка=50 μm .

Были проанализированы клетки клубенька (Рис.25А) на разных стадиях развития: молодые клетки зоны меристемы и зоны начала инфицирования (А), клетки на границе с зоной фиксации, (В), молодые клетки зоны фиксации, (Г) - дистальный, более глубокий слой клеток зоны фиксации (Д).

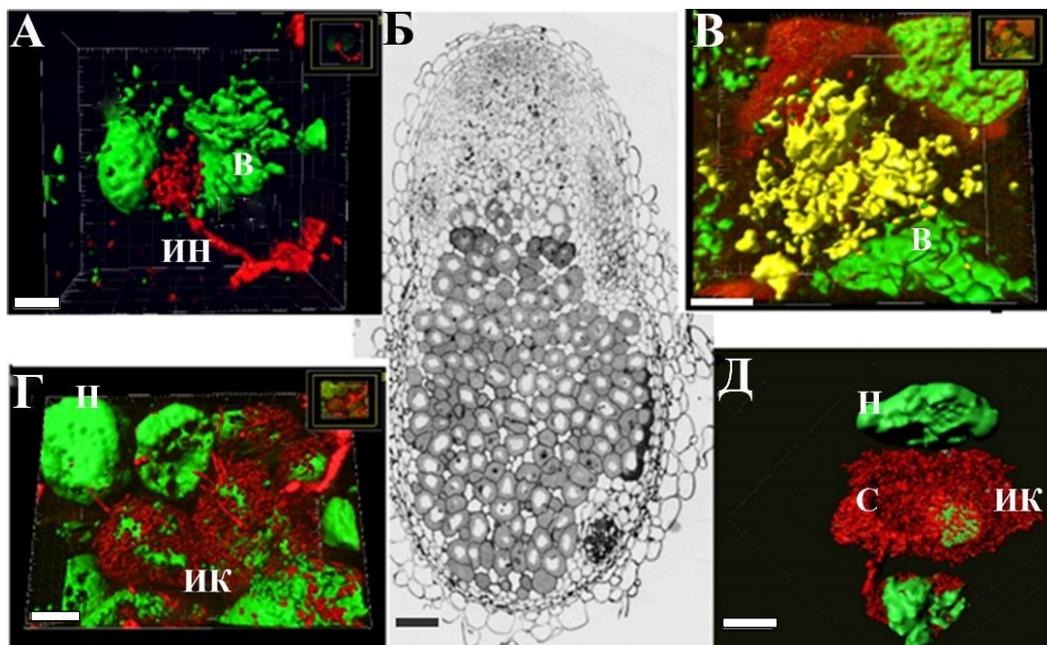


Рис. 25. Обзор зон клубеньков и стадий развития симбиосом.

Цветовой код-бактерии помечены красным флуорофором, вакуоли клеток помечены зеленым флуорофором. ИН-инфекционная нить, В-вакуоль, ИК-инфицированная клетка, Вакуоль в процессе измерения с использованием

программы Imaris помечена желтым (В). С-симбиосомы. Масштабная линейка (А)=5 μ m (Б)=100 μ m, (В)=10 μ m, (Г)=12 μ m.

Измерение площадей и объемов клеток клубенька, заполненных симбиосомами(Рис.25Г) показало, что в процессе роста и созрания инфицированных клеток, 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.25Д, Рис.26).

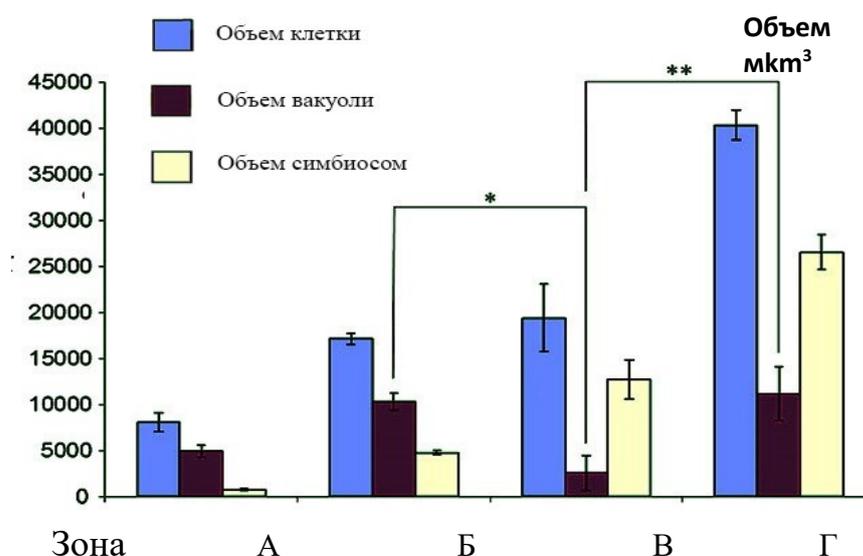


Рис. 26. Динамика изменения объема клеток, вакуолей и суммарного объема симбиосом.

Измерения позволили проследить динамику изменений в инфицированных клетках в процессе их развития и роста внутриклеточной бактериальной колонии (Рис.26). Молодые инфицированные клетки в объеме были относительно малы, сходны с неинфицированными (Рис.26А), и 65%-70% их объема было занято вакуолями. Размер вакуолей также был сопоставим с размерами вакуолей неинфицированных клеток. В проксимальном слое зоны начала инфекции (Рис.26Б) инфицированные клетки увеличивались в размере, при этом 60% объема клетки занимала вакуоль и около 30% - симбиосомы. В первом клеточном слое азотфиксирующей зоны азотфиксации (Рис.26В, Е), вакуоли инфицированных клеток внезапно теряли объем, и происходило их дробление на малые компартменты, в этом слое увеличивали как объем индивидуальных симбиосом,

так и число их в клетке. В этих клеточных слоях абсолютный объем вакуолей уменьшался в 4 раза, а абсолютный объем симбиосом увеличился в 2,5 раза, вследствие чего симбиосомы были способны занять около 65% объема клетки (рис. Рис.26Г).

В клубеньках люцерны центральная вакуоль частично восстанавливалась в объеме, равном тому, каким он был в небольших по объему неинфицированных клетках, тогда как инфицированная клетка значительно увеличилась, и большую ее часть теперь занимали симбиосомы. При этом в зрелых инфицированных клетках зоны фиксации вакуоли теряли тургор, и, как описано выше, не были способны поддерживать кислый рН. Общий объем вакуолей в зрелых инфицированных клетках составлял лишь 30% от общего объема клетки, тогда как в зрелых растительных клетках он достигает составляет 80-90% (Reisen *et al.*, 2005). При этом весь освободившийся объем клетки-хозяина занимали симбиосомы.

Можно заключить, что в процессе развития инфицированной клетки корневого клубенька происходит кардинальное изменение ее биологии. Одним из фундаментальных изменений является дефункционализация вакуоли клетки-хозяина, потеря кислого рН и способности к литическим функциям, также происходит абсолютное и относительное изменения объема вакуоли. Эти процессы сходны и происходят как в цилиндрических клубеньках люцерны, и в сферических клубеньках сои. При этом, если в цилиндрических клубеньках вакуоль сохраняется, теряя 50-60% относительного объема и литические функции, то в инфицированных клетках сферических клубеньков (соя) (Gavrin *et al.*, 2014), в люпиноидных клубеньках люпина (Fedorova *et al.*, 2007), в клубеньках небобового растения Параспония (van Velzen *et al.*, 2017, van Zeijl *et al.*, 2018), вакуоль исчезает практически полностью, при этом весь объем клетки занимают симбиосомы. То есть модификация и дефункционализация вакуоли является общей биологической особенностью инфицированных клеток в симбиозе растений с ризобиями, и необходимым компонентом изменения структуры и размеров внутреннего пространства клетки-хозяина, обуславливая возможность ее колонизации ризобиями и процесса азотфиксации.

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

Развитие инфицированных клеток клубеньков приводит к увеличению 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 в виде симбиосомной мембраны, лишенной клеточной стенки, и бактериями, а также исключительно быстрого роста объемов цитоплазматической мембраны инфицированных клеток вследствие быстрого увеличения этих клеток.

Вход ризобий в симпласт клетки-хозяина возможен только при отсутствии клеточной стенки на мембранах, окружающих «бесстенные капли» - расширенные части инфекционных нитей, не имеющие видимой клеточной стенки, в отличие от инфекционных нитей. Наличие «бесстенных капель» и отсутствие клеточной стенки вокруг бактерий, вышедших в симпласт клетки клубенька и позволяет клетке бактерии установить контакт с цитоплазмой клетки растения-хозяина. Для размещения микросимбионтов, инфицированная клетка должна обладать возможностями к увеличению площади как цитоплазматической мембраны, так и клеточной стенки, которое координируется с выходом бактерий и их пролиферацией в симпласте клетки растения-хозяина. Это обуславливает необходимость локальной модификации клеточной стенки для обеспечения возможности входа ризобий в симпласт клетки-хозяина (Brewin, 2004, Tsyganova *et al.*, 2021).

Поскольку симбиосомы в процессе созревания увеличиваются в размерах и числе, можно предположить, что материалы, производимые клеткой корневого клубенька, перенаправляются к симбиосомам. В этом случае статус симбиосомы в инфицированной клетке и молекулярные маркеры на симбиосомной мембране, от которых зависит рост и поддержание симбиосомы, являются важными факторами ее выживания и поддержания процесса азотфиксации.

Первым свидетельством наличия мембранных маркеров идентификации пути секреции на мембране симбиосом была работа Catalano *et al.*, (2007). В этой работе было показано наличие на симбиосомной мембране синтаксина SYP132, который является интегральным белком мембраны, участвующем в слиянии везикул на цитоплазматической мембране клетки, маркера пути секреции (экзоцитоза). В работе Catalano *et al.*, (2007) было показано, что белок ассоциирован с мембраной инфекционной нити, бесстенными каплями, через которые происходит выход ризобий в симпласт клетки-хозяина и симбиосомами после их освобождения от инфекционной нити (Catalano *et al.*, 2007).

Это позволило предположить, что в формировании симбиотического мембранного интерфейса задействован процесс секреции, таким образом симбиосома является компартментом, внешним по отношению к цитоплазме инфицированной клетки, сходным с апопластом.

Путь секреции (экзоцитоза) включает слияние транспортных везикул с целевой мембраной, которой является цитоплазматическая мембрана клетки. Кargo везикул пути экзоцитоза необходимо не только для строительства и поддержания этой мембраны, но и для секреции в апопласт. Слияние везикул на этой мембране контролируется группой белков из группы SNAREs, и осуществляется путем образования стабильного ядра комплекса из четырех белков SNARE и регулирующих процесс слияния других белков. Как правило, комплекс образуют один SNARE-белок, расположенный на транспортной везикуле (v-SNARE), в комплексе с тремя SNARE-белками, которые находятся на мембране-мишени (t-SNARE) (Bassham, *et al.*, 2008, Lipka *et al.*, 2007, Jahn, Scheller, 2006). Динамическая часть транспортного пути представлена везикулами, транспортируемыми от аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума, эта часть опосредуется белками v-SNAREs принадлежащими к семейству VAMP72 (vesicle-associated membrane protein) (Zhang *et al.*, 2015, Ivanov *et al.*, 2012, Gavrin *et al.*, 2015). Ранее было показано, что специфические гены VAMP72 участвуют в процессе взаимодействия арабидопсиса с биотрофными грибами (Kwon *et al.*, 2008).

Мы исследовали белки семейства MtVAMP72 в процессе формирования симбиотического интерфейса в клубеньках люцерны усеченной и сои. Выбор белков, находящихся на мембране везикулы, был обусловлен мобильностью везикул, несущих на мембране этот белок, что создает возможности для клетки-хозяина к динамической регуляции метаболических возможностей симбиотического интерфейса (Ivanov *et al.*, 2012, Gavrin *et al.*, 2015).

Изучение геномных последовательностей люцерны усеченной с использованием последовательностей арабидопсиса как основы для поиска гомологов, позволило выявить группу генов *MtVAMP72*, специфичных для люцерны усеченной и участвующих в развитии симбиотических отношений (Ivanov *et al.*, 2012).

Филогенетический анализ с использованием нескольких геномных последовательностей, показал, что VAMP72 можно разделить на три группы, а именно VAMP721, VAMP724 и VAMP727.

В корнях и в клубеньках при сравнении уровня экспрессии были выделены гены *MtVAMP721a*, *MtVAMP721d* и *MtVAMP721e*, экспрессия которых была максимальной. Мы предположили, что именно эти гены могут участвовать в процессе симбиоза и формировании симбиосомных мембранных компартментов (Рис.27).

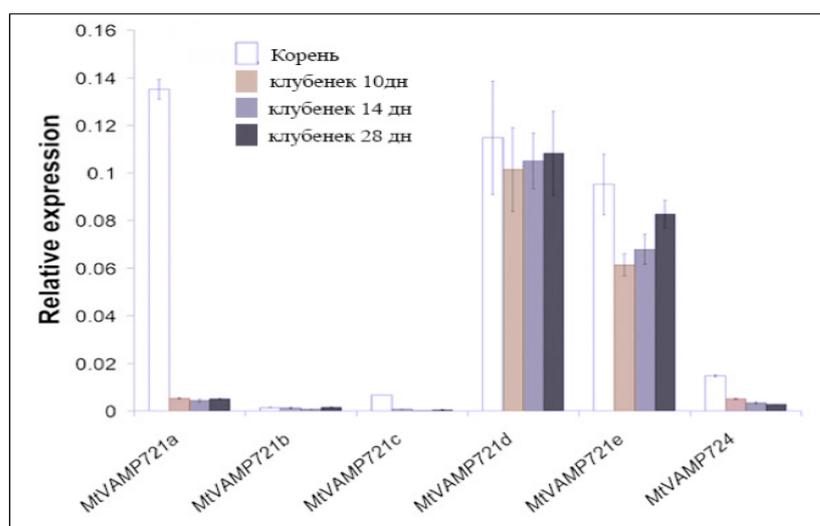


Рис.27. Уровень экспрессии генов группы *MtVAMP7* в корнях и клубеньках разного возраста

Для выявления динамики экспрессии этой группы генов, и их распределения в ткани клубенька при развитии симбиоза, были клонированы открытые рамки считывания этих генов и их регуляторные последовательности. На следующем этапе были созданы конструкции, которые позволили определить динамику и тканевое распределение экспрессии в ткани клубенька с использованием метки промоторной последовательности с меткой β -глюкуронидазы (GUS:промотор).

Согласно данным анализа распределения экспрессии в корневых клубеньках, наивысший уровень был отмечен в апикальной части клубеньков, зоне меристемы и начала инфицирования, что может объясняться высокой динамикой мембранного синтеза в процессе роста инфицированных клеток и симбиосом в этих зонах клубенька.

Анализ экспрессии *MtVAMP721d* и *MtVAMP721e* (Рис.28) в зонах развития корневого клубенька и в опыте на трансгенных корнях, экспрессирующих трансляционные слияния GFP-*MtVAMP721d* и GFP-*MtVAMP721e* подконтролем их нативных промоторов, меченых β -глюкуронидазой (GUS), показал, что эти промоторы активны в меристеме и в зоне инфицирования, где происходит выход бактерий из инфекционных нитей и формирование симбиосом.

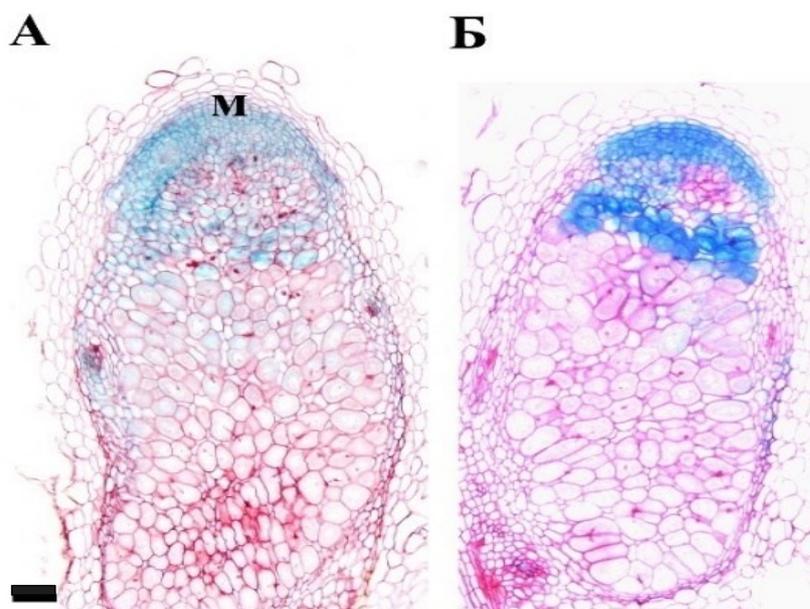


Рис. 28. GUS:промотор анализ экспрессии *MtVAMP721d* (А) и *MtVAMP721e*(Б) в клубеньках. м-меристема. Масштабная линейка= 100 μ m

В корневом клубеньке проторная активность наблюдалась в зоне меристемы, зоне инфицирования и сосудистых пучках (Рис.28). Это объясняется функциональными ролями этих генов, отвечающих за динамическую экспансию мембран и их рост.

На следующих этапах исследований была определена субклеточная локализация белков, кодируемых этими генами, методом иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии клубеньков, полученных на трансгенных корнях, в которых открытая рамка считывания гена была помечена GFP (Рис. 29А,Б). Белок присутствовал в клетке в виде точечных структур, причем наблюдались скопления точек вокруг инфекционных нитей (Рис.29А).

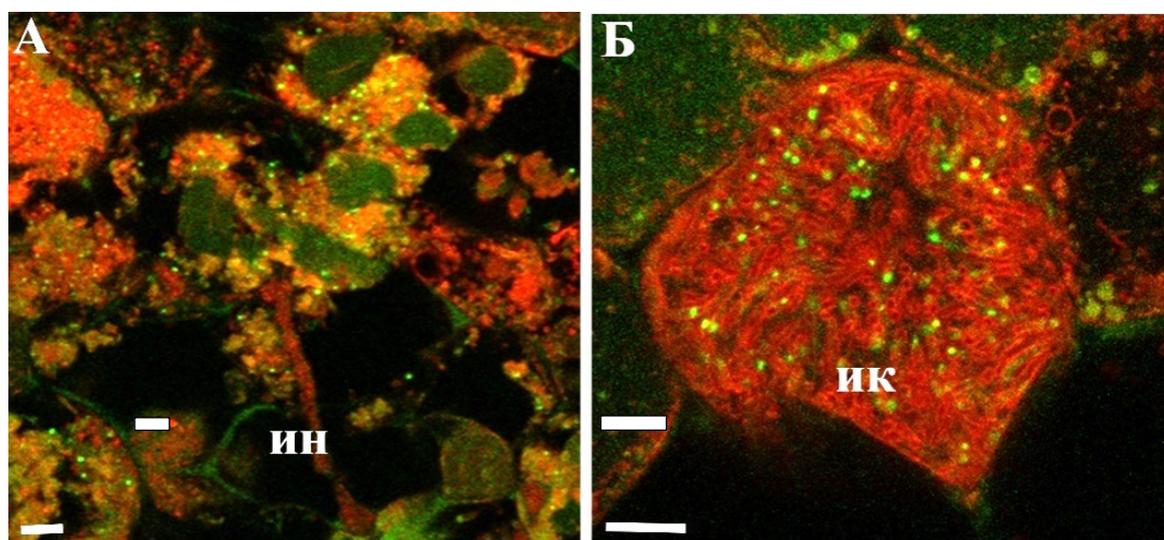


Рис. 29. Распределение белка *MtVAMP721d* в клетках клубенька люцерны в процессе инфицирования (А) и в инфицированной клетке (Б). Цветовой код: белок помечен GFP (зеленый флуорофор). Симбиосомные мембраны окрашены меткой FM64 (красный флуорофор). Масштабная линейка: (А, Б)=25µm

Локализация белков GFP:*MtVAMP721d* и GFP:*MtVAMP721e* в виде точечных структур в инфицированных клетках, была практически идентична (Рис.29). Эти точечные структуры накапливались в локальных областях вблизи инфекционных нитей, где формируются бесстенные капли и и начинают развиваться симбиосомы (Ivanov *et al.*,2012).

Таким образом, наблюдалась динамика везикул, несущих белки MtVAMP721d и MtVAMP721e локально в клеточной области, где происходило формирования симбиотического интерфейса.

Для выяснения функциональной роли белков MtVAMP721d и VAMP721e был использован метод частичного ингибирования экспрессии генов в корневом клубеньке. Было применено специфичное двойное блокирование экспрессии MtVAMP721d и MtVAMP721e методом РНК-интерференции. Поскольку MtVAMP721d и MtVAMP721e высокоомологичны, был создан вектор, несущий генетическую конструкцию, в которой была блокирована экспрессия обоих генов одновременно под промотором вируса табачной мозаики 35S(35SCaMV:RNA6 iVAMP721d:VAMP721e) (Рис.30).

Нокаут обоих генов давал уменьшение экспрессии в корневых клубеньках вплоть до 80% по сравнению с контрольными клубеньками, трансформированными пустым вектором, при этом экспрессия других генов группы, а именно MtVAMP721a и MtVAMP724 изменялась незначительно, что дает этому анализу высокую специфичность (Рис.30).

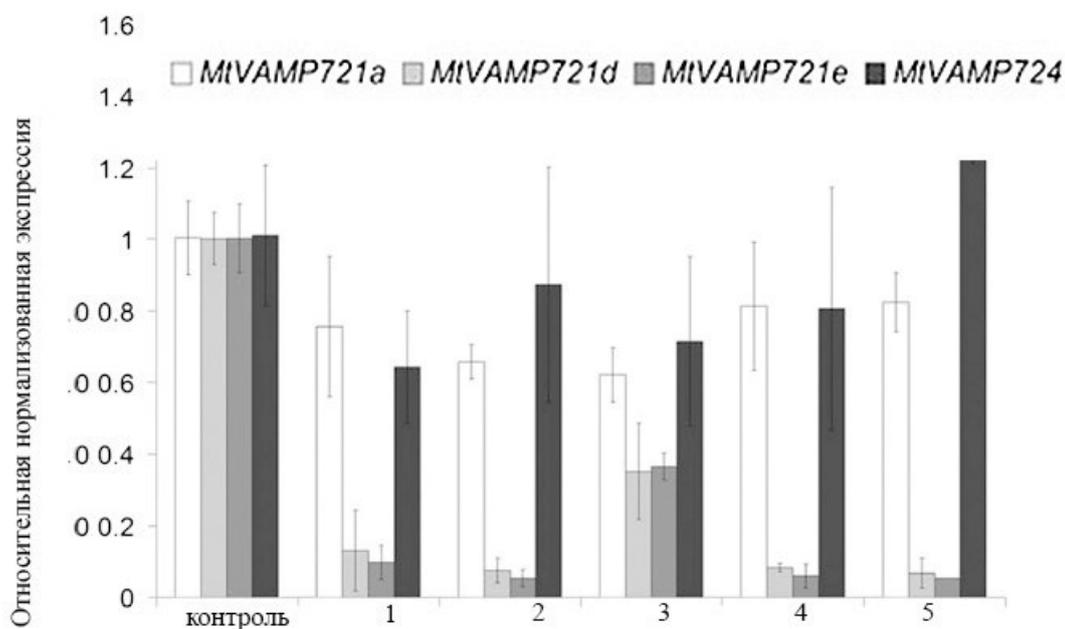


Рис. 30. Уровень частичного блокирования экспрессии генов группы VAMP 72 (выборка в каждом случае состояла из пяти корней, 1-5).

Число клубеньков на трансгенных корнях не изменялось, в сравнении с контролем. Клубеньки, полученные на трансгенных растениях, отличались специфическим фенотипом.

Анализ структуры клубеньков, полученных на трансгенных корнях в случае репрессии MtVAMP72 методом РНК интерференции, выявил наличие многочисленных инфекционных нитей в центральной ткани этих клубеньков (Рис.31). В этих клубеньках отдельные симбиосомы в инфицированных клетках отсутствовали или присутствовали в очень незначительном количестве. Таким образом, нокадаун как MtVAMP721d, так и MtVAMP721e специфически блокировал образование симбиосом (Рис.31).

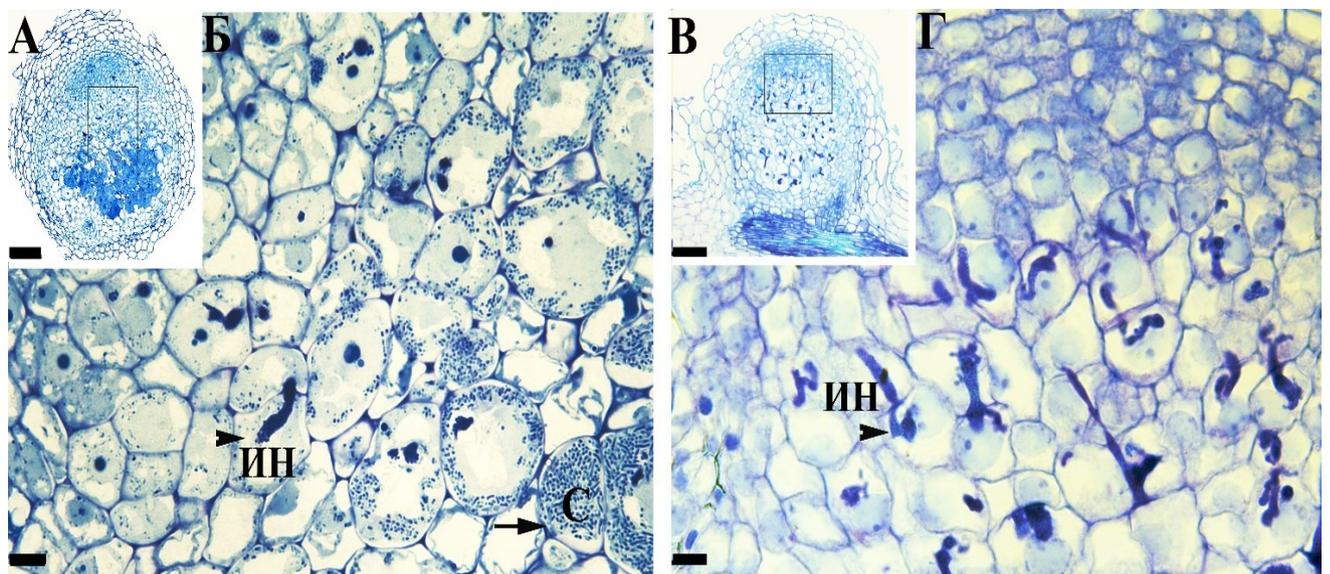


Рис. 31. Фенотип корневых клубеньков люцерны усеченной после нокаута генов MtVAMP721e/d.

А,Б–контрольные клубеньки, В,Г-двойной нокадаун MtVAMP721d/ MtVAMP721e, клубеньки, собранные с трансгенных корней. Масштабная линейка=А,В: 10µm, Б,Г:50µm. В контрольных клубеньках (А,Б) видны как инфекционные нити ИН, (наконечник стрелки), так и клетки, где уже находятся симбиосомы (СМ), тогда как в случае нокадауна генов VAMP721(В), симбиосом в цитоплазме нет (В,Г).

Препараты контрастированы синим толлуидином.

Блокирование выхода ризобий из инфекционных нитей является крайне интересным феноменом, который отражает возможности клетки-хозяина в

процессе взаимодействия с микробиотой, особенно в случае проникновения бактерии в симпласт. Для растительных клеток такое проникновение достаточно сложно, поскольку клеточная стенка является природным барьером, который предотвращает внедрение, но, хорошо известно, что патогенные бактерии и грибы обладают развитыми механизмами разрушения клеточных стенок.

В случае инфицирования пост-меристематических клеток, как это происходит в случае развития симбиоза, между внедрившимися бактериями и цитоплазмой клетки-хозяина существует мембрана-интерфейс, но не существует клеточной стенки. Но в экспериментах по частичному ингибированию экспрессии генов группы VAMP7 появился фенотип, который структурно идентичен хорошо изученной защитной реакции растения в процессе растительно-патогенных взаимодействий, когда увеличивается синтез и отложение материалов клеточной стенки на мембране при контакте с микроорганизмом (Рис.31,32).

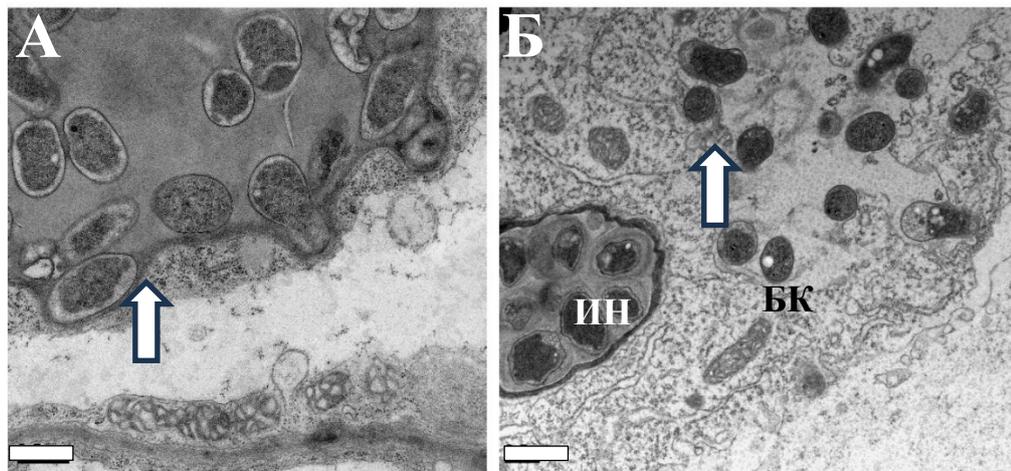


Рис. 32. Фенотип корневого клубенька люцерны с частичным нокаутом генов MtVAMP721e/d (электронная микроскопия). (А), клетка клубенька с нокаутом генов MtVAMP721e/d, стрелка - клеточная стенка «бесстенной капли», имеющей клеточную стенку, которая не позволяет бактериям выйти в симпласт клетки-хозяина, (Б) – ультраструктура контрольных клубеньков, выход бактерий из «бесстенной капли. ИН- инфекционная нить, БК – бесстенная капля, стрелка - выход бактерий в симпласт клетки-хозяина. Масштабная линейка = 0.5 μm

Согласно анализу, проведенному с помощью метода электронной микроскопии, подавление экспрессии MtVAMP721d и MtVAMP721 негативно влияло на формирование бесстенных капель (БК) и высвобождение бактерий из инфекционной нити. При исследовании ультраструктуры инфицированных клеток было показано, что в клубеньках, полученных на трансгенных корнях *RNAi:VAMP721d:VAMP721e* (Рис.32А) бесстенные капли имели хорошо различимый слой материала, по структуре напоминавшего клеточную стенку (стрелка), наличие которой, видимо, не позволило бактериям выйти в цитоплазму клетки, в отличие от контрольных клубеньков, где присутствовали как инфекционные нити, так и бесстенные капли, и где выход бактерий не был блокирован (Рис.32Б). То есть в клубеньках, где экспрессия генов VAMP721d:VAMP721e была подавлена, бесстенные капли не формировались и выход бактерий в симпласт клетки клубенька был затруднен.

Исследования роли белков группы VAMP72 в симбиозе были продолжены на клубеньках другого типа, на сферических клубеньках сои *Glycine max*, имеющими «детерминированный» тип роста клубеньков с короткоживущей меристемой. Мы предположили, что белки группы VAMP72 пути секреции, идентифицированные в клубеньках *M.truncatula* (Ivanov *et al.*, 2012), участвуют в локальной модификации клеточной стенки при высвобождении ризобий и провели исследование для выяснения, какой из компонентов клеточной стенки подвергается модификации вследствие блокирования экспрессии генов группы VAMP72 (Gavrin *et al.*, 2015).

Для выяснения роли пути секреции, зависящего от VAMP721d/e в клубеньках с детерминированным типом роста, а также их роли в модификации симбиотического интерфейса, был проведен анализ экспрессии этих генов и в корневых клубеньках сои (*Glycine max*) (Gavrin *et al.*, 2015), (Рис.33).

По результатам анализа были выделены гены, с высоким уровнем экспрессии в молодых клубеньках сои (Рис.33).

Гены с высокой экспрессией гомологов из этой группы: GmVAMP72d и GmVAMP72a были клонированы и полученные геномные конструкты были

использованы для исследования функций генов этой группы в корневых клубеньках сои.

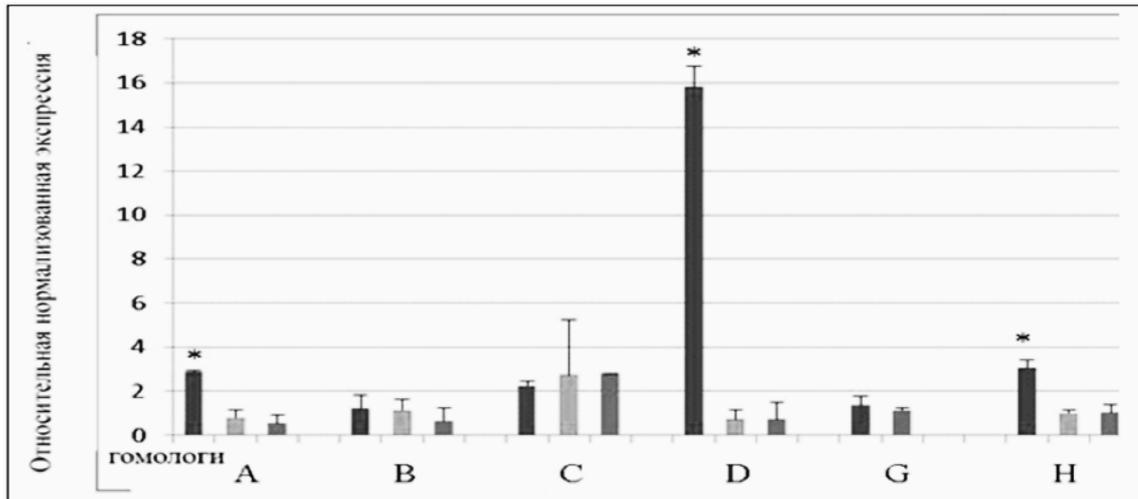


Рис. 33. Уровень экспрессии генов группы VAMP7 в клубеньках и корнях сои согласно RNA-Seq Atlas of Glycine max data (<http://soybase.org/soyseq>).

Были созданы диагностические конструкции генов под собственными промоторами для выявления распределения этих белков в процессе симбиоза. По уровню экспрессии в клубеньках для клонирования были отобраны гены с наивысшей экспрессией в корневых клубеньках

При исследовании распределения белка в корневом клубеньке сои, было показано, что белок располагается в виде точек вокруг инфекционной нити в процессе выхода бактерий в симпласт клетки-хозяина (Рис.34) (Gavrin *et al.*, 2015).

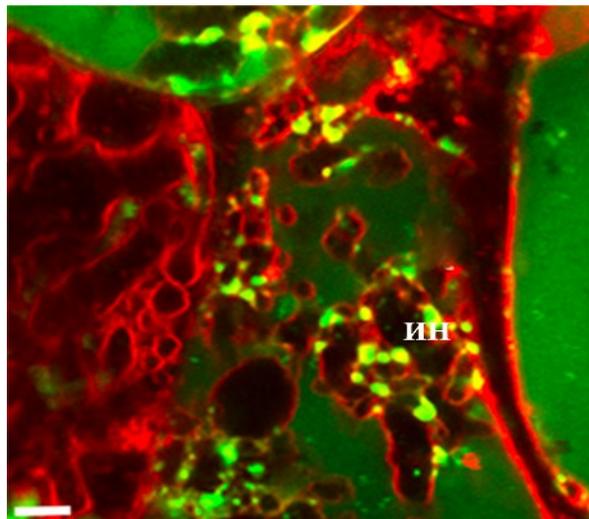


Рис. 34. Распределение белка GmVAMP721d в клетке клубенька сои в процессе инфицирования. Белок GmVAMP721d помечен зеленым флуорофором (GFP).

ИН: инфекционная нить, мембраны контрастированы FM64 (красный флуорофор). Масштабная линейка = 1 μ m

Метка белка располагалась на мембранах бесстенной капли и инфекционной нити (Рис.34), что указывает на роль белка в процессе выхода бактерий из инфекционных нитей и формирования симбиотического интерфейса. Для выявления мембран контрастирование было проведено с помощью маркера эндоцитоза FM64 (красный флуорофор) (Рис.34). Было показано, что белки этой группы располагаются вокруг инфекционной нити и бесстенных капель в процессе выхода ризобий в симпласт хозяина.

Для выяснения функциональной роли генов группы *GmVAMP721* были получены трансгенные клубеньки, которые содержали конструкт для РНК-интерференции двух генов одновременно, который экспрессировался под промотором леггемоглобина сои: *GmVAMP72d/a (pLBc3:RNAi-GmVAMP721d/a)*, где экспрессия была уменьшена более чем вдвое. (Рис.35). Трансгенные клубеньки сои, также как и в опытах с люцерной усеченной, описанных выше, имели специфичный фенотип, частично повторяющий фенотип люцерны, но также обладающий значительными особенностями и отличиями. В трансгенных клубеньках, вместо отдельных симбиосом, были отмечены бактериальные скопления, которые содержали 20-40 бактерий (Бкл), заключенных в плотный матрикс, по плотности напоминающий клеточную стенку. Эти скопления бактерий были частично взаимосвязаны и образовывали подобие сети в клетке клубенька. Кроме того, в этих клубеньках наблюдалось большое количество мертвых клеток растения-хозяина без цитоплазмы, заполненных скоплениями бактерий, то есть эти клубеньки не были способны к азотфиксации, а ризобии проявляли скорее паразитические характеристики. Инфицированные клетки, заполненные кластерами бактерий, теряли свою целостность, цитоплазма распадалась, а потеря контакта между цитоплазмой и клеточной стенкой приводила к потере тургорного давления и отслоению клеточной стенки (рис. 35) (Gavrin *et al.*, 2015).

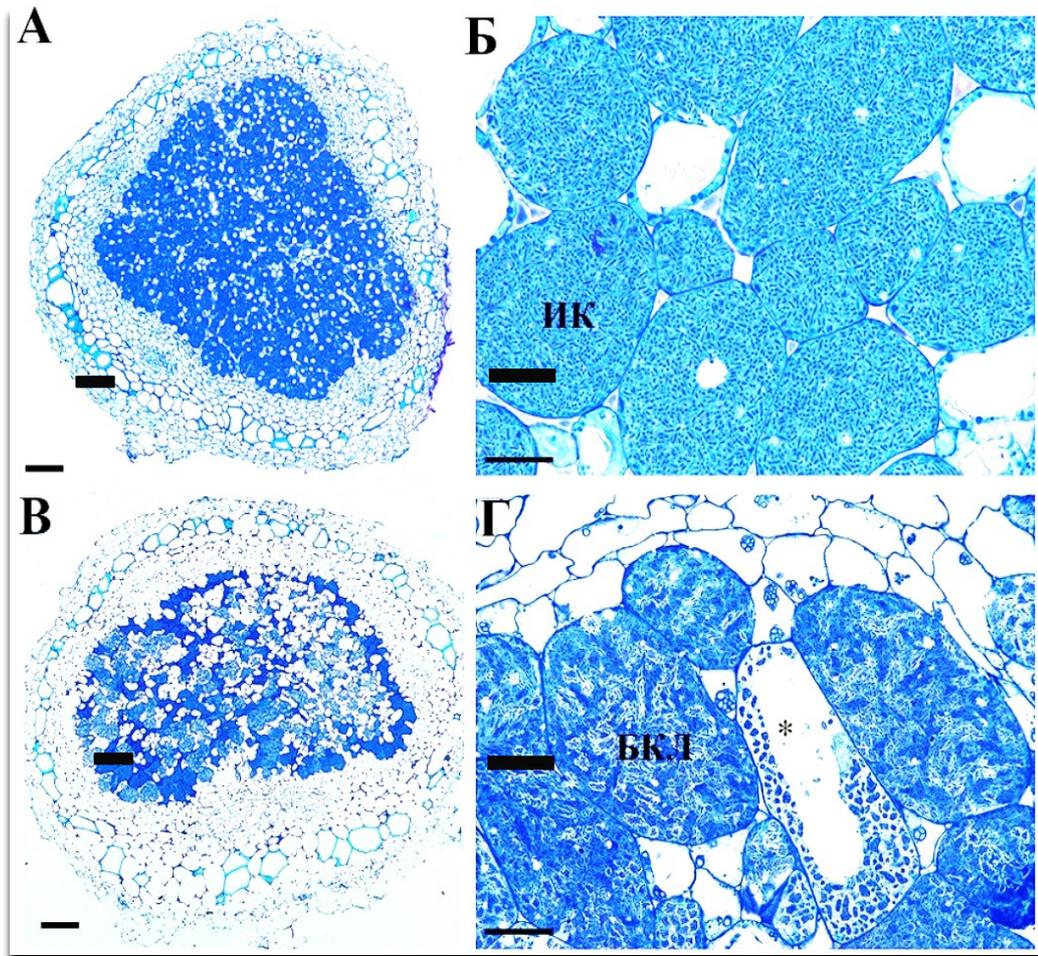


Рис. 35. Фенотип контрольных клубеньков сои (А,Б) и трансгенных клубеньков с частичным нокадауном генов *GmVAMP721d/a* (В,Г).

ИК-инфицированная клетка, Бкл-бактериальные кластеры (световая микроскопия).
Масштабная линейка А,В: 75 μ м, Б,Г: 25 μ м

Для более детального описания фенотипа было проведено электронно-микроскопический анализ трансгенных клубеньков с частичным блокированием экспрессии в сравнении с контрольными (рис.36). В отличие от контрольных клубеньков (Рис.36 А,Б), в трансгенных клубеньках, где экспрессия *GmVAMP721d/a* была подавлена, в молодых клетках вместо симбиосом (См) были образованы кластеры, содержащие бактерии (Бкл), часто наблюдалось деление бактерий внутри кластера (Рис.36,Г). Внутриклеточные кластеры занимали практически весь объем клетки-хозяина, образуя подобие сети, бактерии внутри кластеров имели признаки деградации.

Полученные результаты показывают, что уменьшение экспрессии GmVAMP721d/a блокировало нормальное высвобождение бактерий и формирование симбиосом в клубеньках сои, что свидетельствует о том, что путь секреции группы везикулярных белков GmVAMP721 необходим для высвобождения бактерий и в клубеньках сои, как это ранее наблюдалось в клубеньках люцерны.

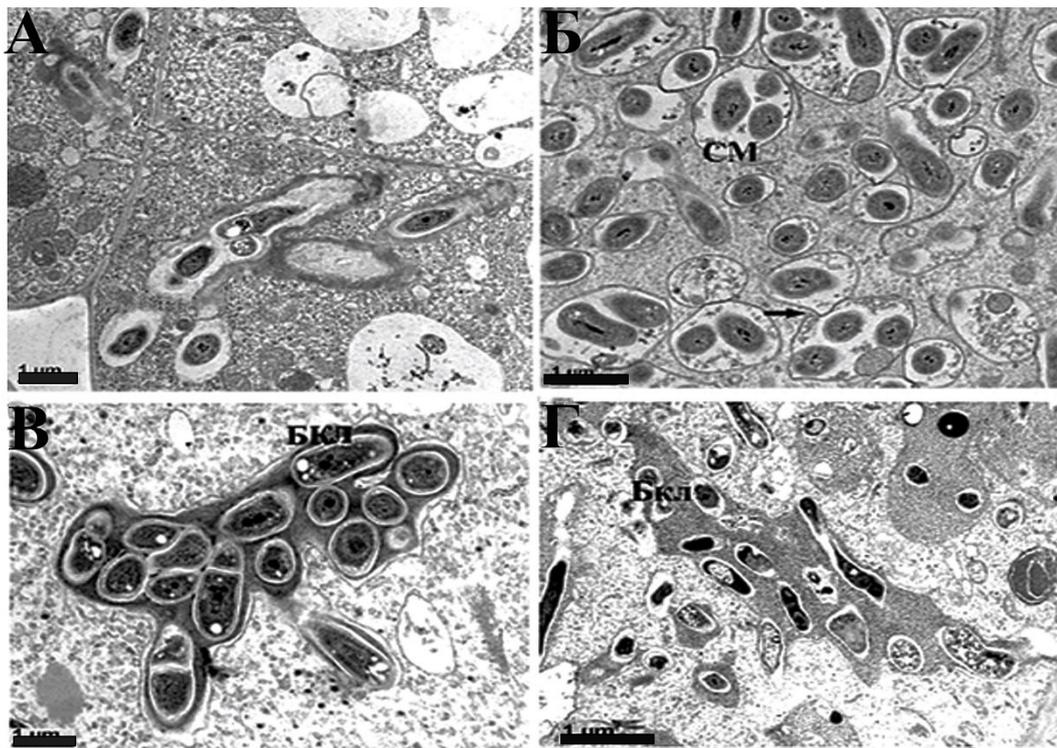


Рис. 36. (А,Б): контрольные клубеньки, (В,Г) – клубеньки, полученные на корнях с частичным блокированием экспрессии GmVAMP721d/a. ИН-инфекционная нить, БК-бесстенная капля, СМ-симбиосома, Бкл-бактериальные кластеры в трансгенных клубеньках. Масштабная линейка=1μm.

Анализ азотфиксирующей способности трансгенных клубеньков сои показал, что азотфиксирующая активность трансгенных клубеньков, оцениваемая в мкмоль C_2H_4 /час/ г свежего веса, составляла лишь 10% от активности контрольных клубеньков, то есть частичное блокирование экспрессии GmVAMP721d/a практически приводит к Fix- фенотипу (Рис.37).

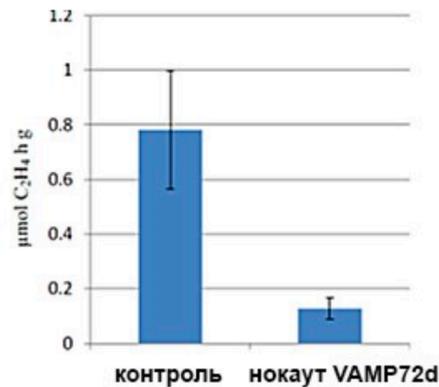


Рис. 37. Уровень азотфиксирующей активности в клубеньках сои с частичным блокированием экспрессии GmVAMP721d/a.

Для выяснения, какие именно компоненты клеточной стенки зависят от транспорта, который обеспечен белками GmVAMP721d/a, было проанализировано наличие ряда компонентов клеточных стенок в контрольных клубеньках и в клубеньках люцерны с частично блокированной экспрессией гомолога GmVAMP721d/a, а именно целлюлозы, каллозы, метил-эстерифицированного и деметил-эстерифицированного пектина, арабиногалактана, рамногалактуронана II (Gavrin *et al.*, 2016).

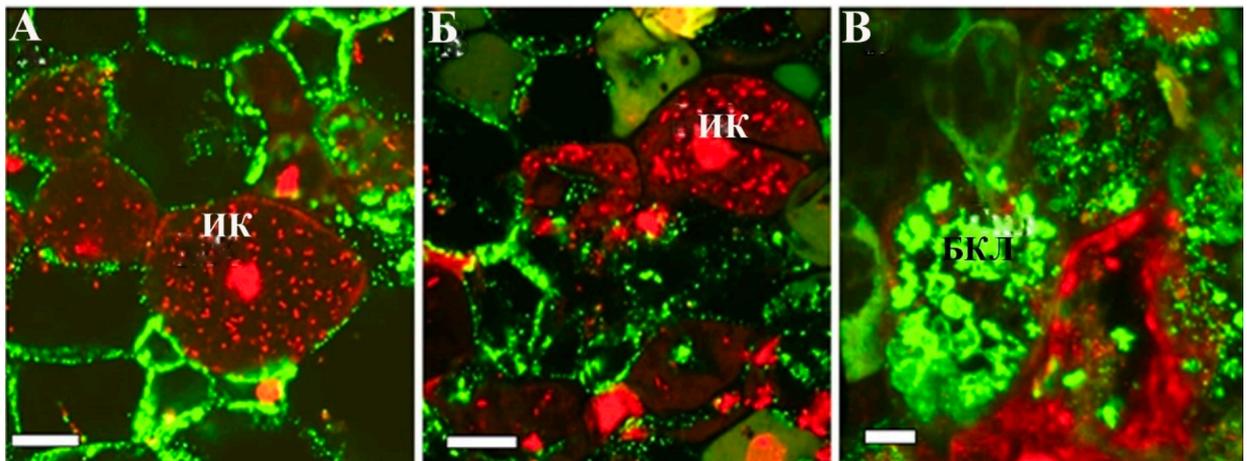


Рис. 38. Распределение каллозы в клеточных стенках контрольных клубеньков (А) и трансгенных клубеньков сои с частично блокированной экспрессией генов GmVAMP721 (Б,В). Цветовой код: бактерии и ядра помечены иодидом пропидия (красный флуорофор). Каллоза: зеленый флуорофор ИК-инфицированная клетка, Бкл-бактериальные кластеры. Масштабная линейка (А,Б)=10µm (В)=5µm

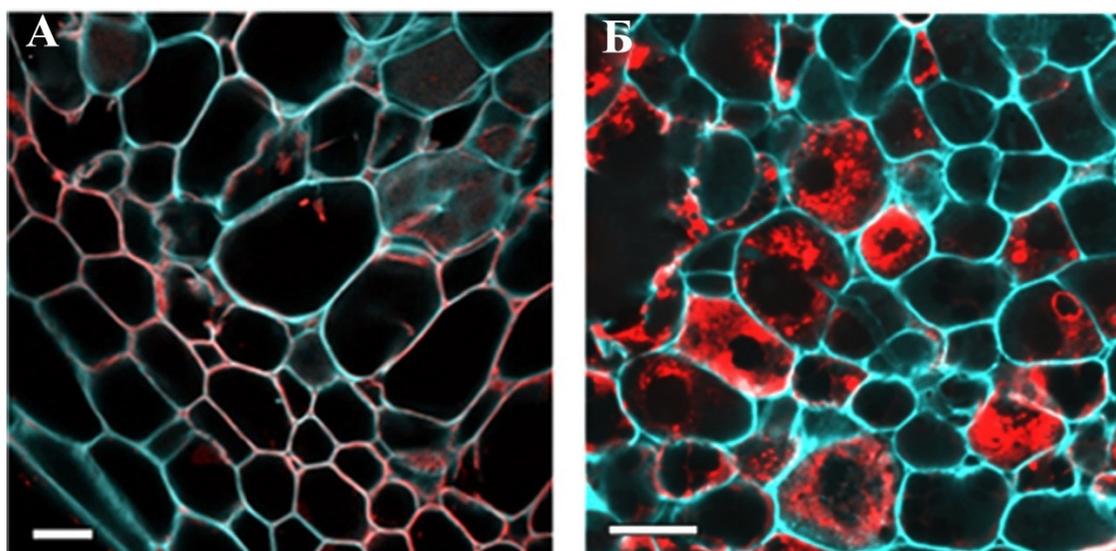


Рис. 39. Метил-эстерифицированный пектин и целлюлоза в клубеньках сои.

В трансгенных клубеньках сои, наблюдалось накопление метил-эстерифицированной формы пектина (красный флуорофор) в инфицированных клетках и в бактериальных кластерах. Распределение метки целлюлозы (синий флуорофор) не изменилось. Масштабная линейка: (А)=10μm (Б)=5μm

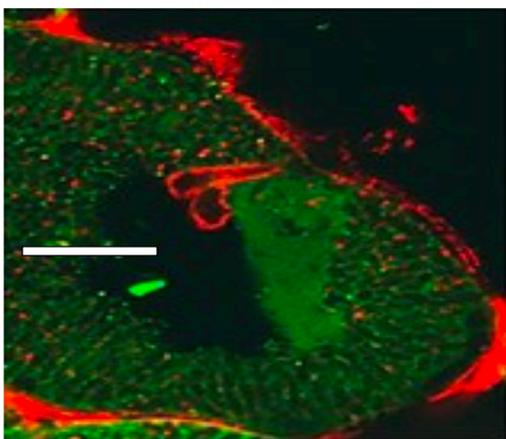
При сравнении распределения и уровня накопления в распределении каллозы и целлюлозы в контрольных клубеньках и в клубеньках трансгенных растений сои (рис.38,39) не было отмечено значительных различий. Метка каллозы была ассоциирована с клеточными стенками, также были помечены мертвые бактерии в бактериальных кластерах (Рис.38,39). Также не было отмечено значительных различий в распределении целлюлозы (Рис.39А,Б). В отличие от каллозы, целлюлоза не была найдена в бактериальных кластерах. Значительные отличия по фенотипу были отмечены в распределении пектина, для детекции которого использовали специфичные антитела, распознающие метил-эстерифицированную (LM20) и де-метил-эстерифицированную (LM19) формы пектина (Verhertbruggen *et al.*, 2009).

Метил-эстерифицированная форма пектина формируется в везикулах аппарата Гольджи и транспортируется в клеточную стенку в секреторных везикулах. После секреции он де-метируется пектиновыми метилэстеразами уже в клеточной стенке.

В контрольных клубеньках сои иммуноокрашивание выявило обе формы пектина в клеточных стенках хозяина и инфекционных нитях, но с симбиосомами была ассоциирована только метка де-метил-этерифицированной формы пектина, тогда как в трансгенных клубеньках, где экспрессия *GmVAMP721d/a* была подавлена, присутствовали обе формы пектина, как метил-этерифицированная (метка LM20) так и де-метил-этерифицированная (метка LM19), причем в трансгенных клубеньках было выявлено присутствие их в бактериальных кластерах, описанных выше.

Таким образом, ризобии в трансгенных клубеньках были погружены в матрицу, которая содержала как метил-этерифицированный, так и де-метил-этерифицированный пектин, что указывает на нарушение транспорта, таргетинга или оборота пектинов, которое является последствием частичного блокирования экспрессии *GmVAMP721d/a*. Роль пектина также была подтверждена в исследованиях ремоделирования стенок инфицированных клеток в клубеньках гороха посевного в процессе инокуляции (Tsyganova *et al.*, 2019).

Мы предположили, что везикулы *VAMP721d/a* могут транспортировать пектин в той или иной форме. Используя антитела, против метил-этерифицированного пектина (LM20) мы проанализировали возможную ко-локализацию этих меток в клубеньках сои и люцерны усеченной (Рис.40), но, по результатам анализа, ко-локализации этих антигенов не было отмечено, и был сделан вывод, что везикулы *VAMP721d/a* не транспортируют пектин.



Цветовой код: метил-этерифицированный пектин-красный, *GmVAMP721d* – зеленый.
Масштабная линейка=10µm.

Рис.40. Отсутствие ко-локализации метил - этерифицированного пектина и белка *VAMP721d* в инфицированной клетке люцерны.

Можно заключить, что везикулы, несущие VAMP721d, не транспортировали метил-эстерифицированный пектин ни в клубеньках сои, ни в клубеньках люцерны. Мы выдвинули гипотезу, что VAMP721d-позитивные везикулы могут быть вовлечены в доставку ферментов ремоделирования пектинов.

Для проверки этого предположения был выбран фермент пектат-лиаза (GmNPL1) –ген-ортолог пектат-лиазы LjNPL лядвенца (*Lotus japonicus*) (Xie *et al.*, 2012). Согласно данным литературы, пектат-лиаза LjNPL играет критическую роль в в процессе высвобождении бактерий из инфекционной нити.

После клонирования пектат-лиазы (Gavrin *et al.*, 2016), были сгенерированы трансгенные корневые клубеньки, в которых был экспрессирован этот фермент, меченый GFP.

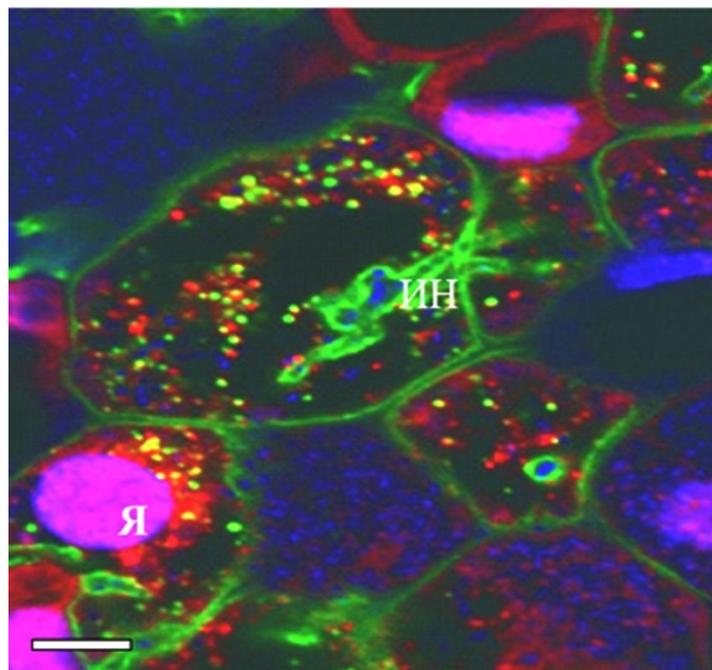


Рис. 41. Ко-локализация пектат лиазы GmNPL1 и белка VAMP721d. ИН-инфекционная нить, Я-ядро клетки. Масштабная линейка=10µm.

Ко-локализация сигнала везикул, меченых GmNPL1 (зеленый) с GmVAMP721d-позитивными везикулами (красный) (с образованием желтого комплекса), была отмечена в молодых клетках, где происходил выход бактерий из

инфекционной нити (ИН). Бактерии контрастированы DAPI (синий флуорофор). Масштабная линейка=20 μm .

Количественная оценка числа точек показала, что $39\pm 12\%$ точек, имеющих сигнал GmVAMP721d, были ко-локализованы с точками, несущими GmNPL1-GFP(A,B) – локализация пектат-лиазы в инфицированных клетках (метка красным флуорофором).

Эти результаты позволили предположить, что GmVAMP721d может участвовать в таргетировании GmNPL1 к местам высвобождения ризобий, а также к цитоплазматической мембране молодых растущих клеток (Gavrin *et al.*, 2016).

Роль пектина в клеточных стенках растений достаточно хорошо изучена. Возможность клеточной стенки к динамическому расширению в значительной степени зависит от количества и состава пектинов, что показано на таких структурах как кончики пыльцевых трубок, которые обогащены метил-эстерифицированным пектином (Bárány *et al.*, 2010). Во взрослых дифференцированных растительных клетках клеточные стенки обогащены деметил-эстерифицированным пектином, менее эластичным и более адгезивным (Bosch *et al.*, 2005, Wolf *et al.*, 2009). Дефект освобождения бактерий, который мы наблюдали в клубеньках, может быть объяснен дефектом оборота пектина, который частично присутствовал в бактериальных кластерах. Физические ограничения и нарушенные реологические характеристики матрикса бактериальных кластеров, который стал слишком адгезивным, могут объяснить наблюдаемый блок высвобождения бактерий.

Роль ферментов, участвующих в обороте пектина, может быть очень важным фактором в процессе высвобождения ризобий в симпласт клетки-хозяина. Мы обнаружили, что часть VAMP721d-позитивных везикул содержит пектат лиазу. Это позволяет предположить, что VAMP721d участвует в доставке пектат-лиазы и, возможно, других ферментов, модифицирующих клеточную стенку в процессе симбиоза (Gavrin *et al.*, 2016). Недавно наши результаты были подтверждены работой лаборатории Томаса Отта (Su *et al.*, 2023), которая показала роль специфической пектинметилэстеразы (SyPME1) и пектат-лиазы клубеньков (NPL)

в местах прохождения инфекционной нити и трансцеллюлярного перехода между клетками клубенька в процессе инфицирования. Нельзя исключить, что и другие ферменты, участвующие в повышении эластичности пектина, например, ингибиторы деметилирования или ингибиторы полимеризации пектина (Wolf *et al.*, 2012; Sénéchal *et al.*, 2014), также могут быть доставлены в клеточную стенку через везикулы VAMP721d, поэтому наблюдаемый нами фенотип в результате частичного блокирования экспрессии VAMP721d может отражать более сложную ситуацию, чем просто нехватка везикул, несущих пектат-лиазу.

Таким образом, белки группы VAMP721 необходимы для освобождения ризобий и входа бактерий в симпласт клетки-хозяина как в цилиндрических клубеньках люцерны, так и в сферических клубеньках сои. Эти белки участвуют в доставке ферментов, модифицирующих пектин, а также, возможно, и в других процессах. Роль белков группы VAMP721 в симбиозе частично связана с их участием в формировании бесстенных участков инфицированных нитей, из которых осуществляется вход ризобий в растительную клетку. Использование специализированных SNARE-белков для разграничения специального мембранного интерфейса, по-видимому, является общим механизмом в процессах взаимодействия между растениями и микробами.

3.9. Механизмы таргетированного мембранного транспорта и регуляция доступности мембранных ресурсов в инфицированной клетке

Выживание нескольких тысяч бактерий в симпласте клетки-хозяина в корневом клубеньке требует не только быстрого и эффективного расширения цитоплазматической мембраны клетки-хозяина, но и создания дополнительных ресурсов для формирования симбиосомной мембраны, которая отграничивает внутриклеточные бактерии.

Инфекционная нить, бесстенные капли, огромный объем и поверхность симбиосомного интерфейса предполагают высокую скорость динамических изменений, но также и точное перенаправление мембранных ресурсов. Бобово-ризобиальные и растительно-арбускулярные микоризные симбиозы являются

редкими примерами в растительном царстве, когда внутриклеточные микробы находятся в симпласте клетки-хозяина в течение длительных периодов, вплоть до нескольких недель. Приспособление к огромной колонии бактерий и выживание в этих условиях вызывает глубокие морфологические изменения клетки-хозяина. Во время входа инфекционной нити в клетку хозяина деление бактериальных клеток в физически ограниченном пространстве должно противодействовать тургорному давлению клетки растения-хозяина, направленному в противоположном направлении (Brewin, 2004). Появление колонии бактерий в симпласте хозяина запускает формирование специфических для симбиоза асимметричных выступов цитоплазматической мембраны: инфекционной нитей, бесстенных капель и симбиотической мембраны. Что примечательно, мембранные ресурсы в виде везикул Гольджи, везикул эндоплазматического ретикулума, а также, возможно, и другие, перенаправляются к мембранам симбиотического интерфейса со значительной точностью и своевременно. До сих пор механизмы этого перенаправления и скрупулезно точной доставки неизвестны.

Поскольку цитоплазматическая мембрана неэластична, и способна растягиваться не более чем на 3% (Arodaca, 2002), в корневом клубеньке синтез и доставка нового мембранного материала к симбиотическому интерфейсу имеет решающее значение для увеличения площади поверхности мембран инфицированной клетки. Какие механизмы и метаболические пути клетки-хозяина модифицируются в этом случае и какие сигнальные процессы задействованы для формирования синтеза клеткой-хозяином нового мембранного материала?

В животных клетках локальное увеличение напряжения мембраны за счет внешнего воздействия (давление на мембрану, прокол), включает механизмы восстановления мембраны в конкретном месте нарушения (Morris, Homann, 2001). В случае угрозы разрыва мембран происходит немедленное перенацеливание мембранных ресурсов, расположенных рядом с местом дефекта мембраны с последующим слиянием с этой мембраной для уменьшения напряжения и предотвращения разрушения клетки (Jaffe *et al.*, 2002; Telewski, 2006). Увеличение площади цитоплазматической мембраны у растений зависит от направленного

экзоцитоза, классическими примерами являются рост кончиков корневых волосков и пыльцевых трубок (Qin, Dong, 2015, Fritz *et al.*, 2024). Слияние мембран достигается благодаря действию белков t-SNAREs, находящихся на мембране, а также белков, ассоциированных с везикулами (VAMP или v-SNAREs), результатом чего является образование SNARE-комплекса. В регуляции слияния мембран задействован механизм Ca^{2+} -сигналинга, с дальнейшим ремоделированием актинового цитоскелета, в котором участвуют белки-синаптотагмины, кальциевые сенсоры. (Benavente *et al.*, 2021). Синаптотагмин арабидопсиса AtSYT1 обогащен сайтами контакта цитоплазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума (Levy *et al.*, 2015, Benavente *et al.*, 2021). Специфичная привязка везикул Гольджи к быстро растущим мембранным субкомпартментам цитоплазматической мембраны регулируется белковым комплексом экзоцист (Vukašinovic, Žárský, (2016).

Во время установления эндосимбиоза, механическое давление на цитоплазматическую мембрану растительной клетки может служить потенциальным сигналом для перенаправления мембранного траффика к месту входа бактерий (Jayaraman *et al.*, 2014). При этом рост симбиотических структур в инфицированных клетках является анизодиаметрическим для инфекционных нитей и изодиаметрическим для бесстенных капель и симбиосом. Это означает, что ресурсы мембраны поддерживают расширение мембраны вне зависимости от типа роста этой мембранной структуры.

Мы предположили, что сигналом для таргетированной доставки и изменения вектора движения мембран к симбиотическому интерфейсу, является натяжение мембраны вокруг микроколоний ризобий, входящих или находящихся в симпласте.

Для проверки этой гипотезы были выбраны гомологи кальциевых сенсоров из группы синаптотагминов: *M. truncatula MtSyt1*, гомолог *AtSYT1 A.thaliana*, который участвует в восстановлении поврежденных мембран (Schapire *et al.*, 2008, Yamazaki *et al.*, 2008), и два других гомолога *M. truncatula* с высокой экспрессией в корневых клубеньках: *MtSyt2*, *MtSyt3* (Gavrin *et al.*, 2017).

Согласно данным портала экспрессии генов в корневых клубеньках *SymbiMix* (Roux *et al.*, 2014), в геноме люцерны усеченной присутствуют три гена синаптотагминов: MtSyt1, MtSyt2, MtSyt3.

Для анализа функциональной роли синаптотагминов были созданы промотор-GUS конструкции, содержащие область 2,5 кб от начала трансляции MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3, слитую с GUS (Рис.42).

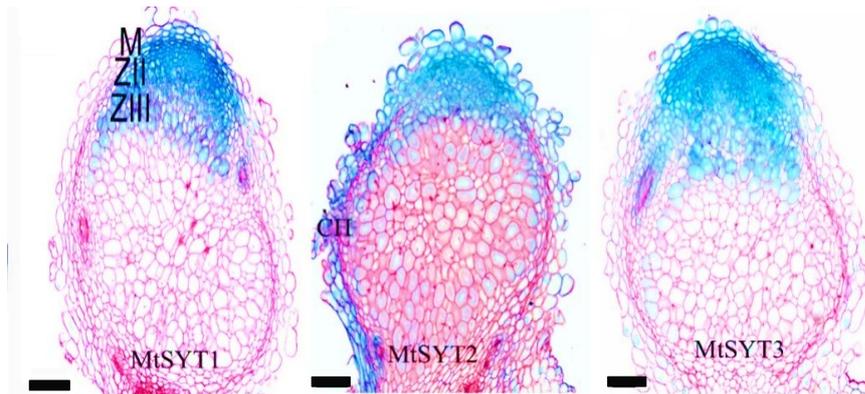


Рис. 42. Экспрессия ProMtSyt1:GUS, ProMtSyt2:GUS и ProMtSyt:GUS в клубеньках

Синаптотагмины MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3 экспрессируются в корневом клубеньке в меристеме (M), зоне инфекции (ZII), в наиболее молодых клетках зоны фиксации азота (ZIII) и в сосудистых пучках (СП). Масштабная линейка=100 μ m

При анализе экспрессии синаптотагминов в ткани клубеньков и молодых корней был отмечен высокий уровень экспрессии. (Рис.43)

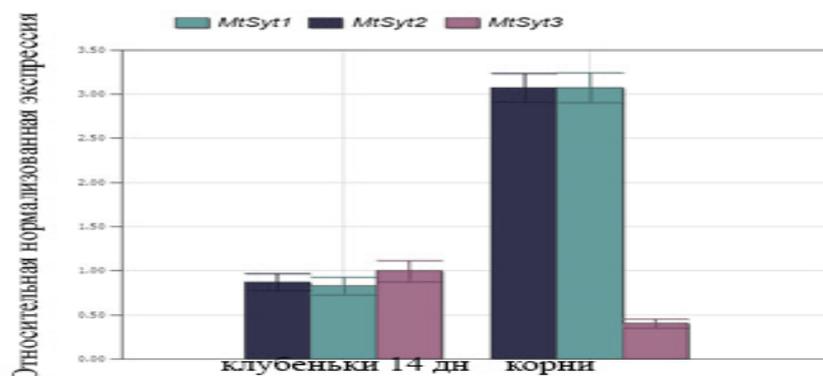
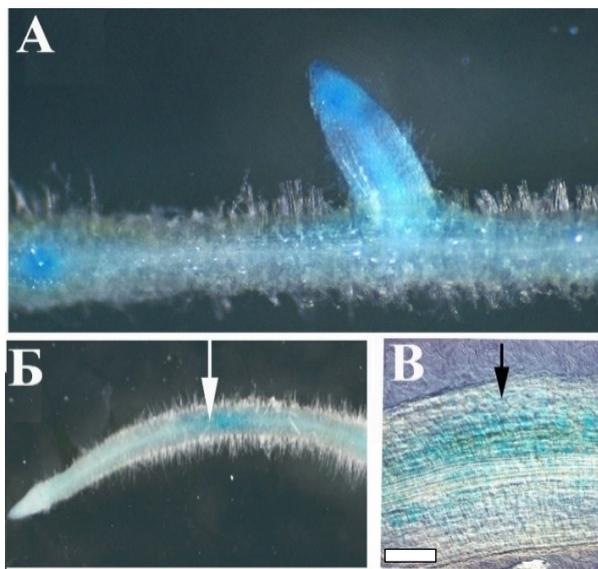


Рис. 43. Анализ экспрессии синаптотагминов в клубеньках и апикальной части корней.

Таким образом, в корневых клубеньках (Рис.42) экспрессия *ProMtSyt1:GUS*, *ProMtSyt2:GUS*, и *ProMtSyt3:GUS* была отмечена в клетках, подверженных быстрому увеличению объема: в клетках меристемы, дистальных слоях клеток зоны инфицирования, и в дистальных слоях зоны азотфиксации, где происходит быстрый рост симбиосом (Gavrin *et al.*,2017).

Чтобы проверить, может ли натяжение мембраны повлиять на экспрессию синаптоагминов в ткани трансгенных корней и клубеньков, был проведен анализ на изгиб корня (Рис.44).



Экспрессия была отмечена в меристеме корней (А,Б,В), в зоне корневых волосков (Б), при изгибе корней зона экспрессии смещалась к месту изгиба (Г,Д). Масштабная линейка=100 μm

Рис. 44. Анализ на изгиб корня, проведенный на трансгенных корнях, экспрессирующих *ProMtSyt1:GUS*

Был сделан вывод, что экспрессия синаптоагминов следует за областью корня с высоким напряжением мембраны, вызванным изгибом, поэтому созданные генетические конструкции: *ProMtSyt1:GUS*, *ProMtSyt2:GUS*, и *ProMtSyt3:GUS* дают функциональный ответ на механическую стимуляцию (Gavrin *et al.*,2017).

Клеточная локализация белков MtSyt1, MtSyt2, и MtSyt3

Для изучения внутриклеточной локализации синаптоагминов в корневых клубеньках и корнях, были использованы генетические конструкции, экспрессирующие GFP в С-концевой позиции этих генов под контролем их соответствующих 2,5 кб нативных промоторов. Для конфокальной визуализации, корни и корневые клубеньки были разрезаны продольно и зафиксированы согласно

методике, описанной в Методах. (Рис.45А). Конфокальная микроскопия ткани показала, что GFP-меченные белки ProMtSyt1:MtSyt1-GFP, ProMtSyt2:MtSyt2-GFP ProMtSyt3:MtSyt3-GFP локально накапливались в меристеме корней (Рис.45А).

В клетках корня сигнал синаптоагмина был довольно интенсивен в новообразованной клеточной стенке разделившихся клетках меристемы (Рис.45А (*)).

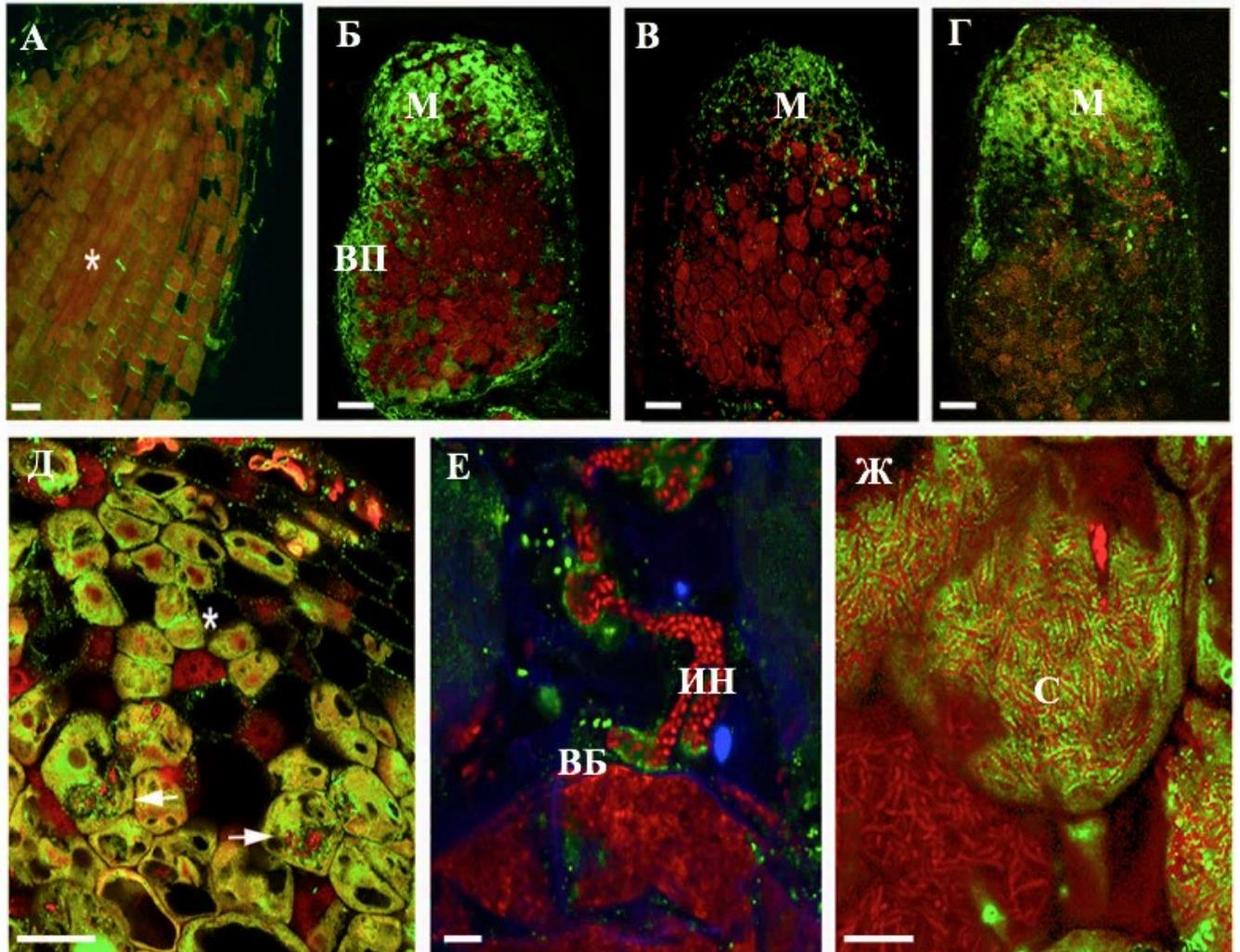


Рис. 45. Распределение белков синаптоагминов в корне и корневом клубеньке методом иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии Цветовой код: синаптоагмины: зеленая флуоресценция, ризобии и ядра клетки-хозяина: красная флуоресценция. СП - сосудистый пучок; ВБ- выход бактерий; ИН - инфекционная нить; М - меристема; С – симбиосомы. (А). В корневых клубеньках иммуносигнал ProMtSyt1:MtSyt1-GFP, ProMtSyt2:MtSyt2-GFP и ProMtSyt3:MtSyt3-GFP присутствовал в апикальной части клубенька: в меристеме, зоне инфекции и

проксимальных клеточных слоях зоны фиксации и в сосудистых пучках (Рис. 45Б,В,Г). На клеточном уровне сигнал синаптоагминов был связан с новообразованными клеточными стенками в меристеме корня и клубенька (А,Б,В,Д) (*), с инфекционными нитями/бесстенными каплями на месте выхода бактерий (Е), и с симбиосомами для одного из гомологов - ProMtSyt1:MtSyt1-GFP (З); симбиосомы, меченные ProMtSyt1:MtSyt1-GFP(Ж). Масштабная линейка= (А-Г) 100 μm , (Д) 25 μm , (Е) 5 μm , (Ж)10 μm .

Функциональный анализ с использованием блокирования экспрессии MtSyt1/MtSyt3 и MtSyt2/MtSyt3

Поскольку мутации в случае таких генов как синаптоагмины, которые представляют собой гены домашнего хозяйства, может негативно влиять на развитие всего растения, для функционального анализа методом РНК-интерференции мы использовали промотор Enod12, что блокировало экспрессию только в молодых инфицированных клетках (Gavrin *et al.*,2017).

Для анализа были созданы генетические конструкции, в которых блокировалась экспрессия двух генов одновременно: MtSyt1/MtSyt3 и MtSyt2/MtSyt3 под промотором гена ENOD12. (Рис.46).

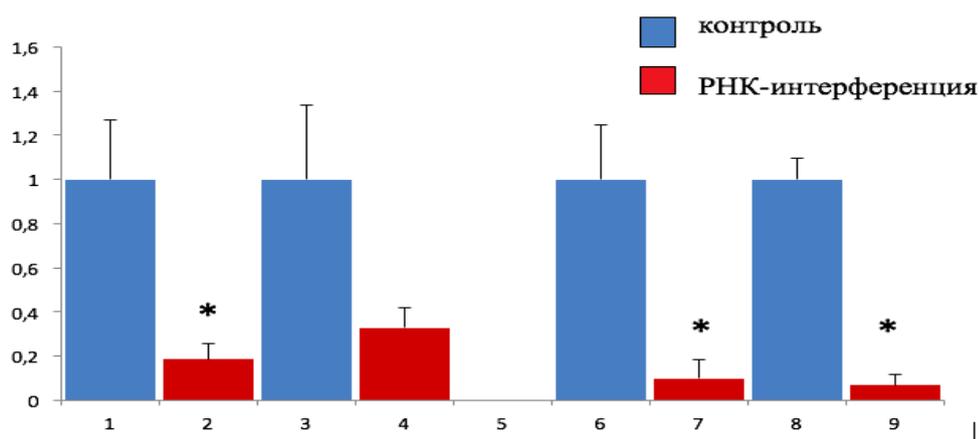


Рис.46. Уровень блокирования экспрессии для MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3, оцененный с помощью q-PCR анализа трансгенных клубеньков с двойным нокдауном. Разница достоверна ($P \ll 0.05$ (*), T-test).

Таким образом, экспрессия была частично блокирована в трансгенных корневых клубеньках, полученных на корнях, несущих конструкции

ProENOD12:MtSyt1/MtSyt3 и ProENOD12:MtSyt2/MtSyt3. Анализ клубеньков показал, что трансгенные клубеньки были меньше в размере и малочисленны: $2,81 \pm 1,65$ на растение против $5,32 \pm 1,91$ в контроле, анатомически они имели специфичный фенотип, который указывал на дефекты инфицирования клеток и развития зрелых азотфиксирующих клеток.

Было проведено цитологическое исследование анатомии клубеньков с пониженной экспрессией MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3 в сравнении с контрольными для сравнения числа клеточных слоев в различных зонах клубеньков в контрольных и клубеньках с РНК-интерференцией с использованием статистического анализа, Т-тест использовался для оценки достоверности сравниваемых выборок ($P \ll 0,05$).

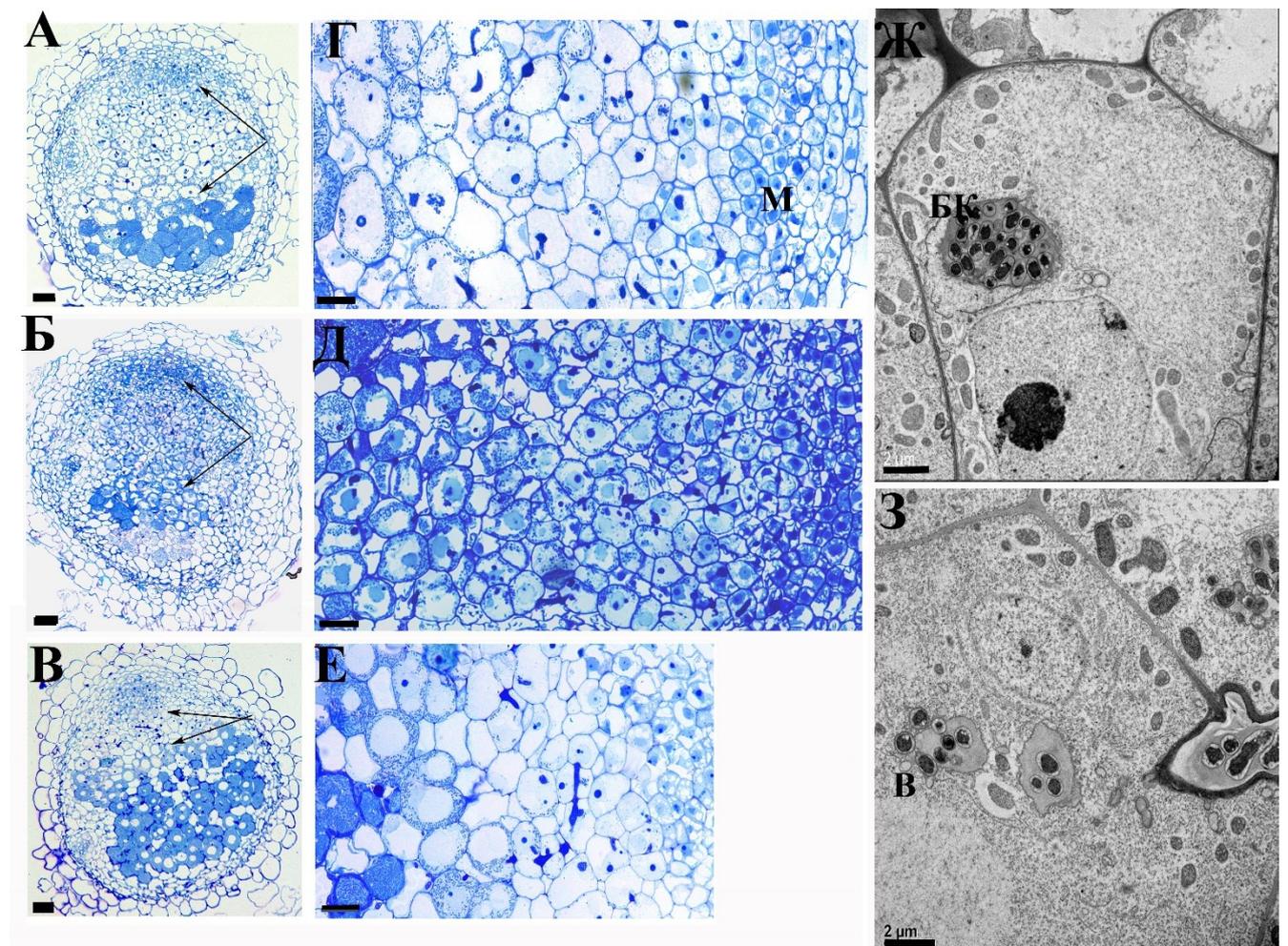


Рис. 47. Фенотип корневых клубеньков при частичном блокировании экспрессии генов MtSyt1/MtSyt3. А,Б,В,Г,Д,Е,-световая микроскопия, Ж,З:электронная микроскопия, (А,Г):ProENOD12:MtSyt1/MtSyt3, (Б,Д): ProENOD12:MtSyt2/MtSyt3, (В,Е):контроль. (Ж)-ультраструктура клеток клубеньков ProENOD12:MtSyt1/MtSyt3, с частичным блокированием экспрессии. Двойные

стрелки показывают размер зоны инфицирования. (Ж) В случае блокирования экспрессии выхода бактерий из бесстенной капли не происходит. (З) Контрольные клубеньки, инфекционная нить и выход бактерий из бесстенной капли (В). Масштабная линейка: А,Б,В= 50 μm ; Г,Д,Е = 25 μm , Ж,З=2 μm

В случае двойного нокдауна колонизация инфицированных клеток была замедлена и занимала до 12 клеточных слоев по сравнению с 3-5 в контроле (Рис. 47А,Б в сравнении с Рис. 47В).

Таким образом, особенностями фенотипа клубеньков с двойным нокдауном синаптоагминов были короткая меристема, расширенная зона инфекции, которая включала до 12 клеточных слоев, в сравнении с контрольными клубеньками, где эта зона содержит 3-5 слоев, и уменьшенная или отсутствующая зона азотфиксации (рис. 47А,Б против рис. 47В).

Частичное блокирование выхода ризобий в клетку растения-хозяина приводило к тому, что количество бактерий в инфицированных клетках было незначительным, и полная колонизация клетки-хозяина не происходила. Электронно-микроскопический анализ этих клубеньков показал, что инфицированные клетки содержали бесстенные капли, но освобождения бактерий было затруднено (рис. 47Ж).

Можно заключить, что блокирование экспрессии двух генов MtSyt1/MtSyt3 и MtSyt2/MtSyt3 негативно влияло на развитие меристемы клубенька, рост инфицированных клеток, вызвало затруднение с высвобождением бактерий из бесстенных капель, и ингибирование развития симбиосом.

Исследование распределения синаптоагмина в клетках (Рис.48), было выполнено методом иммуноцитохимии с использованием метки коллоидным золотом(Рис.48).

Анализ показал (Рис.48), что белок был ассоциирован с мембраной молодых симбиосом и мембранами эндоплазматического ретикулума (А). Также сигнал отмечался на цитоплазматической мембране (Б).

Можно заключить, что для формирования и поддержания роста внутриклеточной бактериальной колонии ризобий, необходимы действующие механизмы перенаправления мембранного траффика к симбиосомному

интерфейсу. Растяжение мембран симбиотического мембранного интерфейса в инфицированных клетках детектируется клеткой как абиотический стресс.

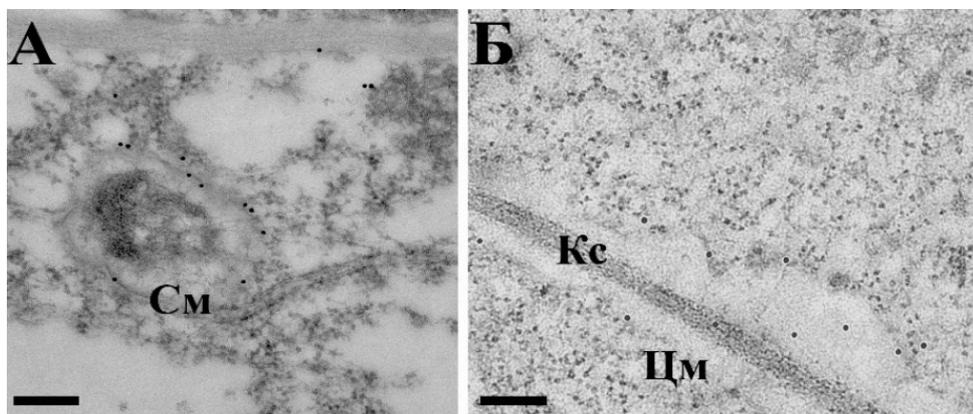


Рис. 48. Электронно-микроскопический иммуноанализ распределения синаптотагмина в клетках корневого клубенька. Симбиосома (См), цитоплазматическая мембрана (Цм). КС-клеточная стенка. Масштабная линейка: А = 200 nm, Б = 500 nm

Таргетирование этого траффика зависит от направленного экзоцитоза, в регуляция которого участвуют кальциевые сенсоры из группы синаптотагминов, отвечающих за детекцию нарушения и избыточного растяжения мембран.

Данная конфигурация кальциевого сигналинга в корневом клубеньке не является "симбиотической" функцией, скорее всего, она отражает необходимость поддержания структуры мембран и жизнедеятельности клетки-хозяина, то есть является ответом на стресс, вызываемый появлением и размножением бактерий в симпласте, напряжением мембран клетки, как и в других случаях контакта с микроорганизмами. Например, паттерн локализации гомолога синаптотагмина *Nicotiana benthamiana* на мембране, обволакивающей гаусторий, образованный паразитом *Phytophthora ainfestans*, был очень схож с паттерном распределения синаптотагминов, наблюдаемого в наших исследованиях (Lu *et al.*, 2012; Vozkurt *et al.*, 2014). Синаптотагмины могут создавать функциональные домены на мембране симбиосомы, облегчающие слияние с везикулами Гольджи и цистернами эндоплазматического ретикулума, обеспечивая рост симбиосом, поскольку они

регулируют не только процесс и направление экзоцитоза, но и осуществляют связь эндоплазматического ретикулума и цитоплазматической мембраны. Рост симбиосом зависит от таргетирования мембранных ресурсов эндоплазматического ретикулума к симбиосомам и бесстенным каплям.

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

Эффективный азотфиксирующий симбиоз невозможен без изменения эндомембран инфицированной клетки (Fedorova, 2023). Одним из важнейших результатов этого процесса является формирование мембранного интерфейса между клеткой растения-хозяина и бактерией.

Основными источниками мембран в этом случае являются цитоплазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум (ЭР) и везикулы Гольджи. Контакты мембран симбиосом и их слияние с ЭР и везикулами Гольджи хорошо документированы (Roth, Stacey, 1989; Coba de la Peña, 2018, Gavrin *et al*, 2015), Рис.49). В клетках корневых клубеньков обильные трубчатые каналы в молодых инфицированных клетках были обнаружены более 30 лет назад и хорошо описаны (Roth, Stacey, 1989, Coba de la Peña, 2018) как типичный фенотип молодых инфицированных клеток.

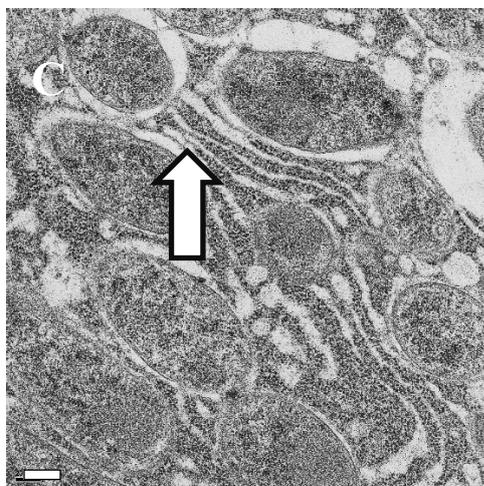


Рис. 49. ЭР в инфицированной клетке, слияние с симбиосомой(стрелка)

Масштабная линейка=200 nm

При контакте ЭР с симбиосомами (См), слияние с симбиосомной мембраной происходит после расширения канала эндоплазматического ретикулума (ЭР) и образования везикул, которые сливаются с мембраной (стрелка).

Когда был замечен этот феномен, было сформулировано объяснение, что клетка-хозяин при формировании симбиотических отношений продуцирует мембранный материал для симбиосом с целью поддержки симбиоза (Roth, Stacey, 1989).

Открытым остается вопрос, какие молекулярные механизмы клетки-хозяина участвуют в стимуляции синтеза огромного объема мембран ЭР в инфицированных клетках клубеньков разных видов, ведь в неинфицированных клетках клубеньков подобных событий не происходит. При этом молекулярные механизмы этого процесса, динамики расширения мембраны, и, самое главное, механизмы индукции огромного объема мембран ЭР в инфицированной клетке, неизвестны.

ЭР является основным клеточным компартментом для биосинтеза большинства трансмембранных и секретируемых белков. Однако различные стрессовые условия могут нарушать эти процессы, вызывая накопление поврежденных или неправильно сформированных белков в просвете ЭР, изменяя пространственную конфигурацию и структуру, вызывая реакцию, которая получила название «стресс ЭР». Такие условия вызывают активацию ответа на разворачивание белка (UPR) и последовательно вызывают индукцию путей деградации белков и процесса автофагии (Ridge *et al.*, 1999, Sackmann, 2014). UPR запускается при стрессе ЭР трансмембранным сенсором ЭР - инозитол-требующим ферментом (IRE1). IRE1 воспринимает стресс ЭР через свой люминальный сенсорный домен в ЭР, что индуцирует UPR (Henriquez-Valencia *et al.*, 2015, Basso *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2023).

Одной из реакций клетки на стресс являются структурные изменения морфологии ЭР, в ряде случаев выраженные в увеличении объема производимого в клетке ЭР (Read *et al.*, 2021, Li *et al.*, 2021, Zhang *et al.*, 2012).

Высокая экспрессия некоторых белков-резидентов мембраны ЭР, таких как 3-гидрокси-3-метилглутарил (HMG)-КоА редуктаза 1 (Hmp1p), также вызывает

стресс ЭР, о котором сообщали Zhang *et al.* 2012, и создает фенотип под названием «кармелла», характеризующийся избыточным синтезом мембран ЭР, сходный с фенотипом, показанным на Рис.49.

Поскольку именно ЭР создает основной ресурс для роста мембран симбиосом (Roth, Stacey, 1989, Tsyganova, Tsyganov, 2019), наличие разветвленной сети ЭР может давать преимущество и определять скорость процесса формирования симбиосомной мембраны и эффективность симбиоза. Является ли наличие разветвленной сети ЭР в инфицированных клетках последствием стрессового состояния клеток клубенька, а также возможной индукции специфического стресса ЭР? Возможно ли наличие субоптимальных, стрессовых условий в инфицированных клетках?

Согласно данным анализа с использованием портала экспрессии генов в клубеньке люцерны усеченной *Symbimix* (Roux *et al.*, 2014), в клетках клубенька отмечена дифференцированная по зонам развития экспрессия генов, отвечающих на дефицит сахаров, и недостаток азота (Таблица 1) (Semenova *et al.*, 2024).

В таблице 1 показана динамика экспрессии генов-сенсоров доступности углеводов и азота в зонах развития корневого клубенька *M.truncatula* по зонам развития симбиоза (F1, FII_d, FII_p-апикальные слои клубенька до начала инфицирования клеток, IZ-зона начала проникновения ризобий в клетки, ZIII–молодые клетки зоны азотфиксации). Так, экспрессия гена TORC, сенсора углеводного дефицита, и в то же время негативного регулятора аутофагии (Dobrenel *et al.*, 2016, Nanjareddy *et al.*, 2016) была повышена в зоне азотфиксации (таблица 1). При активации в благоприятных условиях, TORC стимулирует анаболические процессы, такие как транскрипция и трансляция мРНК, в неблагоприятных условиях, его активация приводит к индукции аутофагии, старения и стрессовых реакций. Экспрессия гена SnF (Rodrigues *et al.*, 2013), который индуцируется при дефиците сахаров, также была высокой в зоне азотфиксации, когда происходит переход от сахаров к дикарбоновым кислотам в качестве основного источника углерода для азотфиксирующих бактериоидов (Ogden *et al.*, 2016). Этот переход может отражать реакцию клеток клубеньков на нехватку

доступных сахаров, возникающую вследствие роста бактериальной колонии в инфицированных клетках.

Таблица 1. Анализ экспрессии генов-сенсоров доступности углерода и азота по зонам развития корневого клубенька.

Ген	№ NSBI/ symbimix	Функции	Уровень экспрессии				
			FI	FIId	FII p	IZ	ZIII
TORC	NC_053048.1 Mt0026_10261	Сенсор углеводного дефицита	15	14	18	19	33
Beclin1	NC_053044.1 Mt0017_00537	Сенсор достаточности энергии, позитивный регулятор автофагии	14	11	23	18	33
SnF	NC_053047.1 Mt0025_10284	Регулирует метаболизм и транскрипцию в ответ на энергетическое голодание и подачу сигнала АВА и инактивируется сахарами, при восстановлении энергетического баланса	13	13	14	23	38
Dhh1		Dhh1 в условиях азотного голодания регулирует трансляцию мРНК генов автофагии ATG1 и ATG13	18	15	17	22	24
SOC1	Mt0001_01425	Регулятор ответа на голодание, повышение уровня экспрессии которого приводит к активизации процесса автофагии	55	12	7	12	14
NAC1	Mt0003_11375	Реакция на дефицита азота,абиотический стресс	45	37	0	11	6

Он также указывает на неравномерное распределение сахаров между макро- и микросимбионтом. Экспрессия гена SOC1 (Rodrigues *et al.*, 2013) была повышена

в зоне меристемы, что также может указывать на неоптимальный доступ к углеводам и в этой зоне клубеньков.

Ген *Dhh1* (Liu *et al.*, 2019), повышение экспрессии которого регулирует защиту клетки в условиях азотного голодания, экспрессировался во всех зонах корневых клубеньков, включая зону азотфиксации (зону III), что указывает на неоптимальное снабжение клеток этой зоны азотом, что кажется парадоксальным в азотфиксирующем клубеньке.

При этом в зоне азотфиксации отмечался высокий уровень экспрессии гена *NAC1* (Wen *et al.*, 2022), который также участвует в ответе на дефицит азота. Также следует указать на частичную гипоксию в центральной части клубенька, возможны и другие негативные факторы, которые пока не идентифицированы. Динамика индукции генов, отвечающих на стрессы, позволяет диагностировать субоптимальный доступ к сахарам и азоту в тканях клубенька.

С целью диагностики возможной индукции формирования мембран ЭР как последствия ЭР стресса в клубеньках, мы провели *in silico* анализ экспрессии генов, которые вовлечены в изменение конфигурации мембран ЭР в растительной клетке в ответ на изменения условий окружающей среды, а именно генов стресса ЭР (Semenova *et al.*, 2024). Анализ *in silico* был проведен с использованием базы данных экспрессии генов в корневом клубеньке *Symbimics* (Roux *et al.* 2014). Для диагностики наличия стресса эндоплазматического ретикулаума (ER-стресса) в зонах развития корневых клубеньков, мы выбрали маркерные гены ER-стресса (таблица 2). Для анализа *in silico* было выбрано несколько генов, с подтвержденной функцией и изменением уровня экспрессии в случае ER-стресса (Таблица 2). В таблице 2 показана экспрессия генов ER стресса, в зонах развития симбиоза (F1, FII_d, FIII_p-апикальные слои клубенька до начала инфицирования клеток, IZ-зона начала проникновения ризобий в клетки, ZIII – молодые клетки зоны азотфиксации). Повышенный уровень экспрессии был отмечен в молодых клетках клубенька в зоне перед началом инфицирования, в зоне инфицирования, а также в зоне роста и пролиферации (Таблица 2).

Таблица 2. Гены ER стресса, которые экспрессируются в клубеньках *M.truncatula* в зонах развития симбиоза.

Название гена	Номер	Функции	Экспрессия (%)				
			FI	FIId	FIIp	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 оверэкспрессии).	44	32	12	3	8

Достаточно высокий уровень экспрессии в межзональном пространстве II/III и зоне III был обнаружен для гена ответа на ER-стресс IRE1, трансмембранного сенсора, индуцируемого при ЭР стрессе (Read *et al.*, 2019, Schröder, 2021, Li, Howell, 2021), также высоко экспрессировались VIP3 (Henriquez-Valencia *et al.*, 2015), Bag7, BCL-2 (Li, Howell, 2021), а также ген Hmg1p, предполагаемый ген Karmella в геноме люцерны усеченной (Zhang *et al.*, 2012).

Распределение высокоэкспрессируемых генов ответана ЭР стресс по зонам развития корневого клубенька указывает на то, что условия для индукции генов ER-стресса создаются во всех зонах клубенька.

Дальнейшее исследование в этой области может позволить модерацию синтеза мембран ЭР, а также контроль над формированием симбиотического интерфейса (Semenova *et al.*, 2024).

Можно заключить, что доступность сахаров и энергии, а также азота в корневом клубеньке не является оптимальной, о чем свидетельствует экспрессия ряда генов, модулирующих ответ на недостаток сахаров, энергии и азота. К

особенностям тканей корневого клубенька также следует отнести гипоксию инфицированных клеток. Экспрессия генов ответа на ЭР стресс была отмечена в зонах развития клубенька, включая экспрессию гена *Hmg1p*, который влияет на реформирование мембран эндоплазматического ретикулума (Semenova *et al.*, 2024).

Таким образом, натяжение мембран, создаваемое расширяющимся в процессе пролиферации и роста микросимбионтом, формирует вектор для направленного движения мембранных ресурсов к симбиосомам и бесстенным каплям. Локальное накопление белков синаптотагминов (раздел 3.9) на мембране, окружающей увеличивающуюся колонию бактерий, или симбиосому, представляет собой функциональную субкомпартментализацию мембраны, и делает мембранные ресурсы эндоплазматического ретикулума доступными для использования при росте мембран симбиосом. Белки группы синаптотагминов в этой ситуации служат "маяками" для векторного мембранного транспорта.

Экспрессия генов ответа на ЭР стресс была отмечена в зонах развития клубенька, включая экспрессию гена *Hmg1p*, который влияет на реформирование мембран эндоплазматического ретикулума. Поскольку синтез значительного объема мембран ЭР является необходимым условием для формирования симбиотического интерфейса, индукция генов ЭР стресса может быть одним из путей стимуляции избыточной продукции этих мембран.

3.11. Молекулярные механизмы модификации цитоскелета в процессе развития симбиоза

Внутриклеточная архитектура растительных клеток в значительной степени основана на функционировании цитоскелета клетки-хозяина, формируемого из актиновых микрофиламентов и тубулиновых микротрубочек.

Цитоскелет координирует ряд клеточных действий, включая деление клеток, изменение их формы, внутриклеточный транспорт и дифференцировку клеток. Цитоскелет также пространственно организует органеллы и служит каркасом для их перемещения (Hashimoto, 2003).

Актиновый цитоскелет и связанные с ним элементы служат ключевыми мишенями во многих событиях в растениях, а также передают сигнальную информацию. Кроме того, цитоскелет растений играет важную роль в опосредовании клеточного ответа на патогены и симбионты (Takemoto, Hardham, 2004).

Перестройка элементов цитоскелета клетки-хозяина после инфицирования ризобиями была описана на разных стадиях развития клубенька (Timmers, 2008, Takemoto, Hardham, 2004, Fedorova *et al.*, 2007, Gavrin *et al.*, 2015 Hlaváčková *et al.*, 2023, Kitaeva *et al.*, 2016, 2021, 2022, Sinha *et al.*, 2024), но молекулярные механизмы этих изменений нуждаются в дальнейшем изучении.

С целью выяснения роли цитоскелета клетки-хозяина в поддержании инфицированной клетки и внутриклеточной колонии азотфиксирующих бактерий, нами были исследованы молекулярные механизмы регуляции формирования актинового цитоскелета в клетках клубенька.

Актиновые волокна в растительных клетках дают возможность к позиционированию органелл, что влияет на форму клеток, а также обеспечивает динамическую часть транспорта мембранных везикул (Whitehead *et al.* 1998, Pollard, Cooper, 2009). Изменение конфигурации актинового цитоскелета зависит от динамики сборки и роста актиновых волокон, что, в свою очередь, опосредуется механизмами полимеризации актина (Avisar *et al.* 2009). Мономер актина (глобулярный G-актин) встраивается в новообразованные участки полимеризованных волокон с характерной архитектурой и полярностью. Стадия ограничения скорости полимеризации является основой для создания участков тримерного актина, где начинается формирование новых микрофиламентов.

Два комплекса регулируют процесс роста микрофиламентов, это белки группы формина и комплекса связанных с актином белков 2 и 3 (ARP2/3) комплекс (Pollard *et al.*, 2007, Aspenstrom, 2010). Образование прямых актиновых микрофиламентов *de novo* в основном зависит от формина (Aspenstrom, 2010), а комплекс ARP2/3 создает точки формирования разветвленных сетей микрофиламентов (Pollard *et al.*, 2007).

Комплекс ARP2/3 состоит из семи субъединиц, два родственных актину белка, ARP2 и ARP3, которые стабилизируются пятью другим субъединицами: ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4 и ARPC5 (Campellone, Welch 2010).

Поскольку для энтеропатогенных бактерий в клетках животных, эффективна стратегия перехода к внутриклеточной форме существования через манипулирование сетью актиновых микрофиламентов клетки-хозяина через ARP2/3 комплекс (Welch, Way 2013), мы предположили, что подобные механизмы могут быть задействованы и при формировании инфицированных клеток (Gavrin *et al.*, 2015).

Роль актина в симбиозе в основном изучалась на ранних стадиях развития, так было показано влияние факторов нодуляции на распределение актиновых филаментов в корневых волосках (Timmers, 2008), также была показана важность комплекса SCAR/WAVE на рост инфекционной нити (Miyahara *et al.* 2010).

Молекулярные механизмы реформации актина непосредственно в инфицированных клетках не исследовались, хотя изменения в организации микрофиламентов в инфицированных клетках корневых клубеньков были описаны в деталях (Davidson, Newcomb 2001; Fedorova *et al.*, 2007).

Для выяснения роли актинового цитоскелета на стадии роста симбиосом, было исследовано распределение актиновых микрофиламентов в процессе развития инфицированной клетки корневого клубенька *M.truncatula* (Gavrin *et al.*, 2015). Срезы корневых клубеньков инкубировали со специфичным для актина красителем фаллоидином, и анализировали с помощью конфокальной микроскопии (Рис.50). Меристема корневого клубенька демонстрировала типичную конфигурацию актина клеток меристемы (Рис.50А), в интерфазных клетках отмечалась тонкая сеть F-актина в коре и радиальная сеть актиновых кабелей, вокруг ядра, при делении клеток актин был ассоциирован с веретеном деления и новообразованной клеточной стенкой (Рис. 50А, (*)). В дифференцированных неинфицированных клетках актиновые филаменты располагались в цитоплазме, были отмечены трансвакуолярные микрофиламенты,

которые соединяют перинуклеарную и кортикальную цитоплазму (Ketelaar *et al.* 2010), которые формировали сеть вокруг ядра (стрелка) (рис. 50Б).

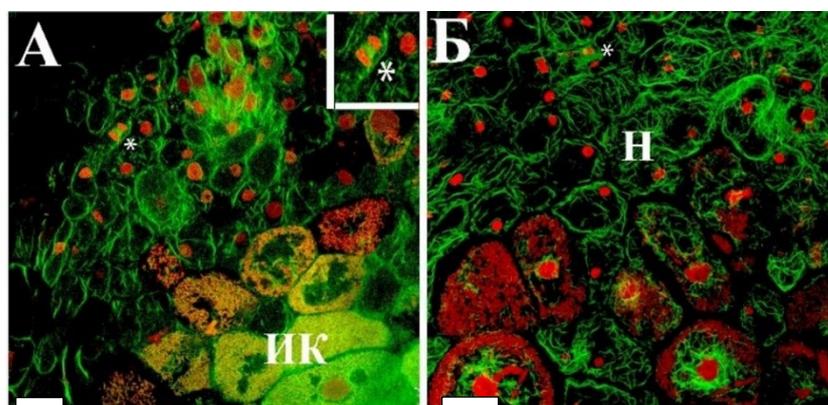


Рис. 50. Расположение актиновых микрофиламентов в клубеньке в процессе развития симбиоза. Масштабная линейка=20μm

На более поздних стадиях симбиоза в зрелых клетках, содержащих растущие симбиосомы, наблюдалось формирование сети тонких актиновых волокон вокруг симбиосом (рис.50А,Б).

Для выяснения механизмов изменения конфигурации актиновых микрофиламентов в инфицированных клетках и роли этого процесса для развития и поддержания бактериальной колонии, была исследована функциональная роль гена *ARP3*, как важного компонента в процессе роста индивидуальных филаментов и сети актина в корневых клубеньках *M.truncatula* (Gavrin *et al.*, 2015).

Для диагностики процесса мы исследовали субъединицу комплекса *ARP3*, единственного гена *ARP3 M.truncatula* (Medtr8g089630.1).

Данные по экспрессии гена в зонах развития клубенька базы данных *Symbimix* подтвердило достоверное повышение экспрессии по мере созревания клубеньков (Рис.51), что указывает на роль этого гена на стадии зрелых инфицированных клеток.

Сходная динамика также была отмечена при сравнении экспрессии гена *ARP3* в клубеньках разного возраста (Рис.52).

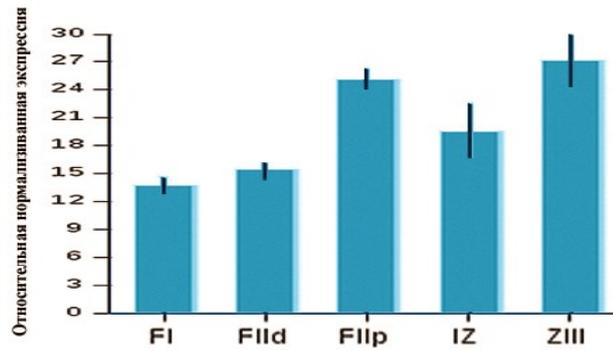


Рис. 51. Экспрессия гена ARP3 по зонам развития клубенька

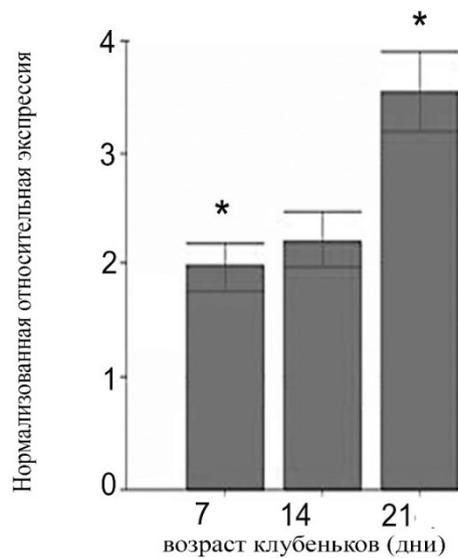


Рис. 52. ПЦР анализ экспрессии гена ARP3 в клубеньках разного возраста

Для исследования клеточной локализации ARP3 был создан генетический конструкт, содержащий ARP3 в позиции N-концевого слияния с зеленым флуоресцентным белком GFP под регуляцией промотора легемоглобина (Lb), который активен только в инфицированных клетках. GFP-ARP3-экспрессирующие клубеньки были проанализированы с использованием конфокальной микроскопии (рис.53). Иммуноцитологический анализ с использованием конфокального микроскопа показал, что сигнал GFP-меченого ARP3 находится в зрелых инфицированных клетках (ИК) и располагается в цитоплазме клетки-хозяина, флуоресцентный сигнал GFP в виде точек также был отмечен на цитоплазматической мембране.

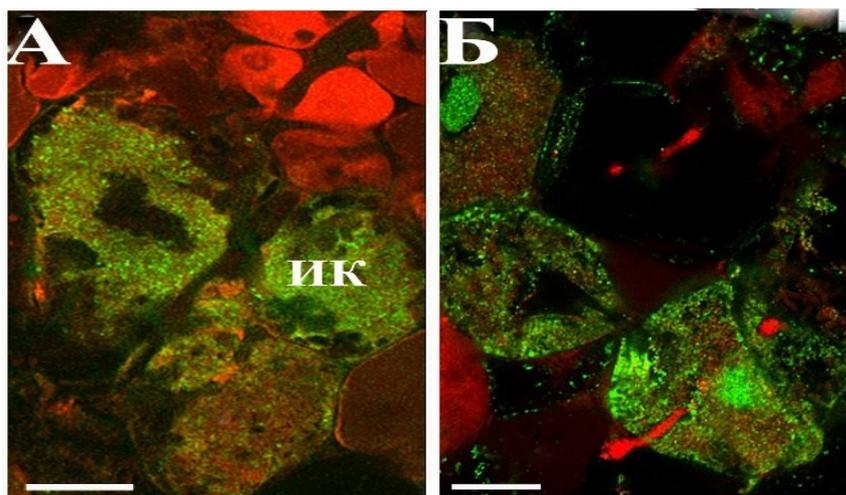


Рис. 53. Распределение белка ARP3 в инфицированной клетке.

(А)- белок выявлен антителами против GFP, (Б) – белок выявлен антителами против ARP3, мечеными зеленым флуорофором Alexa488. Масштабная линейка= 100µm

С целью изучения расположения ARP3 по отношению к актиновым волокнам и внутриклеточным мембранам в высоком разрешении, мы использовали метку коллоидным золотом и электронную микроскопию клубеньков, экспрессирующих GFP-ARP3.

Для детекции актина использовали коммерческие антитела против актина, полученные при иммунизации мышей, и метку коллоидным золотом размером 10нм.

Для иммунолокализации ARP3 использовали антитела анти-GFP, выработанные при иммунизации кролика и вторичные антитела, меченые 15-нм золотыми частицами. (Рис 54). Иммунолокализация ARP3 и актина была выполнены методом электронной микроскопии с использованием коллоидного золота. Частицы коллоидного золота, маркирующие белок ARP3 и актин были отмечены также на мембранах небольших вакуолей (Вак) и эндосом (Эн) (рис.54 В,Г). Распределение волокон актина, меченого коллоидным золотом, показало, что метка расположена на филаментах, включая филаменты, которые растут и расходятся от точки, расположенной на симбиосомной мембране (Рис.54Б).

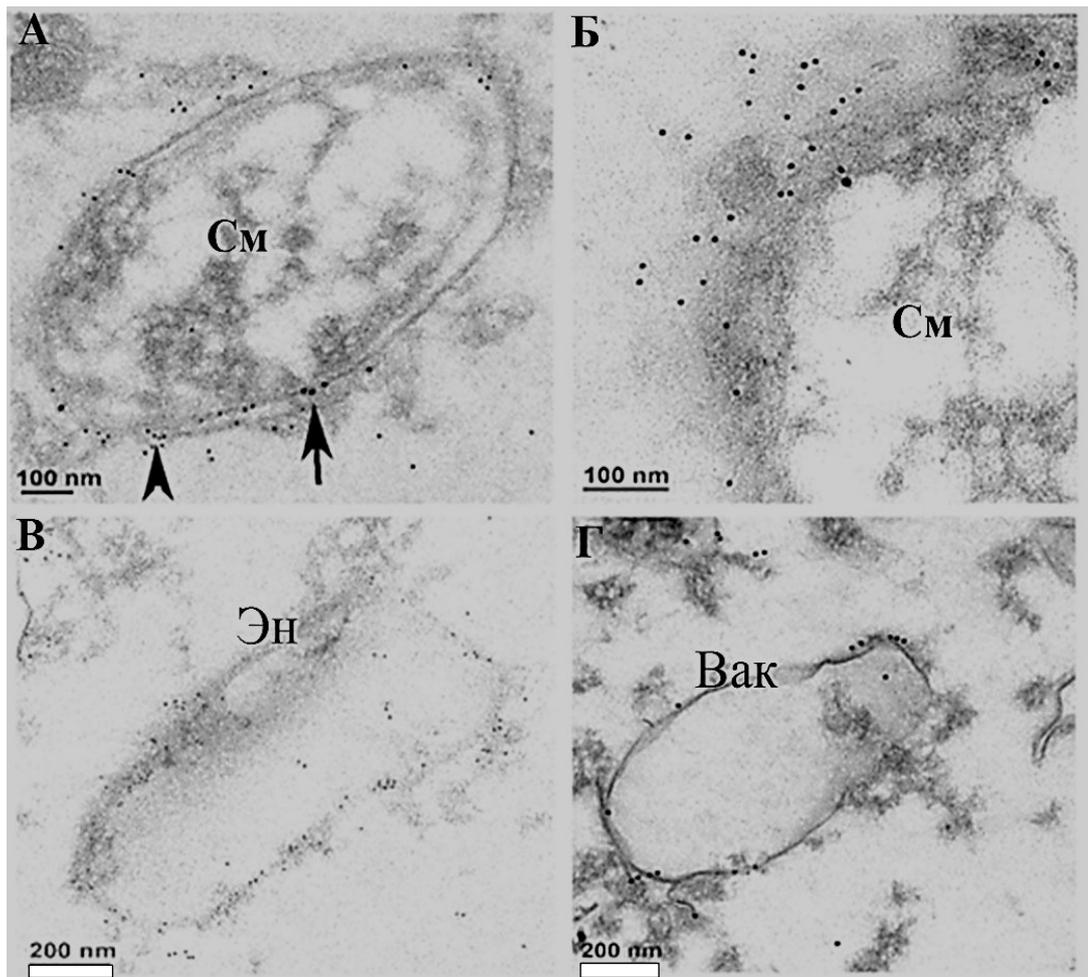


Рис. 54. Распределение белка ARP3 и актина в клетках клубенька.

Для белка ARP3 были использованы частицы коллоидного золота размеров 15-нм, (стрелка), а для актина использовали частицы коллоидного золота 10-нм, (наконечник стрелки). Как актин, так и ARP3 присутствовали в цитоплазме клетки и на мембранах симбиосом (рис. 54 А,Б). Масштабная линейка:

А,Б=100nm,В,Г=200nm

В инфицированных клетках, ARP3 белок и актин были пространственно связаны с мембранами симбиосом. Таким образом, можно сделать вывод, что существует опосредованная связь наличия белка ARP3 на мембранах симбиосом с созреванием симбиосом и их ростом. Расположение метки на мембранах эндосом и молодых вакуолей указывает на то, что симбиосомная мембрана идентифицируется клеткой растения-хозяина как мембрана эндосомы или вакуоли, что было отмечено выше.

Для уточнения связи между этапом развития симбиосомы и распределением ARP3, мы использовали частичное блокирование экспрессии гена методом РНК-интерференции (Рис.55).

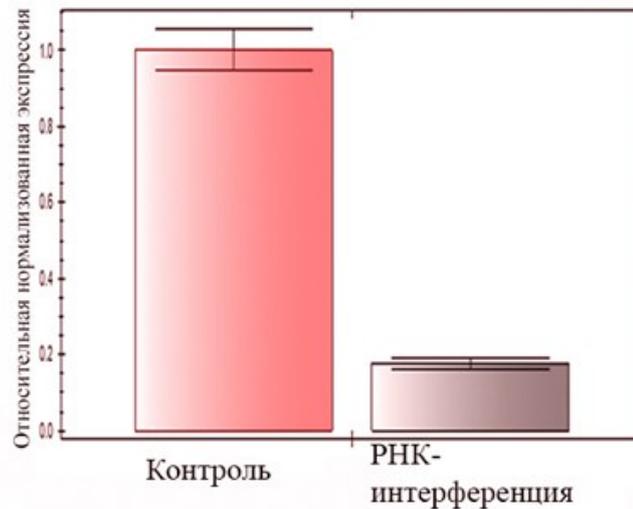


Рис. 55. Анализ ПЦР по уровню экспрессии ARP3 в контроле и клубеньках с частичным блокированием экспрессии ARP3.

Частичное блокирование экспрессии было осуществлено под промотором леггемоглобина, гена с высоким уровнем экспрессии в инфицированных клетках корневого клубенька.

Для контроля распределения белка ARP3 в ткани корневого клубенька при блокировании экспрессии, было выполнено окрашивание препарата специфичным для актина красителем (актин/фаллоидин). Поскольку используемый для блокирования экспрессии промотор леггемоглобина экспрессируется только в инфицированных клетках, наличие сети актина (метка зеленым флуорофором) было отмечено только в неинфицированных клетках (Н), тогда как в расположенной рядом инфицированной клетке, заполненной бактериями (ИК), формирование актиновых филаментов не происходило (Рис.56), что показывает специфичность блокирования экспрессии гена ARP3.

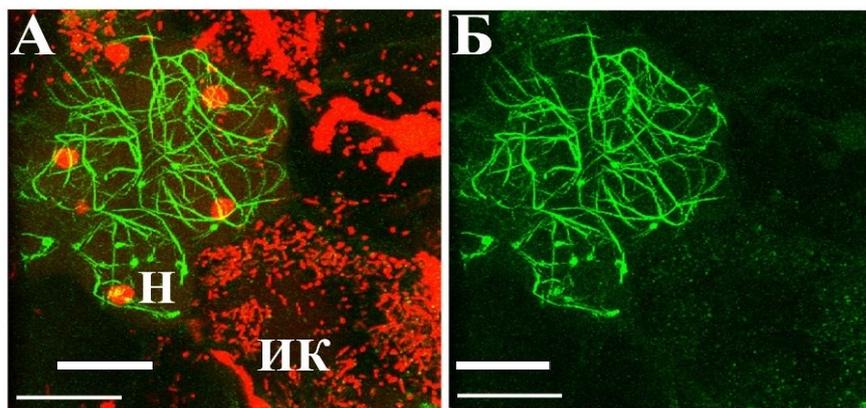


Рис. 56. Паттерн актина в инфицированной (ИК) и неинфицированной (Н) клетке клубеньков, собранных с трансгенных корней, при частичном блокировании экспрессии гена методом РНК-интерференции в инфицированной клетке.

(ИК)-инфицированная клетка, (Н) - неинфицированная клетка. Цветовой код: ядра клеток и бактерии контрастированы иодитом пропидия (красный флуорофор), актиновые волокна, окрашенные фаллоидином помечены зеленым флуорофором. Масштабная линейка =20μm.

При анализе клубеньков, образованных на трансгенных корнях, где экспрессия была уменьшена за счет использования метода РНК-интерференции, были отмечены изменения в анатомии клубеньков, в частности, были нарушены заключительные этапы дифференциации бактериоидов (Рис.57). Для изучения влияния частичного блокирования экспрессии *ARP3* на развитие симбиосом клубеньки были проанализированы с использованием световой и электронной микроскопии (рис.57).

В сравнение с контролем (Рис.57 А,Б) около 50 % трансгенных клубеньков с частичным блокированием экспрессии демонстрировали фенотип. В клубеньках с выраженным фенотипом симбиосомы не росли и не достигали стадии азотфиксации, поэтому по размеру они уступали симбиосомам из контрольных клубеньков. Также симбиосомы не формировали стандартный паттерн в клетке и были беспорядочно распределены в цитоплазме хозяина (рис. 57Б), тогда как в контрольных клубеньках симбиосомы, достигшие зрелости, были расположены радиально вокруг вакуоли (рис.57А).

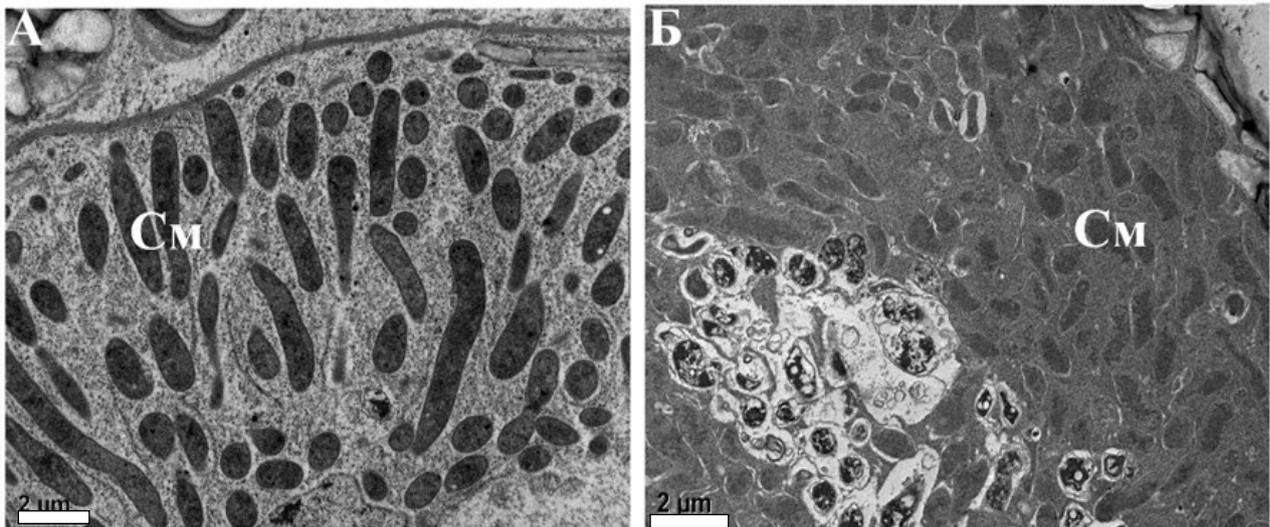


Рис. 57. Фенотип инфицированных клеток корневых клубеньков при частичном блокировании экспрессии ARP3. (А) -инфицированная клетка контрольного клубенька, (Б) трансгенные клубеньки, где экспрессия ARP3 была уменьшена за счет использования метода РНК-интерференции. Масштабная линейка= 2μm

Вследствие того, что симбиосомы в трансгенных клубеньках не созревали и не росли, они не были способны к азотфиксации, а инфицированные клетки в 40% клубеньков не были способны поддерживать достаточное тургорное давление, что приводило к дефекту контакта с клеточной стенкой (стрелка). Подобные же взаимодействия были отмечены в клубеньках другого бобового растения - лядвенца *Lotus japonicus*, где было показано, что комплекс ARP2/ARP3 необходим для роста корневых волосков и развития клубеньков (Qiu *et al.*, 2015).

Таким образом, было показано, что конфигурация актинового цитоскелета подвергается реорганизации с началом роста бактериальной колонии ризобий в симпласте инфицированной клетки. По мере роста и созревания бактериоидов, микрофиламенты в цитоплазме клетки-хозяина образуют сеть вокруг симбиосом, что, вероятно, способствует росту и созреванию симбиосом до состояния зрелых азотфиксирующих органелл. В этом процессе ген ARP3 играет важную роль, поскольку, без возможности роста и удлинения актиновых волокон, блокирован и транспорт везикул к симбиосомной мембране, и, соответственно, рост симбиосом. Репрессирование комплекса ARP3 отрицательно влияло также на созревание симбиосом (Рис 57) что указывает на роль комплекса Arp2/3 и его активатора,

комплекса SCAR/WAVE не только в процессах инициирования клубеньков, но также роста и созревания симбиосом в клетках клубенька (Gavrin *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2018).

Возможная функциональная роль микрофиламентов может быть связана с регуляцией доставки мембранных везикул, а также позиционирования симбиосом. Следует подчеркнуть схожесть распределения белка ARP3 на мембране симбиосомы и эндосомы/молодой вакуоли. Как было показано в Главе 3 и 4 белки-маркеры идентичности симбиосомной мембраны, такие как Rab7, ассоциированы на этапе созревания как с мембраной эндосомы и молодой вакуоли, так и с мембраной симбиосом. При нарушении идентичности мембран как предвакуолярных компартментов, происходило и нарушение позиционирования белка ARP3 на симбиосомной мембране, что приводило к нарушению формирования актиновых микрофиламентов. Блокирование экспрессии ARP3 негативно влияло на рост симбиосом, что может быть объяснено также дефектом распределения и невозможностью сформировать сеть переноса необходимых материалов, в которой актиновые волокна играют главную роль.

3.12. Изменение транспорта и молекулярные механизмы распределения иона калия в ткани корневого клубенька люцерны усеченной *Medicago truncatula*

Чувствительность корневых клубеньков к стрессам, особенно связанным с диспаритетом некоторых ионов, например к солевому стрессу, хорошо известна. Симбиоз, как процесс, более уязвим, чем другие аспекты физиологии растения-хозяина и микроорганизмов, вследствие чего симбиотические взаимодействия нарушаются даже при умеренной концентрации соли в окружающей среде (Chakraborty, Harris, 2022). Механизмы поддержания ионного гомеостаза и транспорта ионов в инфицированной клетке пока не выяснены, но можно предположить, что такая высокая уязвимость ткани корневого клубенька может быть обусловлена именно преобладающими дефектами ионного баланса в клетках клубенька.

Для проверки этого предположения была проанализирована динамика содержания ионов в клетках корневого клубенька методом низкотемпературной сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского микроанализа (Fedorova *et al.*, 2021, Trifonova *et al.*, 2022). С учетом зон развития клубенька, в процессе анализа, мы использовали для сравнения молодые клетки апикальной части клубенька, зрелые клетки средней части зоны азотфиксации и старые клетки, расположенные в базальной части клубенька (Рис.58 А,Б)

Анализировалось распределение калия, натрия, магния, фосфора, хлора, кальция, железа, меди и молибдена. Основное различие, обнаруженное в инфицированных клетках, было в изменении содержания калия, этот показатель значительно снижался в течение жизни инфицированных клеток. Уровень K^+ был достоверно ниже в вакуолях и симбиосомах зрелых и стареющих инфицированных клеток, в сравнении с молодыми инфицированными клетками (Рис.58).

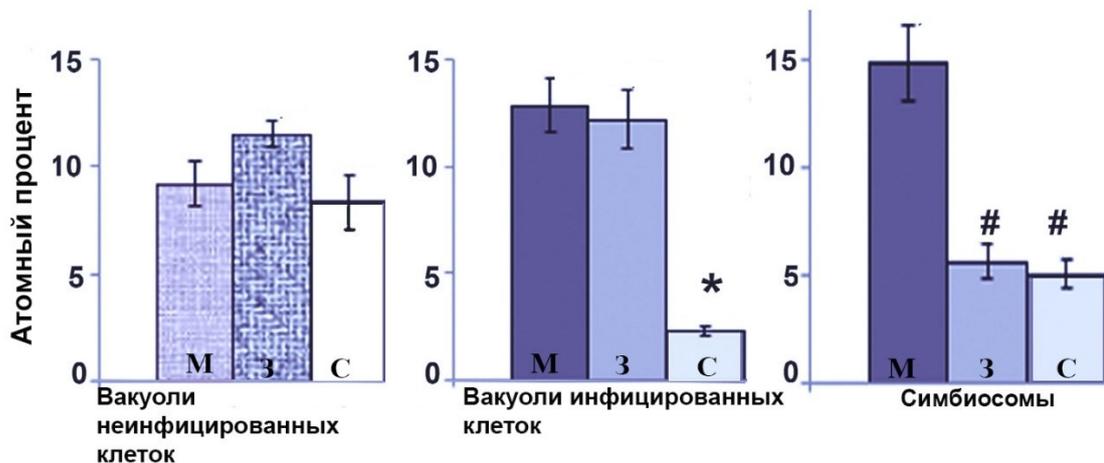


Рис. 58. Распределение иона калия в вакуолях и симбиосомах молодых (м), зрелых (з) и старых (с) клеток корневых клубеньков.

Вакуоли клеток коры клубенька показали также различия в содержании натрия, хлора и кальция по сравнению с вакуолями неинфицированных клеток, расположенных в инфицированной зоне (Fedorova *et al.*, 2021). В отличие от инфицированных клеток, вакуоли неинфицированных клеток внутреннего и внешнего кортекса и из центральной части клубенька не показали существенных различий в содержании калия (рис.58).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что доступность калия для симбиосом и клетки растения-хозяина ухудшалась в течение жизни инфицированных клеток. Возможной причиной этого может быть нарушение транспорта калия в инфицированную клетку в процессе ее созревания.

Для проверки этой гипотезы, мы решили изучить белки, вовлеченные в процессы транспорта калия. Для анализа были выбраны белки основных калиевых каналов растительных клеток, расположенные на цитоплазматической мембране: внутренний выпрямляющий K^+ канал, MtAKT1, гомолог канала Арабидопсиса АКТ1, и внешний выпрямляющий канал, который опосредует высвобождение K^+ из клеток (SKOR), MtSKOR/GORK.

Калий является одним из основных ионов, участвующих в адаптивных реакциях растений на абиотические стрессы (Rubio *et al.*, 2020), он необходим для контроля осмотического статуса, а также катионно-анионного баланса клетки. Доступность K^+ для клетки зависит от транспорта и концентрации K^+ по обе стороны мембраны. Транспортёры K^+ у растений участвуют в поглощении или высвобождении K^+ , а также хранении в вакуолях и транслокации ионов между тканями и органами (Ragel *et al.*, 2019).

Некоторые транспортёры K^+ были идентифицированы в транскриптомах корневых волосков в процессе инфицирования и образования корневого клубенька. Было высказано предположение, что они вовлечены в регуляцию ионного транспорта на ранних стадиях образования клубенька (Desbrosses *et al.*, 2004; Rehman *et al.*, 2017, Udvardi, Poole, 2013; Drain *et al.*, 2020). Однако информация о транспорте K^+ в корневых клубеньках и непосредственно в инфицированных клетках практически отсутствует.

Для выяснения причин изменения содержания калия в клетках клубеньков разной степени зрелости, а также в симбиосомах и вакуолях, мы исследовали уровень экспрессии генов и внутриклеточное распределение белков ключевых переносчиков калия в растениях. Для диагностического анализа были выбраны два переносчика калия, хорошо исследованные у Арабидопсиса, отнесенные к группе каналов шейкерного типа: MtAKT1, и MtSKOR/GORK .

АКТ1 является одним из основных K^+ -проницаемых каналов и относится к группе K^+ -каналов входящего выпрямления (inward-rectifying) (Véry *et al.*, 2014). В клетках арабидопсиса канал АКТ1 расположен на цитоплазматической мембране, он опосредует как высоко-, так и низкоаффинный транспорт K^+ внутрь клетки, высоко экспрессируется в корнях (Sharma *et al.*, 2013), структурно он состоит из шести трансмембранных доменов.

Каналы, отвечающие за вынос ионов из клетки, K^+ -каналы выходящего выпрямления (outward-rectifying) опосредуют высвобождение K^+ и открываются при деполяризованных мембранных потенциалах; в эту группу входят каналы SKOR и GORK (Ragel *et al.*, 2019). Таким образом, мы исследовали каналы с противоположными векторами транспорта K^+ : канал АКТ1 (MtАКТ1), который переносит калий в клетку, и MtSKOR/GORK который участвует в выносе иона в апопласт.

Недавно было показано, что в геноме *M. truncatula* присутствует только один ген канала выходящего выпрямления (outward-rectifying) канала шейкерного типа участвующий в переносе K^+ (Drain *et al.*, 2020). Drain *et al.*, проанализировали функциональную активность этого канала и показали, что участие этого канала выходящего выпрямления в перераспределении калия по транспортной системе к побегам незначительно, но он играет важную роль в транспорте калия в устьицах, обеспечивая динамику их открытия и закрытия. Таким образом, этот канал проявлял функциональные особенности GORK-канала, и он был обозначен Drain *et al.* (2020) как MtGORK. Поскольку ген этого канала аннотирован как MtSKOR в базе данных NCBI, мы используем двойное название MtSKOR/GORK.

Для выяснения уровня экспрессии в корневых клубенках использовалась РНК, выделенная из 28-дневных клубеньков, рассеченных на три части: белая (меристема плюс зона инфекции: зона 2), средняя азотфиксирующая зона, определяемая по наличию леггемоглобина (зона 3) и базальная зона старения (зона 4) (Рис. 59А,Б).

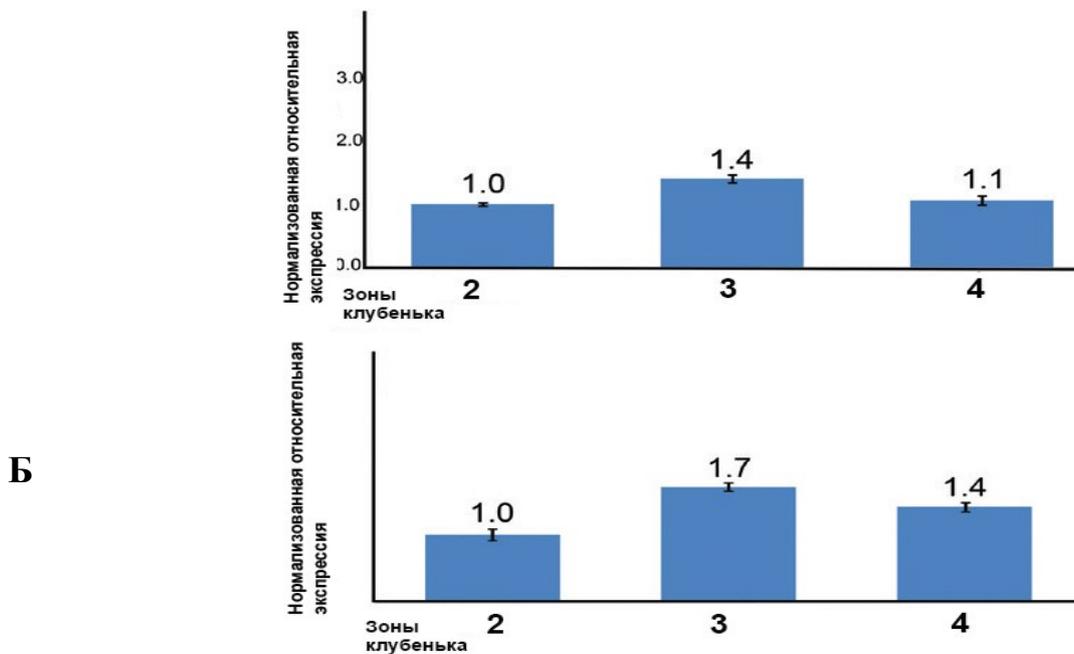


Рис. 59. А,Б. Уровень экспрессии генов MtAKT1(А) и MtSKOR/GORK (Б) по зонам развития корневых клубеньков.

Уровень экспрессии генов MtAKT1 и MtSKOR/GORK в корневых клубеньках оценивали методом ПЦР в реальном времени. Сравнение экспрессии генов не показало существенных достоверных отличий по зонам клубенька (Рис. 59А,Б).

Это можно объяснить условиями эксперимента. Поскольку РНК для анализа выделялась из ткани клубенька, который содержит как инфицированные, так и неинфицированные клетки, а также клетки коры клубенька, сосудистых пучков и меристемы, то уловить разницу между инфицированными и неинфицированными клетками методом ПЦР не представилось возможным.

Для определения паттерна экспрессии в ткани клубенька и зонах развития симбиоза был создан конструктор для анализа распределения промоторной активности ProMtAKT1:GUS в тканях клубенька. Анализ показал, что в клубеньках ген экспрессируется в меристематических клетках, коре и сосудистых пучках (рис.60 А,Б,В). В примордиях клубеньков экспрессия была обнаружена по всему органу (рис. 60А), в зрелых клубеньках экспрессия была отмечена в меристеме и клетках коры и паренхимы клубенька. В стареющих клубеньках экспрессия была отмечена только в клетках сосудистых пучков. (Рис.60 В)

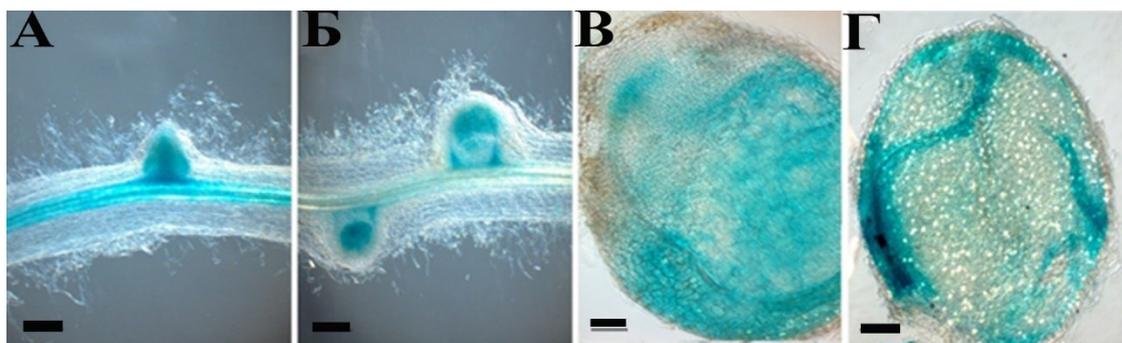


Рис. 60. Распределение активности промотора MtAKT1 в клубеньках и корнях методом окраски β -глюкоранидазы (синий цвет). (А), молодой корень, (Б), примордии клубеньков, В-молодой клубенек, (Г) -стареющий клубенек. Анализ выполнен при использовании трансгенных клубеньков, несущих конструктор PR:AKT1:GUS. Масштабная линейка: 100 μ m

Затем мы проследили распределение белков MtAKT1и MtSKOR/GORK в инфицированных и неинфицированных клетках с помощью метода иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии.

Для исследования рапределения белка MtAKT1в клетке клубенька был создан конструктор с использованием собственного промотора гена MtAKT1, ProMtAKT1:MtAKT1:GFP.

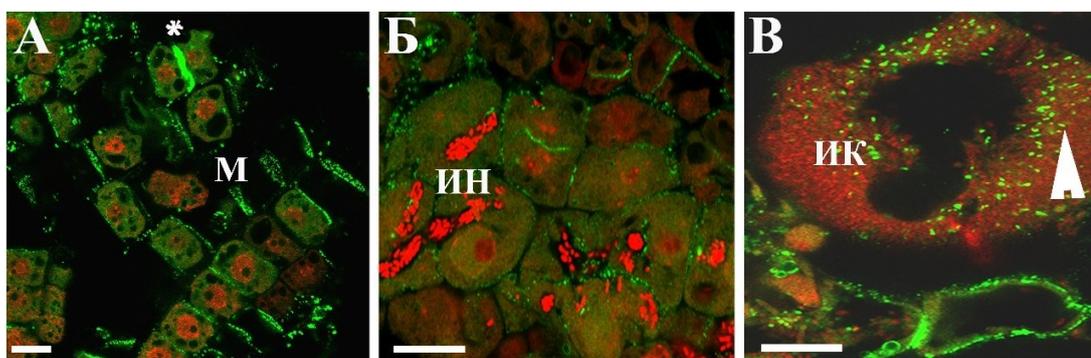


Рис. 61. Иммуноцитологический анализ распределения белка MtAKT1 в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька.(М) – меристема, ИН-инфекционная нить, ИК-инфицированная клетка, Н-неинфицированная клетка. Ризобии и ядра помечены красителем для нуклеиновых кислот иодидом пропидия, красный флуорофор. Масштабная линейка:А=10 μ m, Б=12,5 μ m, В=25 μ m.

По результатам иммуноцитохимического исследования (Рис.61А), в клетках меристемы (М) белок распределялся на цитоплазматической мембране (помечен зеленым флуорофором GFP, зеленый сигнал), явно маркируя границы соседних клеток двойным слоем флуоресцентной метки (рис.61А).

Белок также располагался на формируемой мембране в клетках, выходящих из цикла деления (рис.61А,(*). В зоне инфицирования, определяемой по наличию инфекционных нитей (ИН) и выходу бактерий в симпласт, белок был отмечен на цитоплазматической мембране всех клеток (Рис.61Б). В зрелых клетках зоны активной азотфиксации, (рис.61В), белок присутствовал на цитоплазматической мембране неинфицированных клеток (рис.61Б,В). В зрелых инфицированных клетках (ИК), заполненных симбиосомами, метка на цитоплазматической мембране была выражена слабо, в этих клетках сигнал MtАКТ1 был расположен в цитоплазме в виде точек (рис. 61В).

Таким образом, наблюдалось нарушение положения белка в инфицированных клетках, где он был частично потерян с целевой мембраны, которой является цитоплазматическая мембрана.

Распределение белка MtSKOR/GORK исследовали с использованием специфических антител против этого белка. Белок калиевого канала MtSKOR/GORK (Рис.62) был обнаружен на цитоплазматической мембране молодых клеток и меристемы, а также неинфицированных (Н) и молодых инфицированных клеток (ИК). Расположение этого белка в инфицированных клетках отличалось от распределения MtАКТ1, поскольку, в зрелых инфицированных клетках сигнал MtSKOR/GORK был также ассоциирован с симбиосомной мембраной (СМ) (рис. 62В), но был утерян с цитоплазматической мембраны, аналогично белку MtАКТ1 (рис. 62А,Б).

Поскольку сходные нарушения были обнаружены при исследовании двух разных ионных каналов, имеющих различные векторы переноса ионов, и с различным распределением в инфицированной клетке, можно заключить, что анализ отражает истинное состояние в распределении этих белков в клубеньке.

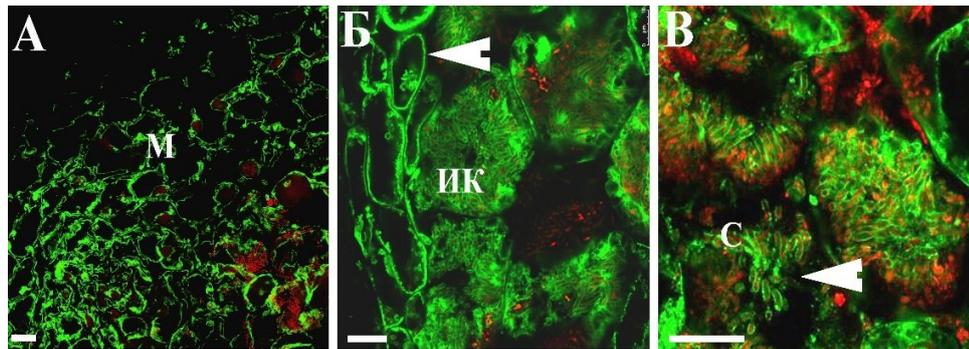


Рис. 62. Распределение белка MtSKOR/GORK в клетках корневого клубенька. М-меристема, ИК-инфицированная клетка, С-симбиосомы. Масштабная линейка: А=25μm, Б=25μm, В=10μm

Потеря белков с мембран назначения представляет собой реальную инвалидизацию клетки-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.

Для более точного выяснения локализации сигнала в цитоплазме инфицированных клеток и несущих метку белков, был проведен анализ с использованием метки коллоидным золотом и электронной микроскопии. Согласно полученным результатам анализа, сигнал меченых золотом антител MtAKT1 и MtSKOR/GORK был обнаружен в эндоплазматическом ретикулуме, эндосомах, вакуолях и цитоплазматической мембране (стрелка) (рис. 63А, Б).

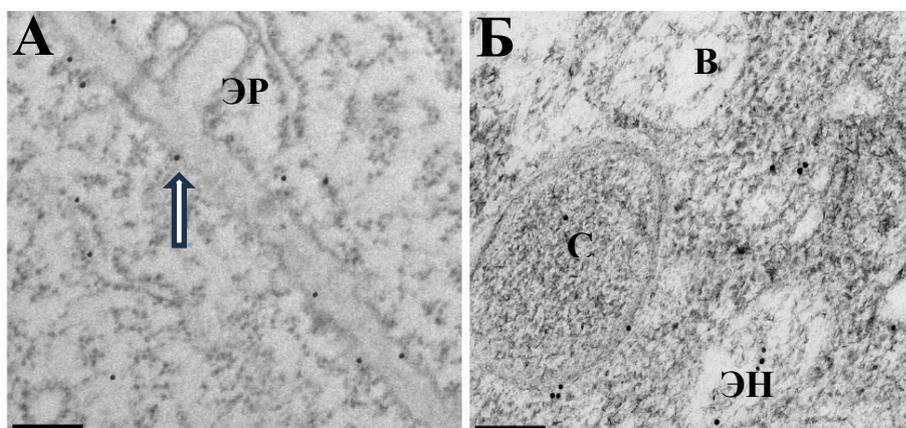


Рис. 63. Иммунолокализация белка SKOR/GORK (А,Б) в корневых клубеньках люцерны усеченной с использованием метки коллоидным золотом. ЭР-

эндоплазматический ретикулум, СМ-симбиосома, ЭН – эндосома, В-вакуоль, стрелка – метка на цитоплазматической мембране. Масштабная линейка: А=500nm, В=200nm

Анализ расположения MtSKOR/GORK подтвердил данные конфокальной микроскопии и показал, что MtSKOR/GORK ассоциирован с мембраной симбиосомы(Рис.63Б), сигнал также был обнаружен в эндосомах и вакуолях и на цитоплазматической мембране неинфицированных клеток (Рис.63А).

Таким образом, при исследовании расположения белков MtАКТ1 и MtSKOR/GORK в клубеньках люцерны усеченной методом иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии были отмечены различия в расположении белков обоих каналов между инфицированными и неинфицированными клетками клубеньков.

Для проверки достоверности динамики наличия белка на цитоплазматической мембране, была проведена сравнительная оценка интенсивности флуоресцентного сигнала на цитоплазматической мембране инфицированных и неинфицированных клеток на цитологическом материале, полученном с использованием конфокальной микроскопии.

Таблица 3. Оценка уровней флуоресцентного сигнала для MtАКТ1 и MtSKOR/GORK в области цитоплазматической мембраны с помощью многоточечного анализа яркости в ImageJ.

Клетки	инфицированные	неинфицированные	Контроль автофлуоресценции
Название белка	_____	_____	30±2.9
MtАКТ1	33.7±3.4*	94.2±5.3*	_____
MTSKOR/GORK	35.6±2.9*	93.5±1.6*	_____

Данные представляют выборку из 10 клеток в режиме 45 точек на клетку.

Анализ показал частичное истощение обоих каналов на цитоплазматической мембране инфицированных клеток (табл. 1). Разница в уровне флуоресценции между цитоплазматической мембраной инфицированных и неинфицированных клеток достоверна (* $P < 0.01$).

Можно заключить, что в инфицированных клетках отмечалось нарушение вектора нацеливания белков к цитоплазматической мембране, частичное истощение белков обоих каналов в процессе развития инфицированной клетки, тогда как в неинфицированных клетках распределение белков каналов на цитоплазматической мембране оставалось стабильным. Это указывает на специфические изменения в доступности калия именно в инфицированных клетках.

Калий является одним из основных участников процесса поддержания осмотического давления, водного потенциала и тургорного потенциала в растительных клетках (Lebaudy *et al.*, 2007; Honsbein *et al.*, 2011; Shabala, Shabala, 2011). Резкая потеря K^+ является одним из симптомов стресса, вызванного патогенами, тяжелыми металлами, реактивными видами кислорода (ROS), засоленностью, засухой (Demidchik *et al.*, 2014; Shabala, Potosin, 2014). Потеря K^+ приводит к активации цитозольных эндонуклеаз, которые в других условиях ингибируются этим ионом (Demidchik *et al.*, 2010). Следует отметить, что стресс-индуцированная реакция утечки K^+ происходит довольно быстро, индуцируется за несколько минут, и заканчивается запрограммированной клеточной смертью (PCD) (Atkinson *et al.*, 1990; Demidchik, 2014).

Однако, согласно нашим результатам (Fedorova *et al.*, 2021) (рис. 54), в отличие от стрессовой реакции, описанной выше, в корневых клубеньках снижение концентрации K^+ происходит постепенно в течение 6-15 дней после выхода ризобий в клетку хозяина. За время жизни инфицированных клеток содержание K^+ в вакуолях и симбиосомах уменьшается в 3-5 раз. Причины такой потери комплексные. Пул K^+ в инфицированных клетках должен быть разделен между двумя партнерами - клеткой растения-хозяина и несколькими тысячами бактерий, обитающих в симпласте этой клетки. Ризобии нуждаются в K^+ , так же как и клетка

растения-хозяина, поскольку этот ион необходим для поддержания осмотического статуса клеток, катионно-анионного баланса, а также для контроля поляризации мембран (Domínguez-Ferrerías *et al.*, 2009).

Согласно данным анализа, уровень K^+ снижался в 6-7 клеточных слоях (через 6-7 дней после освобождения от инфекционных нитей) в зоне азотфиксации (зоне 3), о чем свидетельствует низкий уровень K^+ в зрелых симбиосомах. Исчерпание вакуолярного пула K^+ отмечалось в зоне прекращения симбиоза (зоне 4), расположенной в базальной части клубенька, то есть через 15-18 дней.

Потеря K^+ может привести к активации цитозольных эндонуклеаз в зрелых инфицированных клетках и в конечном итоге способствовать так называемому «старению» симбиосом и быстрому прекращению симбиоза. В неинфицированных клетках уровень K^+ был стабильным, и они не подвергались преждевременному старению. Известно, что в клубеньках инфицированные клетки деградируют раньше, чем неинфицированные (Guerra *et al.*, 2010).

Причинами изменений, свойственных инфицированным клеткам, могут быть изменения функционального состояния, экспрессии и локализации белков, участвующих в транспорте калия внутрь клетки и его выноса.

В качестве первого исследования в этом контексте, мы проанализировали гомологи *M.truncatula* двух основных каналов K^+ в растениях - внутреннего выпрямляющего K^+ канала АКТ1 и внешнего выпрямляющего K^+ канала SKOR (Fedorova *et al.*, 2021). Оба гена экспрессируются в клубеньках *M. truncatula* (Drain *et al.*, 2020), что объясняется тем, что генетическая программа развития корня кооптируется для формирования клубеньков (Franssen *et al.*, 2015). Однако, как показали наши данные, экспрессия каналов MtAKT1 и MtSKOR/GORK не является гарантией того, что их функциональная роль в клетках будет выполнена. Согласно анализу локализации белков (рис. 61,62,63, табл. 1), белки MtAKT1 и MtSKOR были частично потеряны с цитоплазматической мембраны, а MtSKOR/GORK был частично перенацелен на мембрану симбиосом (Рис.61,62).

В ряде работ мы сообщали о перенацеливании к симбиосомной мембране ряда белков, в основном регулирующих слияние везикул с мембранами (Limpens *et al.*,

2009; Ivanov *et al.*, 2012; Gavrin *et al.*, 2014, 2016, 2017; Coba de la Peña *et al.*, 2018). Эти изменения в инфицированных клетках были позитивными для поддержания и размножения бактериальных симбионтов, но последствия для самой клетки-хозяина не оценивались. Однако в настоящем исследовании при анализе распределения ионов в инфицированных и неинфицированных клетках, мы столкнулись с эффектом изменения доступности K^+ для клетки-хозяина, содержащей зрелые азотфиксирующие бактерии. Частичная потеря белков канала MtAKT1 и MtSKOR с цитоплазматической мембраны инфицированных клеток не может не сказаться негативно на их функциональной активности и транспорте K^+ . Снижение уровня сигнала внутреннего выпрямляющего K^+ канала АКТ1 на цитоплазматической мембране коррелировало со снижением содержания K^+ в вакуолях, поскольку эти два события происходят в зонах 2, 3, и 4, соответственно. Можно предположить, что частичная потеря белка канала MtSKOR/GORK, внешнего выпрямляющего K^+ канала, с цитоплазматической мембраны инфицированных клеток, может иметь некоторый компенсаторный эффект для выживания клетки-хозяина, поскольку снижает вынос калия из клетки, но доказать это пока не удалось.

Помимо роли этих каналов в транспорте K^+ , они играют важную роль в ответе на стресс (Sharma *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2018; Adem *et al.*, 2020). В случае солевого стресса, дефицит K^+ в клетках корня может быть компенсирован из вакуолярного пула калия, но, после исчерпания этого источника, цитозольный K^+ снижается ниже определенного предела и происходит индукция процесса программируемой клеточной смерти (PCD), с активацией каспазоподобных протеаз и эндонуклеаз (Adem *et al.*, 2020).

Данные о прогрессирующем снижении содержания K^+ в вакуолях инфицированных клеток подтверждают этот сценарий. Можно заключить, что корневые клубеньки нуждаются в тонкой настройке баланса ионов, этот ионный гомеостаз хрупок и может различаться между инфицированными и неинфицированными клетками. Эта особенность инфицированных клеток может

быть одной из причин короткого срока жизни инфицированных клеток и достаточно короткого срока азотфиксации.

3.13. 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 ряда ионов могут быть также причиной низкой толерантности корневых клубеньков к абиотическим стрессам, в частности, к солевому стрессу. Возможно, что высокая уязвимость корневых клубеньков к солевому стрессу 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, de la Peña *et al.*, 2007). Для повышения устойчивости клубеньков к солевому стрессу проводились исследования с применением отбора более устойчивых растений и бактерий, а также делались попытки увеличения устойчивости методами биоинженерии (Redondo *et al.*, 2012, Almeida *et al.*, 2017, Amin *et al.*, 2021). Однако причины, лежащие в основе чувствительности клубеньков к солевому стрессу пока так и 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. 64 Б). Анализировали распределение ионов натрия (Na), калия (K), а также магния (Mg), фосфора (P), серы (S), хлора (Cl), кальция (Ca), железа (Fe), меди (Cu) и молибдена (Mo) (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. 64) по сравнению с клубеньками контрольных растений. С

учетом объема инфицированных клеток, при солевом стрессе они накапливали в 5 раз больше натрия, чем неинфицированные (Рис.64).

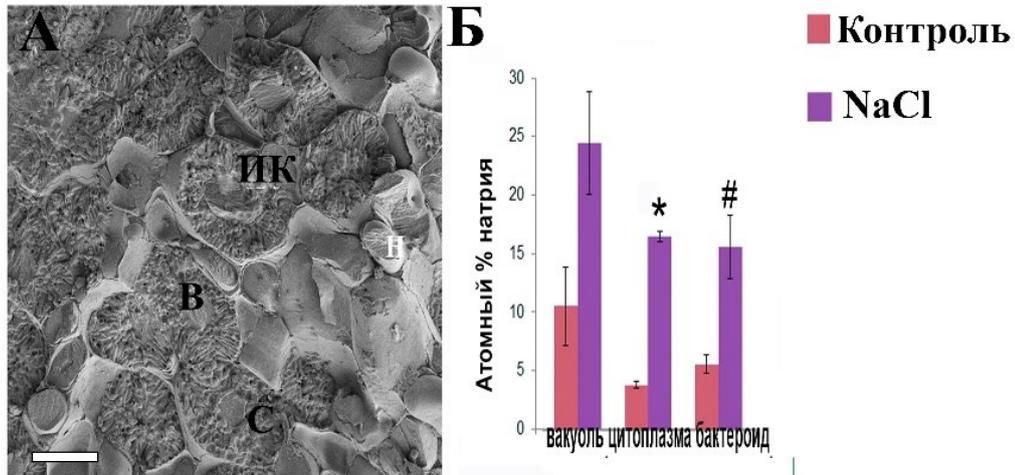


Рис. 64. Изменения в содержании и распределении ионов натрия (Na) и калия (K) в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька при солевом стрессе
 А- ткань в процессе анализа. ИК-инфицированные клетки, Н-неинфицированные клетки, СМ-симбиосомы. Б-содержание ионов натрия в вакуолях, цитоплазме и бактериоидах в контроле и при солевом стрессе.

Одним из основных эффектов солевого стресса в растениях является индуцированное изменение клеточного гомеостаза, вызванное дисбалансом Na^+/K^+ . Следовательно, улучшение механизмов удаления натриевого иона из растительной клетки может быть одним из путей повышения солестойкости корневых клубеньков.

Поддержание баланса между натрием и калием зависит от белков/антипортеров $\text{K}^+/\text{Na}^+/\text{H}^+(\text{NHX})$, которые входят в семейство моновалентных катион/протонных антипортеров (CPA) (Fan *et al.*, 2018, Sze *et al.*, 2018). Калий/натриевые обменники NHX играют важную роль в различных клеточных процессах - регуляции уровня pH, движении и слиянии везикул, росте и развитии, а также в процессах, происходящих в клетках в при реакции на солевой стресс. Согласно обширным исследованиям, проведенным на Арабидопсисе, NHX способны транспортировать K^+ или Na^+ в вакуоль или эндосомув обмен на H^+ (NHX1-6), или осуществлять вынос ионов Na^+ из клетки в обмен на H^+ (NHX7/SOS1) (Bassil, *et al.*, 2018).

В поддержании клеточного ионного гомеостаза в растениях также участвуют транспортеры калия группы КТ-НАК-KUP, которые включают НАК (высокоаффинный транспортер калия) и KUP/КТ транспортеры, которые способствуют гомеостазу K^+ в условиях низких и высоких внешних концентраций (Ragel *et al.*, 2019). Информация об экспрессии генов, местоположении и функциях обменников/антипортеров в растениях люцерны усеченной очень ограничена, имеется одна публикация на эту тему (Sandhu *et al.*, 2017), а информация об их функциональности в корневых клубеньках практически отсутствует. Геном *M. truncatula* содержит шесть генов группы NHX, которые демонстрируют высокую экспрессию в корнях и листьях (Sandhu *et al.*, 2017).

Был проведен анализ *in silico* экспрессии генов, участвующих в транспорте калия и выносе натрия из клеток, используя базу данных экспрессии генов в зонах развития корневого клубенька Symbimix (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimix/>) (Roux *et al.*, 2014). Значительное число проанализированных генов показали негативные изменения в уровне экспрессии в зонах развития клубенька, экспрессия некоторых генов значительно уменьшалась в инфицированной части клубенька (Таблица 4).

Для дальнейшего исследования были выбраны два NHX-обменника *M. truncatula* - MtNHX7 и MtNHX6. Ген MtNHX7 является гомологом хорошо изученного на Арабидопсисе гена *AtNHX7(SOS1)*. Белок AtSOS1 расположен на цитоплазматической мембране и, в случае солевого стресса, участвует в выведении Na^+ из растительной клетки в апопласт (Bassil, *et al.*, 2018).

Регуляция *NHX7/SOS1* была связана с солеустойчивостью у *M. truncatula* и *M. falcata* (Sandhu *et al.*, 2017, Liu *et al.*, 2014). Ген *MtNHX6* является гомологом *AtNHX6* (Bassil *et al.*, 2011), а белок, кодируемый этим геном, находится на мембранах аппарата Гольджи, эндосом, пре-вакуолярного компартмента, участвует в секвестрации K^+ или Na^+ с перенаправлением в просвет эндосом (Isayenkov *et al.*, 2020).

Таблица 4. Экспрессия генов *M. truncatula*, кодирующих белки внутреннего транспорта калия и катионно-натриевых обменников, в зонах развития клубеньков.

FI: Меристема; FIId: Дистальная зона инфекции; FIпр: Проксимальная зона инфекции; IZ: интерзона II-III; ZIII: зона азотфиксации.

Зоны клубенька идентификационный номер гена	FI	FIId	FIпр	IZ	ZIII
Транспортеры					
<i>MtKT2, Medtr3g094090</i>	66.08±2.6	17.27±1.32	6.65±1.96	6.37±1.46	3.62±0.9
<i>MtKT3, Medtr8g099090</i>	21.62±1.22	19.49±1.47	21.45±0.94	19.81±2.4	17.63±1.11
<i>MtНАК5, Medtr4g099260</i>	49.65±10.23	9,15±2,14	28,75±10.69	12.45±5.25	0
<i>MtНАК6, Medtr5g034500</i>	1.97±0.04	4.67±0.37	9.82±0.44	29.64±2.57	53.9±2.58
<i>MtНАК7, Medtr2g008820</i>	14.54±1.22	16.21±0.83	21.23±1.51	19.61±2.8	28.41±3.83
<i>MtНАК8, Medtr6g007697</i>	60.39±5.73	21.21±3.33	14.44±9.45	0.87±0.44	3.09±2.19
<i>MtНКТ6, Medtr6g092840</i>	62.34±5.45	34.62±2.41	3.04±3.04	0	0
Каналы					
<i>MtАКТ1, Medtr4g113530</i>	60.89±8.22	5.16±0.35	4.1±3.19	16.73±3.17	13.12±1.99
<i>MtАКТ2/3, Medtr2g006870</i>	38.76±11.57	28.79±18.34	19±11.44	0	13.45±13.45
<i>MtКАТ1, Medtr8g446430</i>	39.29±8.32	31.31±7.11	17.04±9.01	12.36±6.65	0
<i>MtКАТ3, Medtr3g108320</i>	47.12±7.01	21.77±7.94	1.14±1.14	8.08±4.04	21.89±19.25
<i>MtSKOR/GORK, Medtr5g077770</i>	12.66±1.86	9.25±3.73	9.26±6.19	44.47±2.14	24.37±5.38
Ионные обменники					
<i>MtСНХ18, Medtr5g009770</i>	13.39±0.97	12.69±2.1	19.05±3.61	29.47±3.5	25.4±2.55
<i>MtNHX1, Medtr1g081900</i>	14.34±1.21	15.49±1.64	21.25±1.96	16.78±0.31	32.14±0.3
<i>MtNHX2, Medtr7g114250</i>	0	0	0	0	0
<i>MtNHX3, Medtr4g118770</i>	0	0	0	0	0
<i>MtNHX4, Medtr3g055600</i>	50±13.89	43.05±13.81	5.27±5.27	0	1.67±1.67
<i>MtNHX6, Medtr2g028230</i>	10.64±0.85	21.25±1.46	23.75±1.93	20.94±0.31	23.43±2.23
<i>MtNHX7, Medtr2g038400</i>	40.08±30.52	41.96±29.97	17.96±17.96	0	0
<i>MtNHX8, LOC120577420</i>	27.28±2.61	21.11±2.58	9.92±4.22	17.41±1.37	24.28±2.37

Для исследования локализации белка MtNHX7 в клетках клубенька использовали трансгенные клубеньки, несущие конструкт ProNHX7:NHX7:GFP.

Распределение белка MtNHX7 анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Наличие белка оценивали по уровню зеленого флуоресцентного сигнала белка GFP (Рис.65).

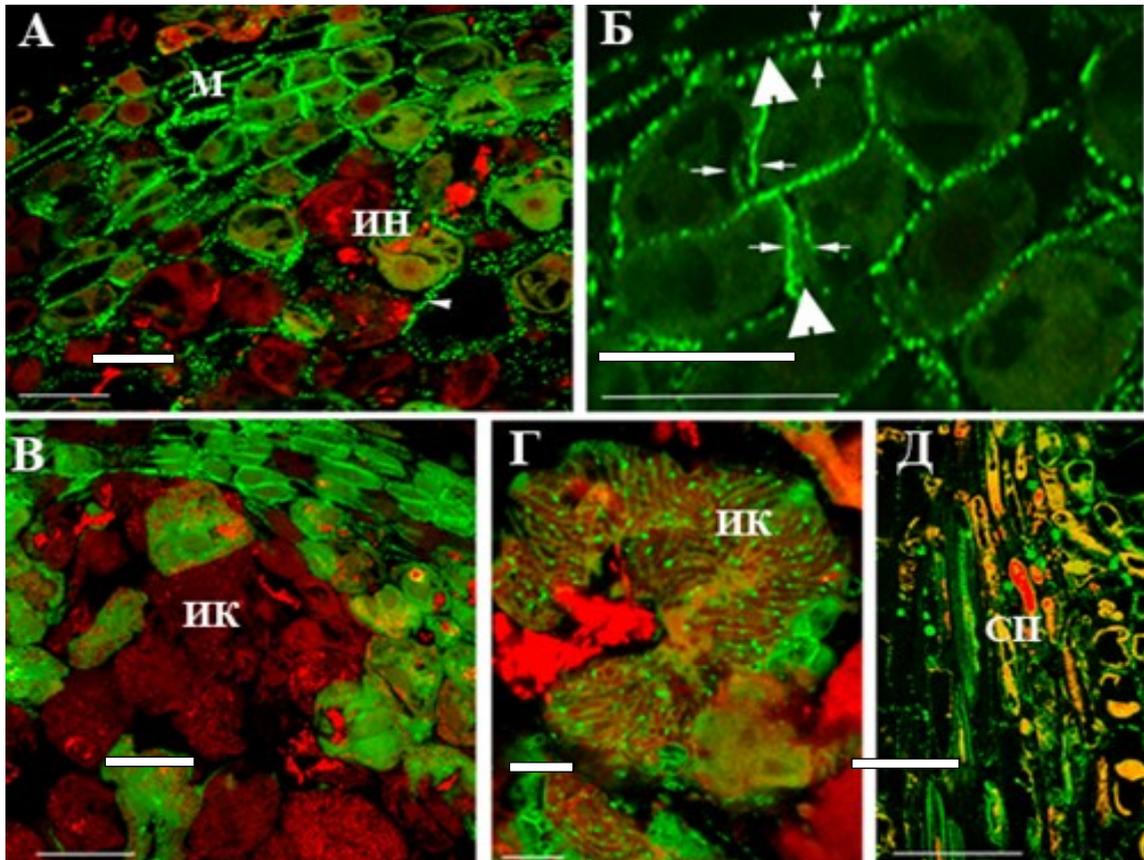
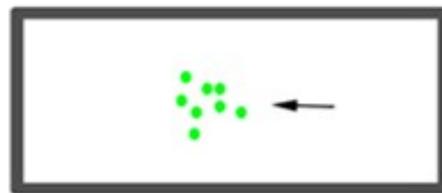


Схема распределения белка NHX7 в клетках корневого клубенька



неинфицированная
клетка



инфицированная клетка

Рис. 65. Иммуноцитологический анализ распределения белка MtNHX7 в клетках и схема перераспределения белка в клетках. М-меристема, ИН-инфицированная клетка, СП-сосудистый пучок. Масштабная линейка: (А,Б,Д)=50μm, В=25μm, (Г)=10μm.

В клетках меристемы и молодых неинфицированных и инфицированных клетках (Рис.65А,Б) белок располагался на цитоплазматической мембране, создавая двойной ряд флуоресцентных точек (стрелки), разделенных клеточной стенкой. Сигнал белка MtNHX7 присутствовал в цитоплазматической мембране клеток коры, сосудистых пучков, меристематических клеток и молодых клеток клубеньков (рис. 65А,Б,В).

Распределение белка MtNHX6 (Рис.66) исследовали с помощью конфокальной микроскопии и специфичных для белка антител.

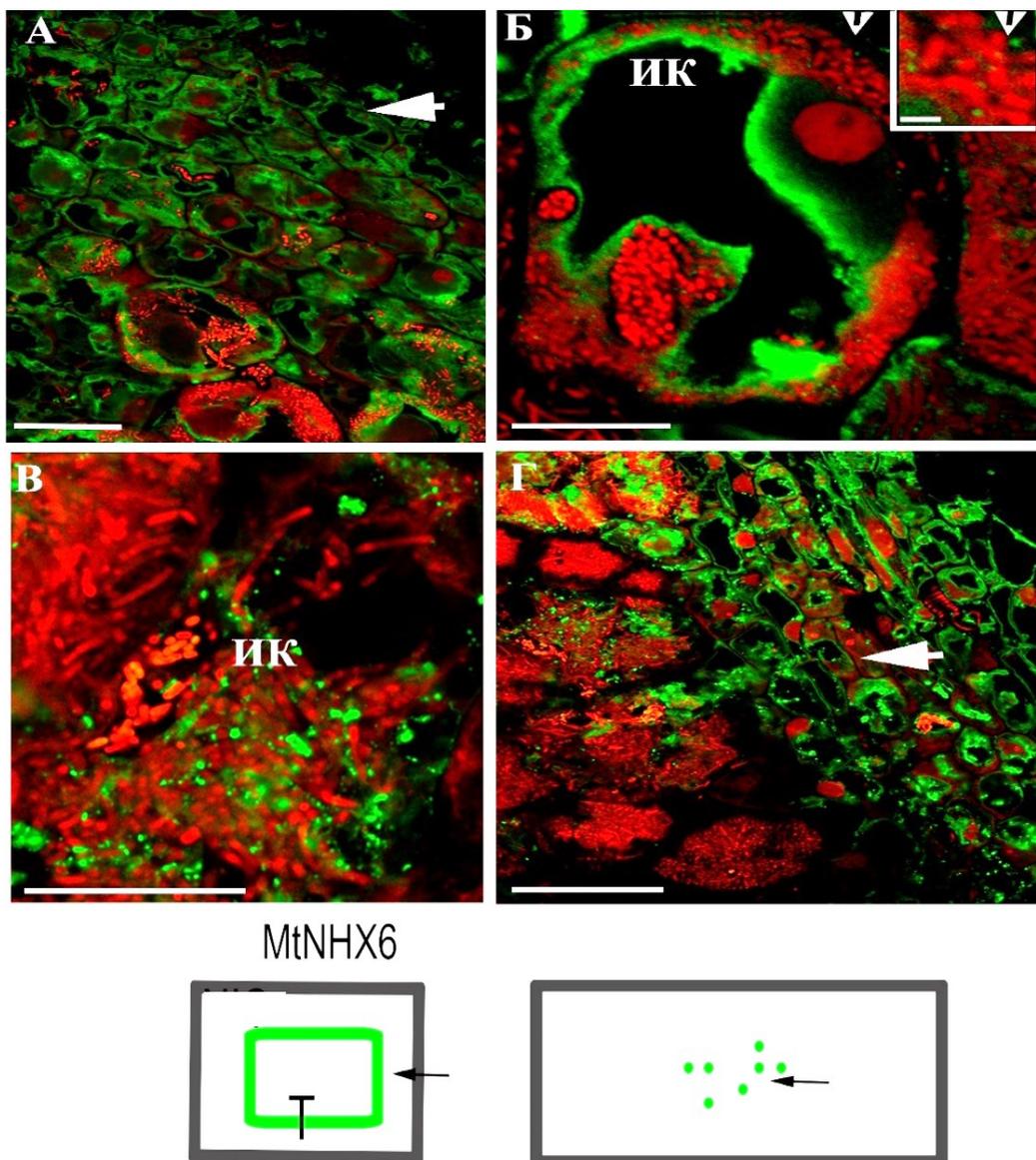


Рис. 66. Иммуноцитологический анализ распределения белка MtNHX6 в корневом клубеньке, конфокальная микроскопия (А,Б,В,Г), схема распределения белка

MtNHX6 в клетках клубенька (Д). Цветовой код: красная флуоресценция – бактерии и ядра, окрашенные йодистым пропидием, зеленая флуоресценция – белок, меченый специфичными антителами. ИК-инфицированная клетка. В зрелых инфицированных клетках расположение белка изменялось. Так, в инфицированной клетке (66Г) белок был потерян с цитоплазматической мембраны и располагался в цитоплазме в виде точек (эндосом, молодых вакуолей).

Таким образом, в инфицированных клетках происходило изменение вектора транспорта белка к мембране назначения, к цитоплазматической мембране, либо белок был утерян с этой мембраны в процессе развития бактериальной колонии и созревания инфицированной клетки клубенька (Рис.65А,Б,В,Г), схема распределения белка в инфицированной и неинфицированной клетке. Расположение эндосомного белка MtNHX6 в инфицированных клетках также изменилось в процессе их созревания (Рис.66). В молодых клетках белок был расположен на тонопласте (стрелка) (А,Б) и в цитоплазме клетки в эндосомах разного типа (В), в зрелых инфицированных клетках сигнал на тонопласте основной вакуоли был потерян, но сохранен на тонопласте в клетках сосудистого пучка (стрелка) (Г). Масштабная линейка: (А)=25µm, Б=12,5µm, В=10µm, (Г)=25µm.

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. В молодых клетках 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, что отражает высокий уровень слияния эндосом с тонопластом (Рис.66,А,Б). Так, в молодой инфицированной клетке (Рис.66,Б) интенсивный флуоресцентный сигнал был отмечен на тонопласте, а также сигнал в виде точек присутствовал в цитоплазме (наконечник стрелки). Врезка в Рис.66Б демонстрирует точечный сигнал на эндосомах при большом увеличении. В зрелых инфицированных клетках, заполненных симбиосомами, сигнал был ассоциирован

с небольшими структурами, поздними эндосомами или молодыми вакуолями (Рис.66Г). В клетках сосудистого пучка сигнал сохранялся на тонопласте (стрелка), но наблюдалось перераспределение белка в процессе развития инфицированных клеток, показывая, что в инфицированных клетках белок был потерян с тонопласта центральной вакуоли. Это может свидетельствовать о перераспределении транспорта везикул пути эндоцитоза от вакуоли к другим структурам клетки, либо уменьшении интенсивности эндоцитоза. Для выяснения динамики флуоресцентного сигнала белков-обменников NHX7 и NHX6 был проведен анализ этих тканей с использованием электронной микроскопии (Рис.67).

Согласно анализу (Рис.67А,Б) белки MtNHX7 (А) и MtNHX6 (Б) были найдены в люменах молодых вакуолей, что показывает достаточный уровень их деградации после потери с мембран. (Рисунок 67 А,Б)

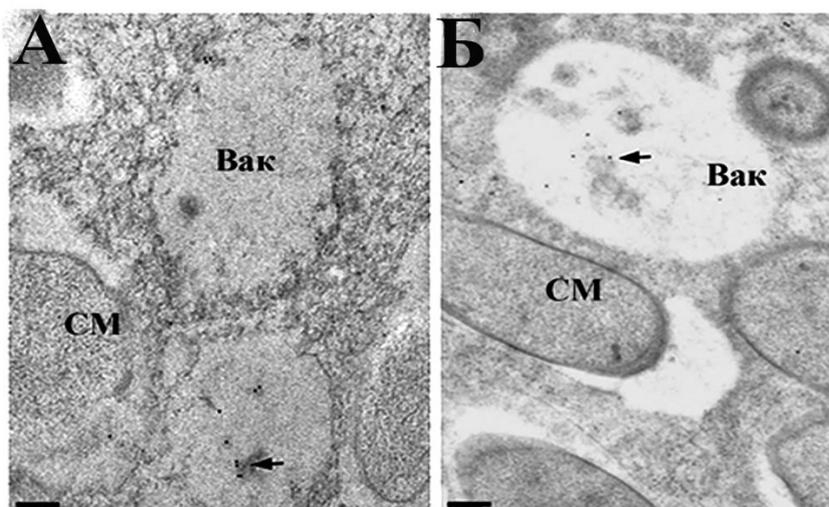


Рис. 67. Иммуноцитологический анализ распределения белков MtNHX7 (А) и MtNHX6 (Б), метка коллоидным золотом. (А): MtNHX7, (Б):MtNHX6. Стрелка-частицы коллоидного золота (15 nm), ассоциированные с белком в молодых вакуолях размером около 1000 nm в диаметре. Вак- вакуоль, СМ-симбиосома. Масштабная линейка=200nm.

Можно заключить, что, в зрелых инфицированных клетках, картина распределения белков-транспортёров и ионообменников может свидетельствовать о процессе неправильного нацеливания и истощения белков на мембранах-

мишенях и удаления этих белков с мембран последующей деградацией в молодых вакуолях. Согласно электронно-микроскопическому анализу, белки, меченые частицами коллоидного золота, находились в люмене молодых вакуолей (500-1000 нм), что указывает на деградацию белков после их потери с мембран клетки-хозяина (рис. 67А, Б).

Также было проанализировано влияние солевого стресса на экспрессию генов, связанных с выведением Na^+ из цитоплазмы: участвующих в секвестрации Na^+ в вакуоли (MtNHX1), эндосоме (MtNHX6), и гена MtNHX7, гомолога SOS1 из *A. thaliana*, участвующего в выведении в ионов натрия в апопласт через цитоплазматическую мембрану, а также недавно аннотированных генов MtNHX7-like и MtNHX8, как предполагаемых гомологов гена MtNHX7 (Рис. 68).

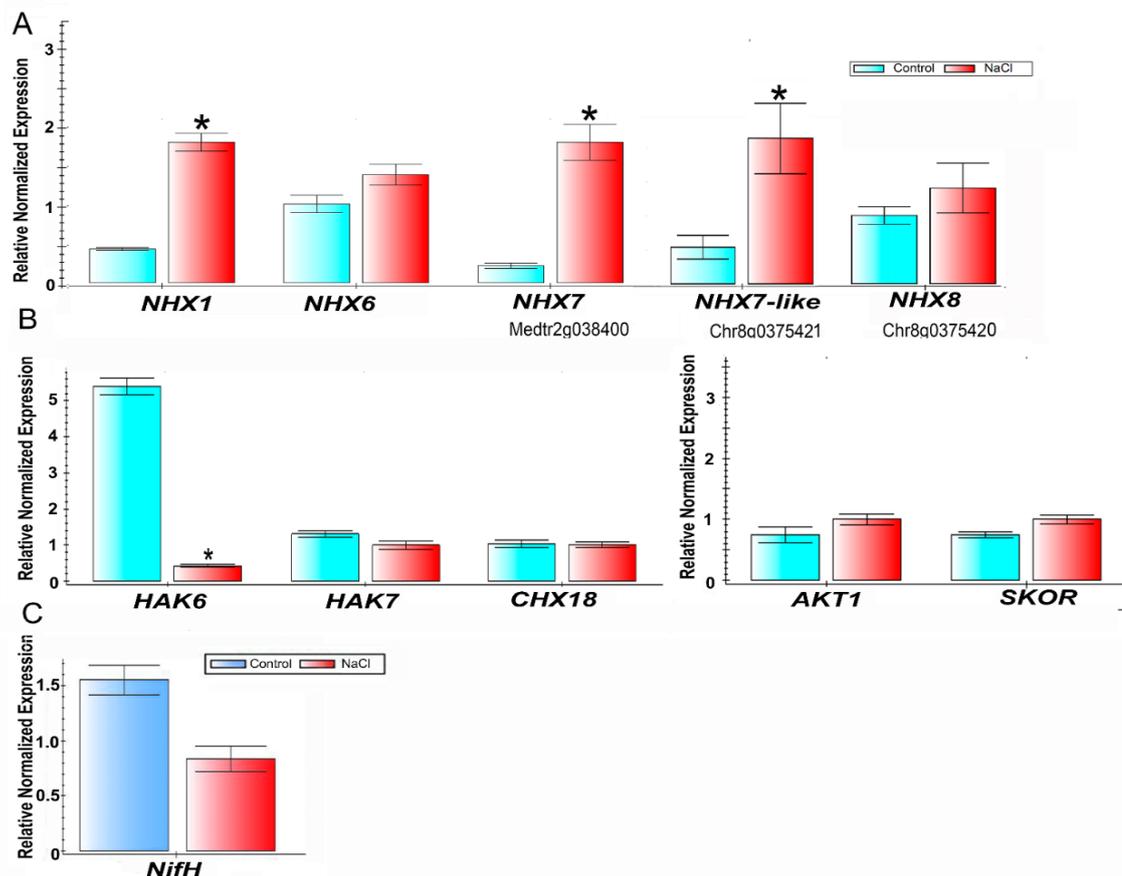


Рис. 68. Уровень экспрессии генов группы NHX и генов, участвующих в транспорте калия при солевом стрессе, контроль уровня азотфиксации-NifH.

Солевой стресс индуцировал экспрессию большинства генов группы NHX (Рис.68) (*достоверное изменение), но негативно повлиял на экспрессию

переносчика калия НАК6. Экспрессия генов каналов шейкерного типа АКТ1 и SKOR при солевом стрессе не изменилась. Экспрессия гена NifH показывает тенденцию к снижению уровня азотфиксации в клубеньках, подвергшихся солевому стрессу (Рис.68).

Поскольку в наших опытах РНК выделяли из целого клубенька, то специфические изменения в инфицированных клетках трудно вычленили из общего пула экспрессии всей ткани. Поэтому нарушение функционального состояния специфически именно инфицированных клеток и изменений в экспрессии генов трудно диагностировать по уровню экспрессии методом ПЦР.

Можно предположить, что фактором, который вызывает негативные изменения в экспрессии генов и распределении белков, участвующих в ионном транспорте в корневом клубеньке, является частичная гипоксия центральной части клубенька. В литературе есть данные относительно экспрессии некоторых ионных каналов в условиях гипоксии. Экспрессия в этих условиях снижается, например, экспрессия гена ионного канала GORK, переносящего калий, в корнях арабидопсиса снижалась в три раза в течение 1 ч в условиях гипоксии (Wang *et al.*, 2016). Негативное влияние гипоксии на экспрессию ионных каналов и активность белков также интенсивно изучается в клетках животных при моделировании внезапной остановки дыхания (Hernandez-Encarnacion *et al.*, 2017).

Клубенек как орган отличается гетерогенностью по доступности кислорода. Так, согласно данным Denison, (2003), полученным на клубеньках люцерны и донника, апикальная часть клубенька имеет высокую проницаемость для кислорода, и более высокую дыхательную способность, тогда как в центральной части клубенька, в инфицированных клетках, доступность кислорода для поддержания клетки растения-хозяина понижена. Поэтому можно полагать, что в меристеме корневого клубенька и кортексе уровень кислорода не ограничен, в отличие от центральной части клубенька, и паттерн распределения белков на мембранах отражает эту разницу.

Согласно полученным данным, пространственный паттерн и правильное расположение белков - обменников MtNHX6 и MtNHX7 сохранялись в меристеме клубенька, в очень молодых инфицированных клетках и в части неинфицированных клеток. Однако в зрелых азотфиксирующих клетках белки обменников были неправильно нацелены, удалены с их целевых мембран и выведены в молодые вакуолярные компартменты.

Анализ иммулокализации белков MtNHX7 и MtNHX6 показал сопоставимую динамику перемещения белков в зрелых инфицированных клетках, несмотря на различия в экспрессии генов в зонах развития клубеньков и их разные мембраны назначения: цитоплазматическая мембрана для MtNHX7 и мембрана эндосомы/тонопласта для MtNHX6. Подобные изменения в локализации были также отмечены для белка MtAKT1, участвующего в транспорте K^+ (Fedorova *et al.*, 2021) как в зрелых, так и в стареющих инфицированных клетках клубеньков. Причины изменений, которые мы наблюдали в паттерне локализации белков NHX, не могут быть объяснены однозначно. Возможно, неправильная локализация белков свидетельствует о начальных признаках деградации инфицированных клеток, а также связана с гипоксией в этих клетках. Независимо от причин, эти изменения распределения ионообменников и их функциональности могут быть одной из причин низкой толерантности инфицированных клеток к солевому стрессу.

Можно ожидать, что потеря белков с их целевых мембран негативно сказывается на функциональной активности белков MtNHX7 и MtNHX6, особенно в инфицированных клетках, и может привести к снижению способности выводить или секвестрировать ионы Na^+ и, вероятно, также негативно влияет на другие комбинированные пути транспорта ионов. В клубеньках эффективно функционирующие белки MtNHX7 и MtNHX6, по-видимому, пространственно ограничены неинфицированными клетками сосудистых пучков, меристемы и внешней коры, где белки демонстрируют правильный паттерн локализации. Экспрессия генов, и поддержание функционала белков, участвующих в удалении ионов натрия при солевом стрессе, вероятно, также пространственно ограничена

этими тканями. Напротив, центральная ткань клубенька, особенно инфицированные клетки, находящиеся в условиях гипоксии, по-видимому, менее защищены от накопления Na^+ из-за потери белков, которые могут удалять ионы натрия, с целевых мембран клетки-хозяина.

Таким образом, в корневом клубеньке создаются дополнительные стрессовые условия, которым могут негативно сказаться на жизнеспособности инфицированной клетки и доступности необходимых ей минеральных элементов. Частичная гипоксия инфицированной клетки способствует активности нитрогеназы (Rutten, Poole, 2019), но не создает оптимальных условий для работы ряда ионных переносчиков, чувствительных к доступности кислорода, что негативно сказывается на жизнеспособности инфицированных клеток и продолжительности их жизни.

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 сопровождались потерей кислого рН 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, лядвенец, Парспония), 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.

Целью 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.

Для выяснения биологических особенностей инфицированных клеток, которые обеспечивают временное поддержание колонии живых бактерий в симпласте клетки-хозяина, оценивался уровень экспрессии генов и распределения в клетках клубенька основных белков-маркеров процессов новообразования и поддержания эндомембран в клетках и изменений, которым они подвергаются вследствие наличия колонии азотфиксирующих бактерий. Были клонированы и 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. Были созданы меченые GFP белки для определения их расположения в клетках, был проведен функциональный анализ клубеньков после частичного нокаута ряда генов методом РНК-интерференции.

Было показано, что процесс инфицирования клетки клубенька, согласно наличию белков-маркеров идентичности мембран симбиосом, не является процессом «классического» эндоцитоза, несмотря на структурное сходство и многочисленные цитологические данные, поскольку мембраны симбиосом не приобретают молекулярных маркеров, свойственных первым этапам эндоцитоза.

Задержка приобретения симбиосомой идентичности везикулы пути эндоцитоза, вероятно, предотвращает немедленный лизис симбиосом уже на начальном этапе колонизации растительных клеток путем слияния с вакуолью. Также к возможным факторам, предотвращающим уничтожение бактерий, следует отнести и репрессию в инфицированной клетке генов вакуолярного комплекса HOPS, который регулирует селективный транспорт и слияние с мембраной тонопласта.

Было показано, что в процессе установления симбиоза вакуоли инфицированных клеток в корневых клубеньках теряют кислый рН и литические свойства, что является крайне необычным состоянием для вакуолей растительных клеток.

Согласно данным анализа протеолитической активности вакуолей, был сделан вывод о дефункционализации вакуоли инфицированных клеток в процессе колонизации ризобиями клеток клубенька. Эти изменения отмечены во всех исследованных нами клубеньках разных видов бобовых и небобовых растений: люцерны, сои, люпина, и небобового древесного растения Параспонии. Был сделан вывод, что модификация и дефункционализация вакуоли клетки хозяина является

общей биологической особенностью инфицированных клеток в симбиозе.

При исследовании причины нарушения органогенеза вакуолей в инфицированных клетках, оказалось, что в инфицированных клетках репрессированы гены комплекса HOPS, что было доказано исследованием двух генов этого комплекса: VPS11 и VPS15. Их экспрессия в инфицированных клетках полностью прекращалась, при этом в соседних неинфицированных клетках экспрессия этих генов была сохранена. Можно заключить, что прекращение функционирования комплекса HOPS в инфицированных клетках клубеньков является одним из определяющих условий поддержания временного проживания бактериальной колонии в клетке клубенька и процесса азотфиксации.

Изменение биологических свойств вакуоли также способствует созданию пространства для симбиосом в симпласте инфицированной клетки. Был проведен анализ изменения структуры инфицированной клетки с использованием меченого флуоресцентным белком GFP вакуолярного белка MtSYP22 и программы 3D реконструкции и измерения объемов органелл и клеток IMARIS. Согласно результатам анализа, в инфицированной клетке объем вакуолей уменьшался, составляя лишь около 30% объема клетки, тогда как в неинфицированных клетках он составляет 60-90%. В клубеньках других растений (соя, лядвенец, Парспония), центральные вакуоли полностью исчезали после инфицирования клетки ризобиями. Освободившийся объем клетки-хозяина в клубеньках любого типа занимали симбиосомы.

С целью выявления механизмов роста мембран симбиосом и симбиотического интерфейса и транспорта, обеспечивающего этот рост, были исследованы процессы секреции и их участие в поддержании симбиоза. Так, были клонированы гены, обеспечивающие мобильный транспорт везикул в процессе секреции, а именно гены группы VAMP71(v-SNAREs), которые участвуют в SNARE-комплексе цитоплазматической мембраны. 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. На модифицированном участке инфекционной нити, «бесстенной капле», клеточная стенка не формируется, что и создает возможность входа бактерий в симпласт клетки-хозяина и дальнейшего процесса азотфиксации, в случае же нарушения экспрессии или локализации этих белков, выход ризобий в симпласт и дальнейшая индукция азотфиксации становится невозможна.

При успешном развитии инфицированной клетки, рост симбиосомных мембран обеспечивается активными изменениями актинового цитоскелета. Главную роль в этом процессе играют гены и белки комплекса Arp2/3, который регулирует формирование и рост актинового цитоскелета в клетке растения-хозяина, обеспечивая доставку белков и мембран к симбиосомам. Симбиосомы приобретают белки комплекса Arp2/3 на этапе роста, а при дефекте этого процесса вследствие частичного нокаута генов, рост симбиосом и азотфиксация почти полностью ингибированы.

Для выяснения механизмов перенаправления вектора переноса мембран к симбиосомному интерфейсу в инфицированной клетке, исследовали роль генов из группы синаптотагминов. Гены синаптотагминов кодируют белки-сенсоры Ca^{2+} , которые участвуют в регенерации поврежденных мембран. Было показано, что вектор переноса мембранных материалов (везикул) изменяется в зависимости от изменения напряжения цитоплазматической мембраны и происходящей от нее симбиосомной мембраны. Сигнал, вызванный давлением, оказываемым колонией микроорганизмов в форме инфекционной нити или отдельной симбиосомой в процессе роста, формирует ответ в виде увеличения количества белка синаптотагмина на мембране. Ответ клетки-хозяина на потенциальный разрыв

цитоплазматической мембраны выражается в перенаправлении траффика мембранных везикул по вектору напряжения мембраны, что позволяет таргет-мембранам, в данном случае, симбиосомной мембране, мембранам бесстенных капель и инфекционной нити, быстро расти. Один из белков синаптоагминов был специфично локализован на симбиосомной мембране, что может способствовать ее росту.

Были исследованы механизмы избыточного синтеза мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР), основного источника мембран для строительства симбиотического интерфейса. Поскольку избыточное формирование мембран ЭР в клетке эукариота часто является проявлением ответа клетки-хозяина на состояние, называемое «стресс эндоплазматического ретикулума», мы проанализировали экспрессию генов, отвечающих на стресс ЭР и генов, отвечающих на неблагоприятные условия среды. Была отмечена высокая экспрессия генов стресса ЭР в корневом клубеньке, что дает основание полагать, что именно этот механизм обеспечивает избыточный синтез мембран, которые являются основным ресурсом для строительства симбиотического интерфейса и роста мембраны клетки-хозяина.

Для выяснения причин ускоренного старения инфицированных клеток клубенька по сравнению с тканями корня, а также высокой чувствительности клубеньков к стрессам, включая солевой стресс, был исследован спектр ионов в симбиосомах, вакуолях и цитоплазме инфицированных и неинфицированных клеток, а также экспрессия и распределение белков ионных каналов шейкерного типа MtAKT1 (канал входящего выпрямления) и MtSKOR/GORK(канал выходящего выпрямления). Также был определен уровень экспрессии более 20 других генов, участвующих в транспорте ионов калия, а также в секвестрировании и удалении натрия в случае солевого стресса в корневом клубеньке. Было показано,

что в процессе роста инфицированной клетки 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-транспортёров 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, где расположение белков на соответствующих мембранах не было изменено. В связи с этими изменениями, функционал каналов-транспортёров калия в инфицированных клетках был утрачен частично или полностью, что и обуславливало недостаток калия, показанный на основе данных анализа ионного состава в цитоплазме, вакуолях и симбиосомах. Эти же обстоятельства, вероятно, способствовали быстрому старению как инфицированных клеток, так и всего клубенька. Дефекты транспорта ионов, обусловленные неправильным нацеливанием к цитоплазматической мембране белков ионных каналов и дальнейшее частичное истощение белков обоих каналов в процессе развития инфицированной клетки, может объяснить специфические изменения в доступности калия.

С целью выявления причин высокой чувствительности корневых клубеньков к солевому стрессу, был проведен анализ содержания ионов калия и натрия в симбиосомах, вакуолях и цитоплазме инфицированных и неинфицированных клеток в условиях солевого 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.

Анализ расположения белков MtNHX7 и MtNHX6 показал сопоставимую динамику перемещения белков в зрелых инфицированных клетках, несмотря на различия в экспрессии генов в зонах развития клубеньков и их разные мембраны назначения: цитоплазматическая мембрана для MtNHX7 и мембрана эндосомы/тонопласта для MtNHX6. Была отмечена потеря белков с целевых мембран, подобная тому, что было показано для белка MtAKT1. В инфицированных клетках белки были потеряны с мембран назначения и локализованы в люмене молодых вакуолей инфицированных клеток. При этом правильный паттерн локализации в был сохранен в неинфицированных клетках, расположенных рядом.

Причины изменений, которые мы наблюдали в паттерне локализации белков каналов не могут быть объяснены однозначно. Возможно, неправильная локализация белков связана с гипоксией в этих клетках или свидетельствует о начальных признаках деградации инфицированных клеток. В любом случае, изменение характера локализации ионообменников может быть одной из причин низкой толерантности инфицированных клеток к солевому стрессу.

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.

Интеграция информации, полученной в процессе исследований, позволит выяснить ключевые элементы, которые индуцируются клеткой-хозяином в ответ на пролиферацию бактерий в симпласте, и получить возможности модификации этих процессов с целью увеличения эффективности азотфиксирующего симбиоза.

Исследования этих процессов могут создать возможные направления для оптимизации процесса биологической фиксации атмосферного азота в условиях бобово-ризобияльного 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 синаптоагминов.

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 таблиц

Таблица 1. Анализ экспрессии генов-сенсоров доступности углерода и азота по зонам развития корневого клубенька. 135

Таблица 2. Гены ЭР стресса, которые экспрессируются в клубеньках *M.truncatula* в зонах развития симбиоза F1, FIId, FIPr-апикальные слои клубенька до начала инфицирования клеток, IZ-зона начала проникновения ризобий в клетки, ZIII – молодые клетки зоны азотфиксации). 137

Таблица 3. Оценка уровней флуоресцентного сигнала для MtAKT1 и MtSKOR/GORK в области цитоплазматической мембраны с помощью многоточечного анализа яркости в ImageJ. 158

Таблица 4. Экспрессия генов *M. truncatula*, кодирующих белки внутреннего транспорта калия и катионно-натриевых обменников, в зонах развития клубеньков. FI: Меристема; FIId: Дистальная зона инфекции; FIPr: Проксимальная зона инфекции; IZ: интерзона II-III; ZIII: зона азотфиксации. 165

Список иллюстраций

Рис.1.	Типы корневых клубеньков	29
Рис. 2.	Зоны развития симбиоза в корневом клубеньке люцерны	33
Рис.3.	Изменения размера и формы симбиосом в процессе развития симбиоза	73
Рис.4	Инфицированная клетка древесного растения Параспони, заполненная «азотфиксирующими нитями».	73
Рис.5	Инфицированная клетка люцерны в процессе старения и лизиса	74
Рис.6.	Экспрессия трех генов MtRab5 в 10-дневных и 3-недельных клубеньках	79
Рис 7.	Корневые волоски, метка белка MtRab5	80
Рис.8.	Анализ процесса эндоцитоза с использованием красителя FM4-64 на ткани трансгенного корня.	80
Рис.9.	Мультивезикулярное тело, метка белка Rab 5	81
Рис.10.	Экспрессия малой GTP-азы Rab7 в клубеньках (10 и 21 дн после инфицирования корней) и корнях (апикальная часть включая меристему).	82
Рис.11.	Иммунолокализация белков Rab5 и Rab7 в корневых волосках	82
Рис.12	Иммунолокализация белка методом иммунодекции с использованием антител к GFP и MtRab7 и метки коллоидным золотом.	83

Рис.13.	Окрашивание специфичным красителем - маркером эндоцитоза FM4-64 тканей с экспрессией Rab7	84
Рис.14.	Распределение белка MtRab5 в инфицированной клетке.	84
Рис.15	Распределение белка MtRab7 в инфицированной клетке	
Рис.16	Распределение белка MtSYP22 в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька в процессе развития симбиоза.	87
Рис.17	Анализ распределения литической активности в клетках клубенька с использованием зондов RPA и АМС.	91
Рис.18	Анализ ацидификации вакуолей с использованием Нейтрального красного (НК), контроль выполнен добавлением протонофором м-хлорофенилгидразоном (СССР)	93
Рис.19	Анализ кислотности вакуолей в клубеньках сои (А) и люцерны усеченной (Б) методом конфокальной микроскопии с использованием Нейтрального Красного.	94
Рис.20	рН вакуолей в ткани корневого клубенька.	95
Рис.21	Анализ распределения зон экспрессии MtVPS11 и MtVPS39 в клубеньках.	96
Рис.22.	Распределение белка VPS39 в клетках клубенька	98

Рис.23	Фенотип трансгенных (А,В) и контрольных клубеньков (В,Г) при частичном ингибировании экспрессии VPS39 методом РНК-интерференции.	99
Рис.24.	Пример реконструкции объемов клеток с помощью программы Imapis, зона трансгенного корневого клубенька люцерны усеченной.	101
Рис.25.	Обзор зон клубеньков и стадий развития симбиосом	102
Рис.26.	Динамика изменения объема клеток, вакуолей и суммарного объема симбиосом.	103 107
Рис.27.	Уровень экспрессии генов группы MtVAMP7 в корнях и клубеньках разного возраста.	108 109
Рис.28.	GUS:промотор анализ экспрессии <i>MtVAMP721d</i> (А) и <i>MtVAMP721e</i> (Б) в клубеньках	
Рис.29	Распределение белка <i>MtVAMP721d</i> в клетках в процессе инфицирования (А) и в инфицированной клетке (Б).	
Рис.30	Уровень частичного блокирования экспрессии генов группы VAMP 72.	110
Рис.31.	Фенотип корневых клубеньков люцерны усеченной после нокаута генов <i>MtVAMP721e/d</i> (световая микроскопия).	111
Рис.32.	Фенотип корневого клубенька с частичным нокаутом генов <i>MtVAMP721e/d</i> (электронная микроскопия).	112

- Рис.33. Уровень экспрессии генов группы VAMP7 в клубеньках сои. 113
- Рис.34. Распределение белка GmVAMP721d в клетке клубенька сои в процессе инфицирования. 114
- Рис.35. Фенотип контрольных (А,Б) и трансгенных клубеньков сои, которые были получены при трансформировании конструктом для РНК-интерференции (В,Г),(световая микроскопия). 115
- Рис.36. Фенотип контрольных клубеньков сои (А,Б,В) и трансгенных клубеньков с нокадауном генов, которые были получены при трансформировании конструктом для РНК-интерференции (электронная микроскопия). 116
- Рис.37. Уровень азотфиксирующей активности в клубеньках с частичным блокированием экспрессии GmVAMP721d/a. 117
- Рис.38. Распределение каллозы в клеточных стенках контрольных клубеньков (А) и трансгенных клубеньков с частично блокированной экспрессией генов GmVAMP721 (Б,В). 118
- Рис.39. Метил-эстерифицированный пектин и целлюлоза в клубеньках сои 119
- Рис.40. Отсутствие ко-локализации метил-эстерифицированного пектина и белка VAMP721d. 120

Рис.41.	Ко-локализация пектат лиазы и белка VAMP721d (А) и локализация белка пектат-лиазы (Б).	121
Рис.42.	Экспрессия ProMtSyt1:GUS, ProMtSyt2:GUS и ProMtSyt:GUS в клубеньках методом GUS	125 126
Рис.43	Анализ экспрессии синаптотагминов в клубеньках и корнях	
Рис.44.	Анализ на изгиб корня, проведенный на трансгенных корнях, экспрессирующих <i>ProMtSyt1:GUS</i>	126
Рис.45.	Распределение белков синаптотагминов в корне и корневом клубеньке методом иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии	127
Рис.46.	Уровень блокирования экспрессии для MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3, оцененный с помощью q-PCR анализа трансгенных клубеньков с двойным блокированием.	129
Рис. 47.	Фенотип клубеньков при частичном блокировании экспрессии для MtSyt1, MtSyt2 и MtSyt3.	129
Рис. 48.	Электронно-микроскопический иммуноанализ распределения синаптотагмина в клетках корневого клубенька.	131
Рис.49	Эноплазматический ретикулум в инфицированной клетке, слияние с симбиосомой.	132
Рис.50.	Расположение актиновых микрофиламентов в клубеньке в процессе развития симбиоза.	142

Рис.51	Экспрессия гена ARP3 по зонам развития клубенька.	143
Рис.52.	ПЦР анализ экспрессии гена ARP3 в клубеньках разного возраста.	143
Рис.53.	Распределение белка ARP3 в инфицированной клетке.	144
Рис.54.	Иммунолокализация белка ARP3 методом электронной микроскопии с использованием коллоидного золота.	145
Рис.55.	Анализ ПЦР по уровню экспрессии ARP3 в контроле и клубеньках с частичным блокированием экспрессии ARP3.	146
Рис. 56.	Паттерн актина в инфицированной (ИК) и неинфицированной (Н) клетке клубеньков, собранных с трансгенных корней, при частичном блокировании экспрессии гена методом РНК-интерференции в инфицированной клетке.	147
Рис. 57.	Фенотип корневых клубеньков при частичном блокировании экспрессии ARP3.	148
Рис.58	Распределение иона калия в вакуолях и симбиосомах молодых (м), зрелых (з) и старых (с) клеток корневых клубеньков.	150
Рис.59	Уровень экспрессии генов MtAKT1(А) и MtSKOR/GORK (Б) по зонам развития корневых клубеньков.	153
Рис 60.	Распределение активности промотора MtAKT1в клубеньках и корнях методом окраски β-глюкоронидазы.	154

- Рис.61. Иммуноцитологический анализ распределения белка MtAKT1 в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька 155
- Рис.62. Распределение белка MtSKOR/GORK в клетках корневого клубенька. 156
- Рис.63. Иммунолокализация белка АКТ1 (А) и белка SKOR (Б) в корневых клубеньках люцерны усеченной с использованием метки коллоидным золотом. 157
- Рис.64. Изменения в содержании и распределении ионов натрия (Na) и калия (K) в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька при солевом стрессе 163
- Рис.65. Иммуноцитологический анализ распределения белка NHX7 в клетках корневого клубенька. Схема распределения белка MtNHX7 в клетках клубенька. 166
- Рис.66. Иммуноцитологический анализ распределения белка MtNHX6 в корневом клубеньке, конфокальная микроскопия, схема распределения белка MtNHX6 в клетках клубенька 168
- Рис.67. Иммуноцитологический анализ распределения белков MtNHX7 и (А) и MtNHX6 (Б), метка коллоидным золотом. 169

Рис.68. Уровень экспрессии генов группы NHX и генов, 171 участвующих в транспорте калия при солевом стрессе. Экспрессия гена NifH показывает уровень снижения азотфиксации в клубеньках, подвергшихся солевому стрессу.

Благодарности

Я признательна Дмитрию Анатольевичу Лосю, директору ИФР им. К.А.Тимирязева РАН, за создание и поддержку Группы растительно-микробных взаимодействий.

За помощь и поддержку моей работы я очень благодарна коллегам из ИФРа: Владимиру Васильевичу Кузнецову, Павлу Павловичу Пашковскому, Александру Валерьевичу Карташову, Ирине Васильевне Голденковой-Павловой, Марине Сергеевне Трофимовой, Наталье Викторовне Загоскиной, Георгию Александровичу Романову, Виктору Васильевичу Кузнецову, Юрию Владимировичу Балнокину, Александру Владимировичу Носову.

Моя сердечная благодарность за моральную поддержку моим подругам Марине Ивановне Азаркович и Ирине Анатольевне Гетман.

За помощь со световой и электронной микроскопией я очень признательна Зав.отделом микроскопии ИФР Александру Сергеевичу Воронкову.

Я благодарю моих соавторов из Курчатовского института: М. Преснякова, Р. Камышинского за разрешение работать на приборах и помощь.

Моя благодарность сотруднику лаборатории молекулярной микробиологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (Пушино) Т.В.Ивашиной за методическую помощь и поддержку.

Я очень благодарна моим бывшим студентам и аспирантам Сергею Иванову и Александру Гаврину за участие в проектах, трудолюбие и упорство.

Большое спасибо сотрудникам Группы растительно-микробных взаимодействий М.Г.Семеновой, А.Н.Петиной, и бывшим сотрудникам Н.А.Трифоновой, М.И.Королевой.

Светлой памяти моего учителя – Генриетты Яновны Жизневской.

Список литературы

1. Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., Жуков В.А., Неманкин Т.А., Наумкина Т.С., Пинаев А.Г., Ахтемова Г.А., Ворошилова В.А., Овчинникова Е.С., Рычагова Т.С.(2011) Взаимодействие бобовых с полезными почвенными микроорганизмами: от генов растений к сортам // Сельскохозяйственная биология. № 3. С. 41.
2. Грачев Д.И., Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. (2021) Нитрозильные комплексы гемоглобина в различных модельных системах. Биофизика. том 66, № 6, с. 1056-1064. doi: 10.31857/S0006302921060028.
3. Долгих Е.А., Кириенко А.Н., Ковалева О.Д., Тихонович И.А.(2017). Изучение биохимической функции рецептор-подобных киназ гороха *sym10*, *sym37* и *k1*, необходимых для развития бобово-ризобиального симбиоза. Экологическая генетика. Т. 15, № 4., С. 4-12. doi: 10.178816/ecogen1544-12.
4. Жуков В. А., Рычагова Т. С., Штарк О. Ю., Борисов А. Ю., Тихонович И.А. (2008) Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями». Экологическая генетика. Том 6, № 4, , стр. 10-12.УДК 58.085,575.11,579.0.
5. Жуков В.А., Штарк О.Ю., Неманкин Т.А., Крюков А.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А.(2016) Генетическое картирование симбиотических генов гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Сельскохозяйственная биология, Т.51, №5, С.593-601.
6. Иванова К.А., Цыганов В.Е.(2014). Защитные реакции в бобово-ризобиальном симбиозе: индукция и супрессия (обзор) // Сельскохозяйственная биология. № 3. с. 3-12, doi:10.15389/agrobiology.2014.3.3rus.
7. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф.(2019) Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции. Прикладная биохимия и микробиология, издательство ФГБУ "Издательство "Наука" (Москва), т.55, № 2, с.107-123, doi: 10.1134/S0555109919020090.
8. Проворов Н.А., Борисов А.Тихонович И.А.(2002) Сравнительная генетика и эволюционная мифология симбиоза, формируемого растениями с азотфиксирующими микробами и эндомикорризовыми грибами. Журнал общей биологии, 63(6):451-72.PMID: 12510586.
9. Проворов Н. А. , Жуков В. А., Курчак О. Н., Онищук О. П., Андронов Е. Е., Борисов А. Ю., Чижевская Е. П., Наумкина Т. С., Овцына А. О., Воробьев Н. И. ,Симаров Б. В., Тихонович И. А. (2013) Совместная миграция клубеньковых бактерий и бобовых растений в новые местообитания: механизмы коэволюции и практическое значение (Обзор). Прикладная биохимия и микробиология. т 49 №3, doi.org/10.7868/s0555109913030148.
10. Серова Т.А., Цыганов В.Е.(2014). Старение симбиотического клубенька у бобовых растений: молекулярно-генетические и клеточные аспекты (обзор). Сельскохозяйственная биология, № 3. с. 3-15. doi: 10.15389/agrobiology.2014.5.3rus.
11. Сидорова К. К., Гляненко М. Н., Мищенко Т. М. , Власова Е. Ю., Шумный В. К.(2015) Симбиотическая фиксация атмосферного азота у бобовых растений как

генетико- селекционный признак. Вавиловский журнал генетики и селекции т.19, № 1 doi.org/10.18699/VJ15.005.

12. Тихонович И.А., Андронов Е.Е., Борисов А.Ю., Долгих Е.А., Жернаков А.И., Жуко В.А., Проворов Н.А., Румянцев М.Л., Симаров Б.В.(2015) Принцип дополнительности геномов в расширении адаптационного потенциала растений. Генетика, т.51, № 9, 973-90. doi.org/10.7868/S001667581509012X.

13. 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.(2010) Анализ двойных мутантных линий для определения последовательности функционирования генов гороха (*Pisum sativum* L.) Sym13, Sym33 и Sym40 во время развития симбиотического клубенька // Экологическая генетика. т. 8, № 2. с. 3-8. ISSN 1811-0932.

14. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. (2019) Организация эндоплазматического ретикулума в клетках эффективных и неэффективных клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) Экологическая генетика. т. 17, № 4 doi: <https://doi.org/10.17816/ecogen1745-14>.

15. Шумаев К.Б., Грачев Д.И., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. (2024) Восстановительное нитрозилирование гемоглобина и миоглобина и его антиоксидантное действие. Биофизика, издательство ФГБУ "Издательство"Наука" (Москва), том 69, № 2, с. 230-236 doi :10.31857/S0006302924020027.

16. Abreu I.; Saéz, Á.; Castro-Rodríguez, R.; Escudero, V.; Rodríguez-Haas, B.; Senovilla, M.; Larue, C.; Grolimund, D.; Tejada Jiménez, M.; Imperial, J.; *et al.* (2017) *Medicago truncatula* Zinc-Iron Permease6 provides zinc to rhizobia-infected nodule cells. *Plant Cell Environ.* (2017) 40, 2706–2719. doi: 10.1111/pce.13035.

17. Adem GD, Chen G, Shabala L, Chen ZH, Shabala S. (2020) GORK Channel: A Master Switch of Plant Metabolism? *Trends Plant Sci.* 25(5):434-445. doi: 10.1016/j.tplants.2019.12.012.

18. Andrews M, Andrews ME. (2017) Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int J Mol Sci.* 26;18(4):705. doi:10.3390/ijms18040705.

19. Al-Harrasi I.; Jana, G.A.; Patankar, H.; Al-Yahyai, R.; Rajappa, S.; Kumar, P.P.; Yaish, M.W. (2020) A novel tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter gene from date palm (*PdNHX6*) confers enhanced salt tolerance response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.*, 39, 1079–1093., doi: 10.1007/s00299-020-02549-5.

20. An R.; Chen, Q.J.; Chai, M.F.; Lu, P.L.; Su, Z.; Qin, Z.X. (2007) AtNHX8, a member of the monovalent cation:proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li⁺/H⁺ antiporter. *Plant J.*, 49, 718–728. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02990.x.

21. Anschütz, U.; Becker, D.; Shabala, S. (2014) Going beyond nutrition: Regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *J. Plant Physiol.*, 171, 670–687. doi: 10.1016/j.jplph.2014.01.009.

22. Apodaca, G. (2002) Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282, F179–F190, doi: 10.1152/ajprenal.2002.282.2.F179

23. Archibald J. M. (2015) Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Curr. Biol.*, 25, R911–R921. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.055.

24. Aspenstrom P. (2010) Formin-binding proteins: Modulators of formin- dependent actin polymerization. *BBA-Mol. Cell Res.*, 1803:174-182, doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.06.002.
25. Avisar D., Abu-Abied, M., Belausov, E., Sadot, E., Hawes, C., and Sparkes, I. A.(2009) A comparative study of the involvement of 17 Arabidopsis myosin family members on the motility of Golgi and other organelles. *Plant Physiol.*, 150, 700-709. doi: 10.1104/pp.109.136853.
26. Azarakhsh M., A N Kirienko, V A Zhukov, M A Lebedeva, E A Dolgikh, L A Lutova.(2015) KNOTTED1-LIKE HOMEBOX 3: a new regulator of symbiotic nodule development. *J Exp Bot.*;66(22):7181-95. doi: 10.1093/jxb/erv414. DOI: 10.1093/jxb/erv414.
27. Balderhaar H.J.K., Ungermann, C. (2013) CORVET and HOPS tethering complexes – coordinators of endosome and lysosome fusion. *J. Cell Science*, 126, 1307-1316.doi: 10.1242/jcs.107805.
28. Barany I, Fadon B, Risueno MC, Testillano PS. (2010) Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *J. Experimental Botany*, 61: 1159–1175, doi: 10.1093/jxb/erp392.
29. Barragán V.; Leidi, E.O.; Andrés, Z.; Rubio, L.; De Luca, A.; Fernández, J.A.; Cubero, B.; Pardo, J.M. (2012) Ion Exchangers NHX1 and NHX2 Mediate Active Potassium Uptake into Vacuoles to Regulate Cell Turgor and Stomatal Function in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24, 1127–1142.doi: 10.1105/tpc.111.095273.
30. Barrett-Lennard E.G.; Shabala, S.N. (2013) The waterlogging/salinity interaction in higher plants revisited–focusing on the hypoxia induced disturbance to K⁺ homeostasis. *Funct. Plant Biol.* 40, 872–882. doi: 10.1071/FP12235.
31. Bassham D.C.; Blatt, M.R. (2008) SNAREs: Cogs and coordinators in signaling and development. *Plant Physiol.*, 147, 1504–1515. doi: 10.1104/pp.108.121129.
32. Bassil E.; Ohto, M.-A.; Esumi, T.; Tajima, H.; Zhu, Z.; Cagnac, O. (2011) The *Arabidopsis* Intracellular Na⁺/H⁺ Antiporters NHX5 and NHX6 Are Endosome Associated and Necessary for Plant Growth and Development. *Plant Cell*, 23, 224–239. doi: 10.1105/tpc.110.079426.
33. Bassil E.; Tajima, H.; Liang, Y.-C.; Ohto, M.-A.; Ushijima, K.; Nakano, R. (2011) The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ Antiporters NHX1 and NHX2 control Vacuolar pH and K⁺ Homeostasis to Regulate Growth, Flower Development, and Reproduction. *Plant Cell*, 23, 3482–3497. doi: 10.1105/tpc.111.089581.
34. Bassil E.; Zhang, S.; Gong, H.; Tajima, H.; Blumwald, E. (2018) Cation Specificity of Vacuolar NHX-Type Cation/H⁺ Antiporters. *Plant Physiol.*, 179, 616–629.doi: 10.1104/pp.18.01103.
35. Basso TS, Vita-Santos E, Marisco G, Pungartnik C, Brendel M. (2016) Changes in cellular infrastructure after induced endoplasmic reticulum stress in *Moniliophthora perniciosa*. *Mycologia.*;108(5):869-881. doi:10.3852/14-234.
36. Becana M, Wienkoop S, Matamoros MA. (2018) Sulfur Transport and Metabolism in Legume Root Nodules. *Front Plant Sci.*,10;9:1434. doi: 10.3389/fpls.2018.01434. eCollection 2018.

37. Behnia R., and Munro, S. (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438: 597–604, doi: 10.1038/nature04397.
38. Bellucci M.; De Marchis, F.; Pompa, A. (2017) The endoplasmic reticulum is a hub to sort proteins toward unconventional traffic pathways and endosymbiotic organelles. *J. Exp. Bot.*, 69, 7–20, doi: 10.1093/jxb/erx286.
39. Benavente JL, Siliqi D, Infantes L, Lagartera L, Mills A, Gago F, Ruiz-López N, Botella MA, Sánchez-Barrena MJ, Albert A. (2021) The structure and flexibility analysis of the Arabidopsis synaptotagmin 1 reveal the basis of its regulation at membrane contact sites. *Life Sci Alliance.*,18;4(10):e202101152. doi: 10.26508/lsa.202101152.
40. Benedito V.; Torez-Jerez, I.; Murray, J.; Andriankaja, A.; Allen, S.; Kakar, K.; Wandrey, M.; Verdier, J.; Zuber, H.; Ott, T.; *et al.* (2008) A gene expression at the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.*, 55, 504–513. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03519.x.
41. Bergersen FJ. (1982). Anatomy and structure of nodules. In: *Root nodule of legumes: structure and functions*. Baldock, UK: Research Studies Press, 23–50.
42. Berrabah F, Bernal G, Elhosseyn AS, El Kassis C, L'Horset R, Benaceur F, Wen J, Mysore KS, Garmier M, Gourion B, Ratet P, Gruber V. (2023) Insight into the control of nodule immunity and senescence during *Medicago truncatula* symbiosis. *Plant Physiol.*, 2;191(1):729-746. doi: 10.1093/plphys/kiac505.
43. Booth N.J.; Smith, P.M.C.; Ramesh, S.A.; Day, D.A. (2021) Malate Transport and Metabolism in Nitrogen-Fixing Legume Nodules. *Molecules*, 26, 6876. doi: 10.3390/molecules26226876.
44. Borchers AC, Langemeyer L, Ungermann C. (2021) Who's in control? Principles of Rab GTPase activation in endolysosomal membrane trafficking and beyond. *J Cell Biol.* 6;220(9): e202105120. doi: 10.1083/jcb.202105120.
45. Bosch M, Cheung AY, Hepler PK. 2005. Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol.* 138: 1334–1346, doi: 10.1104/pp.105.059865.
46. Bozkurt T. O., Richardson, A., Dagdas, Y. F., Mongrand, S., Kamoun, S., and Raffaele, S. (2014) The plant membrane-associated REMORIN1.3 accumulates in discrete periaustorial domains and enhances susceptibility to *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 165, 1005–1018. doi: 10.1104/pp.114.235804.
47. Brear E.M.; Bedon, F.; Gavrin, A.; Kryvoruchko, I.S.; Torres-Jerez, I.; Udvardi, M.K.; Day, D.A.; Smith, P.M.C. (2020). GmVTL1a is an iron transporter on the symbiosome membrane of soybean with an important role in nitrogen fixation. *New Phytol.*, 228, 667–681. doi: 10.1111/nph.16734.
48. Brewin N. J. (2004). Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 23, 293–316, PMID: 1809347.
49. Brewin NJ. (1991) Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol.*;7:191-226. doi:10.1146/annurev.cb.07.110191.001203.
50. Hoffman B.M., Lukoyanov D, Zhi-YongYang, DennisR. Dean, Lance C. Seefeld. (2014) Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. *Bioinorganic Enzymology/ dx.doi.org/10.1021/cr400641x | Chem. Rev.* 2014, 114, 4041–4062.

51. Brown S., Renaudin, J.P., Prévot, C., and Guern, J. (1984) Flow Cytometry and Sorting of Plant Protoplasts: Technical Problems and Physiological Results from a Study of pH and Alkaloids in *Catharanthus roseus*, *Physiol.Vég.*, 22, pp. 541–554.
52. Bu F., Rutten L., Roswanjaya Y.P., Kulikova O., Rodriguez-Franco M, Ott T, Bisseling T, van Zeijl A, Geurts R. (2020) Mutant analysis in the nonlegume *Parasponia andersonii* identifies NIN and NF-YA1 transcription factors as a core genetic network in nitrogen-fixing nodule symbioses. *New Phytol.* 226(2):541-554. doi: 10.1111/nph.16386.
53. Cabeza R., Koester, B., Liese, R., Lingner, A., Baumgarten, V., Dirks, J. *et al.* (2014) An RNA sequencing transcriptome analysis reveals novel insights into molecular aspects of the nitrate impact on the nodule activity of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 164, 400–411, doi: 10.1104/pp.113.228312.
54. Campellone K. G., Welch, M. D. (2010) A nucleator arms race: Cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:237-251. doi: 10.1038/nrm2867.
55. Cao Y, Halane MK, Gassmann W, Stacey G. (2017) The Role of Plant Innate Immunity in the Legume-Rhizobium Symbiosis. *Annu Rev Plant Biol.* 68:535-561. doi:10.1146/annurev-arplant-042916-041030.
56. Capoen W, Oldroyd G, Goormachtig S, Holsters M. (2010) *Sesbania rostrata*: a case study of natural variation in legume nodulation. *New Phytol.*, 186(2):340-5. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03124.x.
57. Cárdenas L.; Vidali, L.; Domínguez, J.; Pérez, H.; Sánchez, F.; Hepler, P.K.; Quinto, C. (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* 116, 871–877. doi: 10.1104/pp.116.3.871.
58. Castanheira S, García-Del Portillo F. (2017) Salmonella Populations inside Host Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:432. doi: 10.3389/fcimb.2017.00432.
59. Catalano CM, Czymmek KJ, Gann JG, Sherrier DJ. (2007) *Medicago truncatula* syntaxin SYP132 defines the symbiosome membrane and infection droplet membrane in root nodules. *Planta*, 225:541–550. doi: 10.1007/s00425-006-0369-y.
60. Cavalier-Smith T., Lee J. J. (1985) Protozoa as hosts for endosymbioses and the conversion of symbionts into organelles. *J. Protozool.*, 32, 376–379. doi: 10.1111/j.1550-7408.1985.tb04031.x.
61. Cermola M, Fedorova E, Taté R, Riccio A, Favre R, Patriarca E.J. (2000) Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact.* 13(7):733-41. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.7.733.
62. Chakraborty S., Harris J. M. (2022) At the Crossroads of Salinity and Rhizobium-Legume Symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact.* 35(7):540-553. doi: 10.1094/MPMI-09-21-0231-FI.
63. Chakraborty S.; Driscoll, H.E.; Abrahante, J.E.; Zhang, F.; Fisher, R.F.; Harris, J.M. (2021) Salt Stress Enhances Early Symbiotic Gene Expression in *Medicago truncatula* and Induces a Stress-Specific Set of Rhizobium-Responsive Genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 34, 904–921. doi: 10.1094/MPMI-01-21-0019-R.

64. Chanroj S.; Wang, G.; Venema, K.; Zhang, M.W.; Delwiche, C.F.; Sze, H. (2012) Conserved and Diversified Gene Families of Monovalent Cation/H⁺ Antiporters from Algae to Flowering Plants. *Front. Plant Sci.*, 3, 25. doi: 10.3389/fpls.2012.00025.
65. Chapman M. J., Margulis L. (1998) Morphogenesis by symbiogenesis. *Int. Microbiol.*, 1, 319–326. PMID: 10943381.
66. Chiasson DM, Loughlin PC, Mazurkiewicz D, Mohammadidehcheshmeh M, Fedorova EE, Okamoto M, McLean E, Glass AD, Smith SE, Bisseling T, Tyerman SD, Day DA, Kaiser BN. (2014) Soybean SAT1 (Symbiotic Ammonium Transporter 1) encodes a bHLH transcription factor involved in nodule growth and NH₄⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(13):4814-9. doi: 10.1073/pnas.1312801111.
67. Chungopast S.; Hirakawa, H.; Sato, S.; Handa, Y.; Saito, K.; Kawaguchi, M.; Tajima, S.; Nomura, M. (2014) Transcriptomic profiles of nodule senescence in *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti* symbiosis. *Plant Biotechnol.* 31, 345–349. doi: 10.1073/pnas.1913349117.
68. Clarke V. C., Loughlin P. C. Gavrín A., Chen C., Brear E. M., Day D. A., Smith P. M.C. (2015) Proteomic Analysis of the Soybean Symbiosome Identifies New Symbiotic Proteins. *Molecular and Cellular Proteomics*. Volume 14, Issue 5, 1301-1322, <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.043166>.
69. Clarke V.C.; Loughlin, P.C.; Day, D.A.; Smith, P.M.C. (2014) Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Front. Plant Sci.*, 5, 699. doi: 10.3389/fpls.2014.00699.
70. Co P, Selkig J, Knodler LA, Rettel M, Stein F, Fernandez K, Viéitez C, Potel CM, Scholzen K, Geyer M, Rottner K, Steele-Mortimer O, Savitski MM, Holden DW, Typas A. (2021) Global mapping of *Salmonella enterica*-host protein-protein interactions during infection. *Cell Host Microbe.*, 11;29(8):1316-1332.e12. doi: 10.1016/j.chom.2021.06.004.
71. Coba de la Peña T, Fedorova E, Pueyo JJ, Lucas MM. (2018) The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen Fixing Organelle? *Front. Plant Sci.*, 22;8:2229. doi: 10.3389/fpls.2017.02229.
72. Collmer A, Ried JL, Mount MS. (1988). Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzymology*, 161: 329–335.
73. Cooper S.T.; McNeil, P.L. (2015) Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 95, 1205–1240. doi: 10.1152/physrev.00037.2014.
74. Cardenas L, Vidali L, Domnguez J, *et al.* (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to rhizobium etli nodulation signals. *Plant Physiol.* 116(3):871-877. doi:10.1104/pp.116.3.871.
75. Davidson A.L., Newcomb W. (2001) Changes in actin microfilament arrays in developing pea root nodule cells. *Can. J. Bot.*, 79, 767-776, doi:10.1139/b01-046.
76. De Ruijter, N.C.A.; Bisseling, T.; Emons, A.M.C. (1999) Rhizobium Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 829–832.
77. De Zélicourt A, Diet A, Marion J, Laffont C, Ariel F, Moison M, Zahaf O, Crespi M, Gruber V, Frugier F. (2012) Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC

- transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *Plant J.*, 70(2):220-30. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04859.x.
78. Demidchik V. (2014) Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells. *J. Plant Physiol.*, 171, 696–707. doi: 10.1016/j.jplph.2014.01.015.
79. Demidchik V. (2018) ROS-Activated Ion Channels in Plants: Biophysical Characteristics, Physiological Functions and Molecular Nature. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 1263. doi: 10.3390/ijms19041263.
80. Denison R.F.; Okano, Y. (2003) Leghaemoglobin oxygenation gradients in alfalfa and yellow sweet clover nodules. *J. Exp. Bot.*, 54, 1085–1091. doi: 10.1093/jxb/erg097.
81. Deng J., Zhu F., Liu J., Zhao Y, Wen J, Wang T, Dong Ji. (2019) Transcription Factor bHLH2 Represses CYSTEINE PROTEASE77 to Negatively Regulate Nodule Senescence. *Plant Physiol.*, 181(4):1683-1703. doi: 10.1104/pp.19.00574.
82. Desbrosses G, Kopka C, Ott T, Udvardi MK. (2004) Lotus japonicus LjKUP is induced late during nodule development and encodes a potassium transporter of the plasma membrane. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 789–797. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.7.789.
83. Desbrosses GJ, Stougaard J. (2011) Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host Microbe.*;10(4):348-358, doi:10.1016/j.chom.2011.09.005.
84. Ding X, Zhang X, Otegui MS. (2018) Plant autophagy: new flavors on the menu. *Curr Opin Plant Biol.* 46:113-121. doi: 10.1016/j.pbi.2018.09.004.
85. Dolgikh EA, Leppyanen IV, Osipova MA, Savelyeva NV, Borisov AY, Tsyganov VE, Geurts R, Tikhonovich IA. (2011) Genetic dissection of Rhizobium-induced infection and nodule organogenesis in pea based on ENOD12A and ENOD5 expression analysis. *Plant Biol (Stuttg.)*, 13(2):285-96. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00372.x.
86. Dolgikh EA, Kusakina PG, Kitaeva AB, Tsyganova AV, Kirienko AN, Leppyanen IV, Dolgikh AV, Ilina EL, Demchenko KN, Tikhonovich IA, Tsyganov VE. (2020) 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. *Ann Bot.*, 13;125(6):905-923. doi: 10.1093/aob/mcaa022.
87. Dobrenel T., Caldana C., Hanson J., Robaglia C., Vincentz M., Veit B., Meyer C. (2016) TOR signaling and nutrient sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 67, 261-285. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114648.
88. Domínguez-Ferreras, A.; Muñoz, S.; Olivares, J.; Soto, M.J.; Sanjuán, J. (2009) Role of Potassium Uptake Systems in Sinorhizobium meliloti Osmoadaptation and Symbiotic Performance. *J. Bacteriol.* 191, 2133–2143. doi: 10.1128/JB.01567-08.
89. Douglas A. E., Raven J. A. (2003). Genomes at the interface between bacteria and organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 358, 5–18. doi:10.1098/rstb.2002.1188
90. Downie JA, Walker SA. (1999) Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol.* (6):483-9. doi: 10.1016/s1369-5266(99)00018-7.
91. Dragwidge J.M.; Scholl, S.; Schumacher, K.; Gendall, A.R. (2019) NHX-type Na⁺(K⁺)/H⁺ antiporters are required for TGN/EE trafficking and endosomal ion homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* 132, doi: 10.1242/jcs.226472.

92. Drain A, Thouin J, Wang L, Boeglin M, Pauly N, Nieves-Cordones M, Gaillard I, Véry AA, Sentenac H. (2020). Functional characterization and physiological roles of the single Shaker outward K⁺ channel in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 102, 1249–1265, doi: 10.1111/tpj.14697.
93. Drew GC, Stevens EJ, King KC. (2021) Microbial evolution and transitions along the parasite-mutualist continuum. *Nat Rev Microbiol.*, 19(10):623-638. doi:10.1038/s41579-021-00550-7.
94. Drøbak BK, Franklin-Tong VE, Staiger CJ. (2003) The role of the actin cytoskeleton in plant cell signalling. *New Phytologist*, 163, 13–30. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01076.x.
95. Dupont L., Alloing, G., Pierre, O., Msehli, S.E., Hopkins, J., Hérouart, D.P.F. (2012) The legume root nodule: From symbiotic nitrogen fixation to senescence. In *Senescence*, T. Nagata, ed (InTech), pp. 137–168.
96. Duscha K.; Rodrigues, C.M.; Müller, M.; Wartenberg, R.; Fliegel, L.; Deitmer, J.W. (2020), 14-3-3 Proteins and Other Candidates form Protein-Protein Interactions with the Cytosolic C-terminal End of SOS1 Affecting Its Transport Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 21,3334. doi: 10.3390/ijms21093334.
97. Dyall S. D., Brown M. T., Johnson P. J. (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*, 304, 253–257. doi:10.1126/science.1094884.
98. Ebine K., and Ueda, T. (2009). Unique mechanism of plant endocytic/ vacuolar transport pathways. *J. Plant Res.*, 122: 21–30. doi: 10.1007/s10265-008-0200-x.
99. Ebine, K., Okatani, Y., Uemura, T., Goh, T., Shoda, K., Niihama, M., Terao Morita, M., Spitzer, C., Otegui, M.S., Nakano, A., and Ueda, T. (2008) A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 20: 3006–3021. doi: 10.1105/tpc.107.057711.
100. Escudero V.; Abreu, I.; Tejada-Jiménez, M.; Rosa-Núñez, E.; Quintana, J.; Prieto, R.I.; Larue, C.; Wen, J.; Villanova, J.; Mysore, K.S.; *et al.* (2020) *Medicago truncatula* Ferroportin2 mediates iron import into nodule symbiosomes. *New Phytol.* 228, 194–209. doi: 10.1111/nph.16642.
101. Esseling JJ, Lhuissier FG, Emons AM. (2004) A nonsymbiotic root hair tip growth phenotype in NORK-mutated legumes: implications for nodulation factor-induced signaling and formation of a multifaceted root hair pocket for bacteria. *Plant Cell*;16(4):933-44. doi: 10.1105/tpc.019653.
102. Etienne A., Génard, M., Lobit, P., Mbeguié-A-Mbégué, D., and Bugaud, C. (2013). What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *J Exp Bot.*, 64, 1451-1469. doi: 10.1093/jxb/ert035.
103. Fan L.; Zhao, L.; Hu, W.; Li, W.; Novák, O.; Strnad, M.; Simon, S.; Friml, J.; Shen, J.; Jiang, L.; *et al.* (2018) Na⁺, K⁺/H⁺ antiporters regulate the pH of endoplasmic reticulum and auxin-mediated development. *Plant Cell Environ.* 41, 850–864. doi: 10.1111/pce.13153.
104. Fedorova E, Redondo FJ, Koshiba T, de Felipe MR, Pueyo JJ, Lucas MM. (2005), 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*, 18, 405–413 doi: 10.1094/MPMI-18-0405.
105. Fedorova E, Thomson R, Whitehead LF, Maudoux O, Udvardi MK, Day DA. (1999); Localization of H(+) -ATPases in soybean root nodules. *Planta*. 209(1):25-32. doi: 10.1007/s004250050603. PMID: 10467028.
106. Fedorova E. E, Coba de la Peña T., Lara-Dampier V., Trifonova N., Kulikova O., Pueyo J. J, Lucas M. M. (2021) Potassium content diminishes in infected cells of *Medicago truncatula* nodules due to the mislocation of channels MtAKT1 and MtSKOR/GORK. *J Exp Bot.*, 24;72(4):1336-1348. doi:10.1093/jxb/eraa508. DOI: 10.1093/jxb/eraa508.
107. Fedorova E.E. (2023) Rapid Changes to Endomembrane System of Infected Root Nodule Cells to Adapt to Unusual Lifestyle. *Int J Mol Sci.*, 28;24(5):4647. doi: 10.3390/ijms24054647.
108. Fedorova EE, de Felipe MR, Pueyo JJ, Lucas MM. (2007) Conformation of cytoskeletal elements during the division of infected *Lupinus albus* L. nodule cells. *J Exp Bot.* 58(8):2225-2236. doi:10.1093/jxb/erm083.
109. Fedorova E.E, Pueyo J. (2024) Microbial Colonization of the Host Plant: Cellular and Molecular Mechanisms of Symbiosis. *Int J Mol Sci.*, 4;25(1):639. doi: 10.3390/ijms25010639. PMID: 38203809.
110. Fedorova E., Brown S. (2007) Cytochemistry of Proteolytic Activity and pH Status of Vacuoles in *Medicago truncatula* Root Nodules. ISSN 1021-4437, *Russian Journal of Plant Physiology*, Vol. 54, No. 1, pp. 25–31.
111. Ferguson, B.J.; Mens, C.; Hastwell, A.H.; Zhang, M.; Su, H.; Jones, C.H.; Chu, X.; Gresshoff, P.M. (2019) Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environ.* 42, 41–51. doi: 10.1111/pce.13348.
112. Ferrero S., Enrique Grados-Torrez R., Leivar P., Antolín-Llovera M., López-Iglesias C., Cortadellas N., Ferrer J.C, Campos N. (2015) Proliferation and Morphogenesis of the Endoplasmic Reticulum Driven by the Membrane Domain of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase in Plant Cells. *Plant Physiol.*, 168(3):899-914. doi: 10.1104/pp.15.00597.
113. Fukuda, A.; Nakamura, A.; Hara, N.; Toki, S.; Tanaka, Y. (2010) Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na⁺/H⁺ antiporter genes. *Planta* 233, 175–188. doi: 10.1007/s00425-010-1289-4.
114. Gao Z, Chen Z, Cui Y, Ke M, Xu H, Xu Q, Chen J, Li Y, Huang L, Zhao H, Huang D, Mai S, Xu T, Liu X, Li S, Guan Y, Yang W, Friml J, Petrášek J, Zhang J, Chen X. (2021) GmPIN-dependent polar auxin transport is involved in soybean nodule development. *Plant Cell.*, 24;33(9):2981-3003. doi: 10.1093/plcell/koab183.
115. García de la Torre VS, Coba de la Peña T, Pueyo JJ, Lucas MM (2021). Cadmium-Tolerant and -Sensitive Cultivars Identified by Screening of *Medicago truncatula* Germplasm Display Contrasting Responses to Cadmium Stress. *Front Plant Sci.*, 11; 12:595001. doi: 10.3389/fpls.2021.595001. eCollection 2021.
116. Gavrin A, Chiasson D, Ovchinnikova E, Kaiser BN, Bisseling T, Fedorova EE. (2016) VAMP721a and VAMP721d are important for pectin dynamics and release of bacteria in soybean nodules. *New Phytol.* 210(3):1011-21. doi: 10.1111/nph.13837.

117. Gavrin A, Jansen V, Ivanov S, Bisseling T, Fedorova E. (2015) ARP2/3-Mediated Actin Nucleation Associated with Symbiosome Membrane Is Essential for the Development of Symbiosomes in Infected Cells of *Medicago truncatula* Root Nodules. *Mol Plant Microbe Interact.*, 28(5):605-14. doi: 10.1094/MPMI-12-14-0402-R.
118. Gavrin A, Kulikova O, Bisseling T, Fedorova E.E. (2017). Interface Symbiotic Membrane Formation in Root Nodules of *Medicago truncatula*: the Role of Synaptotagmins MtSyt1, MtSyt2 and MtSyt3. *Front. Plant Sci.* 8:201. doi: 10.3389/fpls.2017.00201.
119. Gavrin A., Kaiser, B. N., Geiger, D., Tyerman, S. D., Wen, Z., Bisseling, T., & Fedorova, E. E. (2014) Adjustment of host cells for accommodation of symbiotic bacteria: vacuole defunctionalization, HOPS suppression, and TIP1g retargeting in *Medicago*. *Plant Cell*, 26(9), 3809–3822. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.128736>.
120. Gavrin A.; Loughlin, P.C.; Brear, E.; Griffith, O.W.; Bedon, F.; Grotemeyer, M.S.; Escudero, V.; Reguera, M.; Qu, Y.; Mohd-Noor, S.N.; *et al.* (2021) Soybean Yellow Stripe-like 7 is a symbiosome membrane peptide transporter important for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 186, 581–598. doi: 10.1093/plphys/kiab044.
121. Geurts R, Fedorova E, Bisseling T. (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol.* 8(4):346-52. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.013.
122. Geurts R, Huisman R. (2024) Innovations in two genes kickstarted the evolution of nitrogen-fixing nodules. *Curr Opin Plant Biol.* 77:102446. doi: 10.1016/j.pbi.2023.102446.
123. Geurts R, Xiao TT, Reinhold-Hurek B. (2016) What Does It Take to Evolve A Nitrogen-Fixing Endosymbiosis? *Trends Plant Sci.*, 21(3):199-208. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.012.
124. Geurts R., Lillo A., Bisseling T. (2012) Exploiting an ancient signalling machinery to enjoy a nitrogen fixing symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 438–443. doi: 10.1016/j.pbi.2012.04.004.
125. Ghosh P, Chakraborty J. (2024) Exploring the role of symbiotic modifier peptidases in the legume - rhizobium symbiosis. *Arch Microbiol.* 11;206(4):147. doi: 10.1007/s00203-024-03920-w.
126. Gil-Díez P.; Tejada-Jiménez, M.; León-Mediavilla, J.; Wen, J.; Mysore, K.S.; Imperial, J.; González-Guerrero, M. (2019) MtMOT1.2 is responsible for molybdate supply to *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell Environ.* 42, 310–320. doi: 10.1111/pce.13388.
127. Goggin DE, Lipscombe R, Fedorova E, Millar AH, Mann A, Atkins CA, Smith PM. (2003) Dual intracellular localization and targeting of aminoimidazole ribonucleotide synthetase in cowpea. *Plant Physiol.*;131(3):1033-41. doi: 10.1104/pp.102.015081. PMID: 12644656.
128. Gomez-Suaga P, Paillusson S, Stoica R, Noble W, Hanger DP, Miller CCJ. The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy (2017). *Curr Biol.* 27(3):371-385. doi: 10.1016/j.cub.2016.12.038.

129. Griesmann M., Chang, Y., Liu, X., Song, Y., Haberer, G., Crook, M. B., *et al.* (2018). Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science*, doi: 10.1126/science.aat 1743.
130. Grundy EB, Gresshoff PM, Su H, Ferguson BJ. (2023) Legumes Regulate Symbiosis with Rhizobia via Their Innate Immune System. *Int J Mol Sci.*, 24(3):2800. Published 2023. doi:10.3390/ijms24032800.
131. Gu X, Brennan A, Wei W, Guo G, Lindsey K. (2020) Vesicle Transport in Plants: A Revised Phylogeny of SNARE Proteins. *Evol Bioinform Online.* 15; 16:1176934320956575. doi: 10.1177/1176934320956575. eCollection 2020.
132. Guhathakurta P, Prochniewicz E, Thomas DD. (2018) Actin-Myosin Interaction: Structure, Function and Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 5;19(9):2628. doi: 10.3390/ijms19092628.
133. Guttenberg M. A. (2000), Rapid Staining Procedure for Arbuscules of Living Arbuscular Mycorrhiza Using Neutral Red as Acidotropic Dye. *Plant Soil*, 226, pp. 211–218.
134. Hanin M.; Ebel, C.; Ngom, M.; Laplaze, L.; Masmoudi, K. (2016) New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. *Front. Plant Sci.* 7, 1787. doi: 10.3389/fpls.2016.01787.
135. Harrison M.J.; Ivanov, S. (2017) Exocytosis for endosymbiosis: Membrane trafficking pathways for development of symbiotic membrane compartments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 101–108. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.019.
136. Hashimoto T. (2003) Dynamics and regulation of plant interphase microtubules: a comparative view. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 568–576. doi: 10.1016/j.pbi.2003.09.011.
137. Hayashi M, Parniske M. (2014) Symbiosis and pathogenesis: what determines the difference? *Curr Opin Plant Biol.*, 20: v-vi. doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.008.
138. Henriquez-Valencia C, Moreno AA, Sandoval-Ibañez O, *et al.* (2015) bZIP17 and bZIP60 Regulate the Expression of BiP3 and Other Salt Stress Responsive Genes in an UPR-Independent Manner in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biochem.* 116(8):1638-1645. doi:10.1002/jcb.25121. (BIP2).
139. Hernandez-Encarnacion L, Sharma P., Simon R., Zhou A. (2017) Condition-specific transcriptional regulation of neuronal ion channel genes in brain ischemia. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 9(6):192-201. PMID: 29348796 PMCID: PMC5770516.
140. Herweg JA, Hansmeier N, Otto A, Geffken AC, Subbarayal P, Prusty BK, Becher D, Hensel M, Schaible UE, Rudel T, Hilbi H. (2015) Purification and proteomics of pathogen-modified vacuoles and membranes. *Front Cell Infect Microbiol.* 2;5:48. doi: 10.3389/fcimb.2015.00048. eCollection 2015.
141. Hidalgo-Castellanos J, Duque AS, Burgueño A, Herrera-Cervera JA, Fevereiro P, López-Gómez M. (2019) Overexpression of the arginine decarboxylase gene promotes the symbiotic interaction *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* and induces the accumulation of proline and spermine in nodules under salt stress conditions. *J Plant Physiol.*; 241:153034. doi: 10.1016/j.jplph.2019.153034.

142. Hlaváčková K, Šamaj J, Ovečka M. (2023) Cytoskeleton as a roadmap navigating rhizobia to establish symbiotic root nodulation in legumes. *Biotechnol Adv.* 69:108263. doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108263.
143. Hoffman BM, Lukoyanov D, Yang ZY, Dean DR, Seefeldt LC. (2014). Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chem Rev.* 114(8):4041-4062. doi:10.1021/cr400641x.
144. Honsbein, A., Sokolovski, S., Grefen, C., Campanoni, P., Pratelli, R., Panaque, M., Chen, Z., Johansson, I., and Blatt, M.R. (2009) A tripartite SNARE-K⁺ channel complex mediates in channel-dependent K⁺ nutrition in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21, 2859-2877. doi: 10.1105/tpc.109.066118.
145. Horváth B, Güngör B, Tóth M, Domonkos Á, Ayaydin F, Saifi F, Chen Y, Biró JB, Bourge M, Szabó Z, Tóth Z, Chen R, Kaló P. (2023) The *Medicago truncatula* nodule-specific cysteine-rich peptides, NCR343 and NCR-new35 are required for the maintenance of rhizobia in nitrogen-fixing nodules. *New Phytol.* 239(5):1974-1988. doi: 10.1111/nph.19097.
146. Hryvusevich P, Navaselsky I, Talkachova Y, *et al.* (2021) Sodium Influx and Potassium Efflux Currents in Sunflower Root Cells Under High Salinity. *Front Plant Sci.* 2021; 11:613936., doi:10.3389/fpls.2020.613936.
147. Huang L, Nazarova EV, Russell DG. (2019) *Mycobacterium tuberculosis*: Bacterial Fitness within the Host Macrophage. *Microbiol Spectr.*;7(2): 10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019.
148. Huisman R., Hontelez, J., Mysore, K. S., Wen, J., Bisseling, T., & Limpens, E. A (2016). Symbiosis-dedicated SYNTAXIN OF PLANTS 13II isoform controls the formation of a stable host-microbe interface in symbiosis. *New Phytol.*, 211(4), 1338–1351. <https://doi.org/10.1111/nph.13973>.
149. Hurth M.A., Suh, S.J., Kretschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., Martinoia, E., and Neuhaus, H.E. (2005). Impaired pH Homeostasis in Arabidopsis Lacking the Vacuolar Dicarboxylate Transporter and Analysis of Carboxylic Acid Transport across the Tonoplast. *Plant Physiol.*, 137, 901-910, doi: 10.1104/pp.104.058453.
150. Huynh K.K., and Grinstein, S. (2007) Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 452–462. doi: 10.1128/MMBR.00003-07.
151. Isayenkov S.V.; Dabravolski, S.A.; Pan, T.; Shabala, S. (2020) Phylogenetic Diversity and Physiological Roles of Plant Monovalent Cation/H⁺ Antiporters. *Front. Plant Sci.* 11, 573564. doi: 10.3389/fpls.2020.573564.
152. Islamov B., Petrova O., Mikshina P., Kadyirov A., Vorob'ev V., Gogolev Y., Gorshkov V. (2021) The Role of *Pectobacterium atrosepticum* Exopolysaccharides in Plant-Pathogen Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 22(23):12781. doi: 10.3390/ijms222312781.
153. Ivanov S, Fedorova E, Bisseling T. (2010). Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments. *Curr Opin Plant Biol.* 13(4):372-7. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.005.
154. Ivanov S, Fedorova EE, Limpens E, De Mita S, Genre A, Bonfante P, Bisseling T. (2012). Rhizobium-legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for

- arbuscule formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22;109(21):8316-21. doi: 10.1073/pnas.1200407109.
155. Ivanova KA, Chernova EN, Kulaeva OA, Tsyganova AV, Kusakin PG, Russkikh IV, Tikhonovich IA, Tsyganov VE. (2022) The Regulation of Pea (*Pisum sativum* L.) Symbiotic Nodule Infection and Defense Responses by Glutathione, Homoglutathione, and Their Ratio. *Front Plant Sci.* 13:843565. doi: 10.3389/fpls.2022.843565. eCollection 2022.
156. Ivanova KA, Tsyganova AV, Brewin NJ, Tikhonovich IA, Tsyganov VE. 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(6):1505-17. doi: 10.1007/s00709-015-0780-y.
157. Jaffe M. J., Leopold, A. C., and Staples, R. C. (2002) Thigmo responses in plants and fungi. *Am. J. Bot.*, 89, 375–382. doi: 10.3732/ajb.89.3.375.
158. Jahn R, Cafiso DC, Tamm LK. (2024) Mechanisms of SNARE proteins in membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;25(2):101-118. doi: 10.1038/s41580-023-00668-x.
159. Jahn R, Scheller RH. (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):631-643. doi:10.1038/nrm2002.
160. Jardinaud MF, Boivin S, Rodde N, Catrice O, Kisiala A, Lepage A, Moreau S, Roux B, Cottret L, Sallet E, Brault M, Emery RJ, Gouzy J, Frugier F, Gamas P.A. (2016) Laser Dissection-RNAseq Analysis Highlights the Activation of Cytokinin Pathways by Nod Factors in the *Medicago truncatula* Root Epidermis. *Plant Physiol.* 171(3):2256-76. doi: 10.1104/pp.16.00711.
161. Jarsch IK, Ott T. (2011) Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 24(1):7-12. doi: 10.1094/MPMI-07-10-0166. PMID: 21138374.
162. Jayaraman D, Gilroy S, Ané JM. (2014) Staying in touch: mechanical signals in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 20:104-109. doi:10.1016/j.pbi.2014.05.003.
163. Jiang S., Jardinaud M-F., Gao J., Pecrix Y., Wen J., Mysore K., Xu P., Sanchez-Canizares C., Ruan Y., Qiujiu Li, Zhu M., Li F., Wang E., Poole P.S., Gamas P., Murray J.D. (2021) NIN-like protein transcription factors regulate leghemoglobin genes in legume nodules. *Science.* 29;374(6567):625-628. doi: 10.1126/science. Abg 5945.
164. Jiang W.; Pan, R.; Buitrago, S.; Wu, C.; Abou-Elwafa, S.F.; Xu, Y.; Zhang, W. (2021) Conservation and divergence of the TaSOS1 gene family in salt stress response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 27, 1245–1260, doi: 10.1007/s12298-021-01009-y.
165. Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW, Hjuler CT, Gysel K, Muszyński A, Carlson RW, Thygesen MB, Sandal N, Asmussen MH, Vinther M, Andersen SU, Krusell L, Thirup S, Jensen KJ, Ronson CW, Blaise M, Radutoiu S, Stougaard J. (2015) Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature,* 16;523(7560):308-12. doi: 10.1038/nature14611.

166. Kho K, Cheng T, Buddelmeijer N, Boneca IG. (2024) When the Host Encounters the Cell Wall and Vice Versa. *Annu Rev Microbiol.* 17. doi: 10.1146/annurev-micro-041522-094053.
167. Keeling P. J., Archibald J. M. (2008) Organelle evolution: what's in a name? *Curr. Biol.* 18, R345–R347. doi: 10.1016/j.cub.2008.02.065.
168. Keeling P. J., McCutcheon J. P., Doolittle W. F. (2015). Symbiosis becoming permanent: survival of the luckiest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 10101–10103. doi: 10.1073/pnas.1513346112.
169. Ketelaar T. (2013) The actin cytoskeleton in root hairs: All is fine at the tip. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 749–756. doi: 10.1016/j.pbi.2013.10.003.
170. Kiers E. T., West S. A. (2015) Evolving new organisms via symbiosis. *Science*, 348, 392–394. doi: 10.1126/science.aaa9605.
171. Kirienko AN, Vishnevskaya NA, Kitaeva AB, Shtark OY, Kozyulina PY, Thompson R, Dalmais M, Bendahmane A, Tikhonovich IA, Dolgikh EA (2019). Structural Variations in LysM Domains of LysM-RLK PsK1 May Result in a Different Effect on Pea-Rhizobial Symbiosis Development. *Int J Mol Sci.* 1;20(7):1624. doi: 10.3390/ijms20071624.
172. Kitaeva A.B, Gorshkov A.P., Kusakin, P.G. Sadovskaya A.R., Tsyganova A.V. Tsyganov V.E. (2022) Tubulin cytoskeleton organization in cells of determinate nodules. *Front. Plant Sci.*, 13, p. 823183, doi: 10.3389/fpls.2022.823183.
173. Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Timmers A.C., Tsyganov V.E. (2016) 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 Phytol.* 210(1):168-83. doi: 10.1111/nph.13792.
174. Kitaeva A.B, Gorshkov AP, Kirichek EA, Kusakin PG, Tsyganova AV, Tsyganov VE. (2021) General Patterns and Species-Specific Differences in the Organization of the Tubulin Cytoskeleton in Indeterminate Nodules of Three Legumes. *Cells.* 25;10(5):1012. doi: 10.3390/cells10051012.
175. Kneip C., Lockhart P., Voß C., Maier U.-G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evol. Biol.*, 7:55. doi: 10.1186/1471-2148-7-55.
176. Kohlen W, Ng JLP, Deinum EE, Mathesius U. (2018) Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules. *J Exp Bot.* 69(2):229-244. doi:10.1093/jxb/erx308.
177. Kosmachevskaya OV, Nasybullina EI, Shumaev KB, Topunov AF. (2021) Expressed Soybean Leghemoglobin: Effect on *Escherichia coli* at Oxidative and Nitrosative Stress. *Molecules.* 28;26(23):7207. doi: 10.3390/molecules26237207.
178. Kosolapova AO, Antonets KS, Belousov MV, Nizhnikov A A. (2020). Biological Functions of Prokaryotic Amyloids in Interspecies Interactions: Facts and Assumptions. *Int J Mol Sci.* 30;21(19):7240. doi: 10.3390/ijms21197240.
179. Kuzmanović N, Fagorzi C, Mengoni A, Lassalle F, diCenzo GC. (2022) Taxonomy of Rhizobiaceae revisited: proposal of a new framework for genus delimitation. *Int J Syst Evol Microbiol.* 72(3):005243. doi: 10.1099/ijsem.0.005243.

180. Kravchenko U, Gogoleva N., Kalubaka N. Kruk A., Diubo Y., Gogolev Y. Nikolaichik Y. (2020) The PhoPQ Two-Component System Is the Major Regulator of Cell Surface Properties, Stress Responses and Plant-Derived Substrate Utilisation During Development of *Pectobacterium versatile*-Host Plant Pathosystems. *Front Microbiol.* 11:621391, doi: 10.3389/fmicb.2020.621391.
181. Kryvoruchko I.S.; Routray, P.; Sinharoy, S.; Torres-Jerez, I.; Tejada-Jiménez, M.; Finney, L.A.; Nakashima, J.; Pislariu, C.I.; Benedito V. A.; Gonzalez-Guerrero, M.; *et al.* (2018). An Iron-Activated Citrate Transporter, MtMATE67, Is Required for Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Physiol.* 176, 2315–2329. doi: 10.1104/pp.17.01538.
182. Kumar S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
183. Kurchak O.N.; Provorov, N.; Onishchuk, O.P.; Vorobyov, N.I.; Roumiantseva, M.L.; Simarov, B.V. (2014) Influence of salt stress on the genetically polymorphic system of *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago truncatula*. *Russ. J. Genet.* 50, 677–685 PMID: 25720135.
184. Kwon C, Lee JH, Yun HS. (2020). SNAREs in Plant Biotic and Abiotic Stress Responses. *Mol Cells.* 30;43(6):501-508. doi: 10.14348/molcells.2020.0007.
185. Kwon C., Neu, C., Pajonk, S., Yun, H.S., Lipka, U., Humphry, M., Bau, S., Straus, M., Kwaaitaal, M., Rampelt, H., *et al.* (2008) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature*, 451, 835-840. doi: 10.1038/nature06545.
186. Larrainzar E, Villar I, Rubio MC, Pérez-Rontomé C, Huertas R, Sato S, Mun JH, Becana M. (2020) Hemoglobins in the legume-Rhizobium symbiosis. *New Phytol.* 228(2):472-484. doi: 10.1111/nph.16673.
187. Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S. (2014) Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol Res.* 20;169(1):2-17. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.012.
188. Li P, Day B (2019) Battlefield Cytoskeleton: Turning the Tide on Plant Immunity. *Mol Plant Microbe Interact.* ;32(1):25-34. doi: 10.1094/MPMI-07-18-0195-FI 24. PMID: 30355064.
189. Lebedeva M.; Azarakhsh, M.; Sadikova, D.; Lutova, L. (2021) At the Root of Nodule Organogenesis: Conserved Regulatory Pathways Recruited by Rhizobia. *Plants* 10, 2654. <https://doi.org/10.3390/plants10122654>.
190. Ledermann R, Schulte CCM, Poole PS. (2021) How Rhizobia Adapt to the Nodule Environment. *J Bacteriol.* 20;203(12):e0053920. doi: 10.1128/JB.00539-20.
191. Lei Li, Liu K-h., Sheen J. (2021) Dynamic Nutrient Signaling Networks in Plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 37: 341–367. doi: 10.1146/annurev-cellbio-010521-015047
192. Leidi E.O.; Barragán, V.; Rubio, L.; El-Hamdaoui, A.; Ruiz, M.T.; Cubero, B. (2010) The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J.* 61, 495–506. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04073.x.
193. Levy A., Zheng, J. Y., and Lazarowitz, S. G. (2015) Synaptotagmin SYTA forms ER-plasma membrane junctions that are recruited to plasmodesmata for plant virus movement. *Curr. Biol.* , 3, 2018–2025. doi: 10.1016/j.cub.2015.06.015.

194. Liu J, Bisseling T. (2020) Evolution of NIN and NIN-like Genes in Relation to Nodule Symbiosis. *Genes (Basel)*. 11;11(7):777. doi: 10.3390/genes11070777.
195. Li B, Jiang L. (2023) Ufmylation bridges autophagy and ER homeostasis in plants. *Autophagy*. 19(10):2830-2831. doi:10.1080/15548627.2023.2203985.
196. Li W.; Xu, G.; Alli, A.; Yu, L. (2018) Plant HAK/KUP/KT K⁺transporters: Function and regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 74,133–141. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.009.
197. Li X, Liao J, Bai H, *et al.* (2022) Arabidopsis flowering integrator SOC1 transcriptionally regulates autophagy in response to long-term carbon starvation. *J Exp Bot.* 73(19):6589-6599. doi:10.1093/jxb/erac298.
198. Li Z, Howell SH. (2021) Review: The two faces of IRE1 and their role in protecting plants from stress. *Plant Sci.*; 303:110758. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110758.
199. Liang P, Schmitz C, Lace B, *et al.* (2021) Formin-mediated bridging of cell wall, plasma membrane, and cytoskeleton in symbiotic infections of *Medicago truncatula*. *Curr Biol.*;31(12):2712-2719.e5. doi: 10.1016/j.cub.2021.04.002.
200. Liang Y, Harris JM. (2005) Response of root branching to abscisic acid is correlated with nodule formation both in legumes and nonlegumes. *Am. J Bot.*;92(10):1675-83. doi: 10.3732/ajb.92.10.1675.
201. Libourel C, Keller J, Brichet L, *et al.* (2023) Comparative phylotranscriptomics reveals ancestral and derived root nodule symbiosis programmes. *Nat Plants*. 9(7):1067-1080. doi:10.1038/s41477-023-01441-w.
202. Lim P.O., Kim, H.J. & Nam, H.G. (2007) Effects of Different Potassium Stress on Leaf Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence in Maize. Leaf senescence. *Ann. Rev.Plant Biol.*, 58, 115–136.
203. Limpens E, Ivanov S, van Esse W, Voets G, Fedorova E, Bisseling T.(2009) *Medicago* N₂-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *Plant Cell*. 21(9):2811-28. doi: 10.1105/tpc.108.064410.
204. Limpens E, Mirabella R, Fedorova E, Franken C, Franssen H, Bisseling T, Geurts R. (2005) Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 19;102(29):10375-80. doi: 10.1073/pnas.0504284102.
205. Limpens E.; Ramos, J.; Franken, C.; Raz, V.; Compaan, B.; Franssen, H.; Bisseling, T.; Geurts, R. (2004) RNA interference in *Agrobacterium* rhizogenes-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.*, 55, 983–992. doi: 10.1093/jxb/erh122.
206. Lipka V., Kwon, C., and Panstruga, R. (2007) SNARE-Ware: The role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23: 147–174doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123529.
207. Liu H, Zhang C, Yang J, Yu N, Wang E. (2018) Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *J Integr Plant Biol.* 60(8):632-648. doi: 10.1111/jipb.12653.
208. Liu J, Rasing M, Zeng T, Klein J, Kulikova O, Bisseling T. (2021) NIN is essential for development of symbiosomes, suppression of defence and premature senescence in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.*;230(1):290-303. doi:10.1111/nph.17215.

209. Liu M.; Wang, T.; Zhang, W.-H. (2014) Sodium extrusion associated with enhanced expression of SOS1 underlies different salt tolerance between *Medicago falcata* and *Medicago truncatula* seedlings. *Environ. Exp. Bot.*, 110, 46–55. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.09.005.
210. Liu X, Yao Z, Jin M, *et al.* (2019) Dhh1 promotes autophagy-related protein translation during nitrogen starvation. *PLoS Biol.* 17(4): e3000219. doi: 10.1371/journal.pbio.3000219.
211. Lu Y. J., Schornack, S., Spallek, T., Geldner, N., Chory, J., Schellmann, S., *et al.* (2012). Patterns of plant subcellular responses to successful oomycete infections reveal differences in host cell reprogramming and endocytic trafficking. *Cell Microbiol.* 14, 682–697. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01751.x.
212. Luo Y.; Liu, W.; Sun, J.; Zhang, Z.-R.; Yang, W.-C. (2022) Quantitative proteomics reveals key pathways in the symbiotic interface and the likely extracellular property of soybean symbiosome. *J. Genet. Genom.* 50, 7–19. doi.org/10.1016/j.jgg.2022.04.004.
213. Matamoros M.A., Baird L.M., Escuredo P.R, Dalton D.A, Minchin F.R., Inñaki Iturbe-Ormaetxe, Rubio M.C., Moran J.F., Gordon A.J., Becana M. (1999) Stress-Induced Legume Root Nodule Senescence. Physiological, Biochemical, and Structural Alterations. *Plant Physiology*, 121, pp. 97–111, www.plantphysiol.org, doi: 10.1104/pp.121.1.97.
214. Margaret I, Lucas MM, Acosta-Jurado S, Fedorova E., Hidalgo Á. , Rodríguez-Carvajal M.A, Rodríguez-Navarro D.N. Ruiz-Sainz J. E, Vinardell J. M. (2013). The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules. *PLoS One.*;8(10): e74717. doi:10.1371/journal.pone.0074717.
215. Margulis L., Chapman M. J. (1998). Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. *Trends Microbiol.* 6, 342–345. doi:10.1016/S0966-842X(98)01325-0;
216. Martínez-Atienza J.; Jiang, X.; Garcíadeblas, B.; Mendoza, I.; Zhu, J.-K.; Pardo, J.M.; Quintero, F.J. (2006). Conservation of the Salt Overly Sensitive Pathway in Rice. *Plant Physiol.* 143, 1001–1012. doi: 10.1104/pp.106.092635.
217. Martinière A, Moreau P. (2020). Complex roles of Rab and SNAREs in the secretory pathway and plant development: a never-ending story. *J Microsc.* 280(2):140-157. doi: 10.1111/jmi.12952.
218. Masson-Boivin C., Sachs J.L. (2018) Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Curr Opin Plant Biol.*,44:7-15. doi: 10.1016/j.pbi.2017.12.001.
219. Matamoros MA, Becana M. Molecular responses of legumes to abiotic stress: post-translational modifications of proteins and redox signaling. (2021). *J Exp Bot.* 11;72(16):5876-5892. doi: 10.1093/jxb/erab008.
220. Maunoury N.; Redondo-Nieto, M.; Bourcy, M.; Van de Velde, W.; Alunni, B.; Laporte, P.; Durand, P.; Agier, N.; Marisa, L.; Vaubert, D.; *et al.* (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS ONE* 5, e9519. doi: 10.1371/journal.pone.0009519.

221. McCutcheon J. P. (2016) From microbiology to cell biology: when intracellular bacterium becomes part of its host cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* 41, 132–136. 10.1016/j.ceb.2016.05.008.
222. McFadden G. I. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 513–519. 10.1016/S1369-5266(99)00025-4.
223. Mellor R.B. (1989) Bacteroids in the Rhizobium-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: Implications for other microbial endosymbioses. *J. Exp. Bot.* 40: 831–839. <https://doi.org/10.1093/jxb/40.8.831>.
224. Mergaert P., Kikuchi Y, Shi.genobu S., Nowack ECM. (2017) Metabolic Integration of Bacterial Endosymbionts through Antimicrobial Peptides. *Trends Microbiol.* 25(9):703-712. doi: 10.1016/j.tim.2017.04.007.
225. Minguillón S, Matamoros MA, Duanmu D, Becana M. (2022) Signaling by reactive molecules and antioxidants in legume nodules. *New Phytol.* 236(3):815-832. doi: 10.1111/nph.18434.
226. Miri M, Janakirama P, Held M, Ross L, Szczyglowski K. (2016) Into the Root: How Cytokinin Controls Rhizobial Infection. *Trends Plant Sci.*, 21(3):178-186. doi: 10.1016/j.tplants.2015.09.003.
227. Miwa H, Okazaki S. (2017) How effectors promote beneficial interactions. *Curr Opin Plant Biol.*, 38:148-154. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.011.
228. Miyahara A., Richens, J., Starker, C., Morieri, G., Smith, L., Long, S., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. D. (2010) Conservation in function of a SCAR/WAVE component during infection thread and root hair growth in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:1553-1562. doi: 10.1094/MPMI-06-10-0144.
229. Mohammadi-Dehcheshmeh M., Ebrahimie E., Tyerman S., Kaiser B. (2014) A novel method based on combination of semi-in vitro and in vivo conditions in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of Glycine species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant*, 50: 282–291, DOI: 10.1007/s11627-013-9575-z.
230. Moling S., Pietraszewska-Bogiel A., Postma M., Fedorova E., Hink M.A. Limpens E., Gadella T. W. J., Bisseling T., Pietraszewska-Bogiel A., Postma M., Fedorova E., Hink M.A., Limpens E., Gadella T.W. J., Bisseling T. (2014). Nod factor receptors form heteromeric complexes and are essential for intracellular infection in medicago nodules. *Plant Cell.*, 26(10):4188-4199. doi:10.1105/tpc.114.129502.
231. Morris C. E., Homann, U. (2001) Cell surface area regulation and membrane tension. *J. Membr. Biol.* 179, 79–102. doi: 10.1007/s002320010040.
232. Morzhina E.V., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. (2000) Four developmental stages identified by genetic dissection of pea (*Pisum sativum* L.) root nodule morphogenesis. *Plant Sci.*, 155(1):75-83. doi:10.1016/s0168-9452(00)00207-7.
233. Nanjareddy K., Blanco L., Arthikala M.K., *et al.* (2016) A Legume TOR Protein Kinase Regulates Rhizobium Symbiosis and Is Essential for Infection and Nodule Development. *Plant Physiol.*, 172(3):2002-2020. doi:10.1104/pp.16.00844.

234. Nascimbeni AC, Giordano F, Dupont N, *et al.* (2017) ER-plasma membrane contacts sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis. *EMBO J.*;36(14):2018-2033. doi:10.15252/embj.201797006.
235. Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M. *et al.* (2005) Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.*, 165, 683–701, doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x.
236. Nickerson D.P., Brett, C.L., and Merz, A.J. (2009) Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 543-551.DOI: 10.1016/j.ceb.2009.05.007.
237. Nicoud Q., Barrière Q., Busset N., Dendene S., Travin D., Bourge M., Le Bars R., Boulogne C., Lecroël M., Jenei S., Kereszt A., Kondorosi E., Biondi E.G., Timchenko T., Alunni B., Mergaert P. (2021) *Sinorhizobium meliloti* Functions Required for Resistance to Antimicrobial NCR Peptides and Bacteroid Differentiation. *mBio*. 31;12(4):e0089521. doi: 10.1128/mBio.00895-21.
238. Nie W.-X.; Xu, L.; Yu, B.-J. (2015) A putative soybean GmsSOS1 confers enhanced salt tolerance to transgenic *Arabidopsis sos1-1* mutant. *Protoplasma* 252, 127–134.
239. Nielsen E., Cheung, A.Y., and Ueda, T. (2008) The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiol.*, 147: 1516–1526, doi: 10.1104/pp.108.121798.
240. Nishida H., Suzuki T. (2018) Two Negative Regulatory Systems of Root Nodule Symbiosis: How Are Symbiotic Benefits and Costs Balanced? *Plant Cell Physiol.* 1;59(9):1733-1738. doi: 10.1093/pcp/pcy102.
241. Ogden A.J., Gargouri M., Park J., Gang D.R., Kahn M.L. (2017) Integrated analysis of zone-specific protein and metabolite profiles within nitrogen-fixing *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium medicae* nodules. *PLoS One.*;12(7): e0180894. doi: 10.1371/journal.pone.0180894.
242. Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Dolgikh E.A., Goormachtig S. (2012). Wuschel-related homeobox5 gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation. *Plant Physiol.* 158(3):1329-41. doi: 10.1104/pp.111.188078.
243. Oldroyd, G.E.D. (2013) Speak, friend and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Publ. Gr.*, 11, 252–263. doi: 10.1038/nrmicro2990.
244. O'Malley M. A. (2015). Endosymbiosis and its implications for evolutionary theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112, 10270–10277. 10.1073/pnas.1421389112, doi: 10.1073/pnas.1421389112.
245. Op den Camp R., Streng A., De Mita S., Cao Q., Polone E., Liu W., *et al.* (2011) LysM-type mycorrhizal receptor recruited for *Rhizobium* symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science*, 331, 909–912. doi: 10.1126/science.1198181.
246. Op den Camp R.H., Polone E., Fedorova E., *et al.* (2012) Nonlegume *Parasponia andersonii* deploys a broad rhizobium host range strategy resulting in largely variable

- symbiotic effectiveness. *Mol. Plant Microbe Interact.*;25(7):954-963. doi:10.1094/MPMI-11-11-0304.
247. Ortega-Ortega Y., Carrasco-Castilla J., Juárez-Verdayes M.A, Toscano-Morales R., *et al.* (2020) Actin Depolymerizing Factor Modulates Rhizobial Infection and Nodule Organogenesis in Common Bean. *Int J Mol Sci*, 13;21(6):1970. doi: 10.3390/ijms21061970.
248. Ott T. (2017) Membrane nanodomains and microdomains in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 40:82-88. doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.008.
249. Ovchinnikova E, Journet EP, Chabaud M, Cosson V, Ratet P, Duc G, Fedorova E, Liu W, den Camp RO, Zhukov V, Tikhonovich I, Borisov A, Bisseling T, Limpens E. (2011). IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* Spp. *Mol Plant Microbe Interact.*;24(11):1333-44. doi: 10.1094/MPMI-01-11-0013.
250. Parniske M. (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 320–328. doi: 10.1016/s1369-5266(00)00088-1.
251. Parker M.A. (2015) The spread of *Bradyrhizobium* lineages across host legume clades: from *Abarema* to *Zygia*. *Microb Ecol.*;69(3):630-40. doi: 10.1007/s00248-014-0503-51016/S1369-5266(00)00088-1.
252. Parniske M. (2018) Uptake of bacteria into living plant cells, the unifying and distinct feature of the nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2018; 44:164-174, doi:10.1016/j.pbi.2018.05.016.
253. Patriarca E.J, Tatè, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.*, 234, 201–262, doi: 10.1016/S0074-7696(04)34005-2.
254. Pawlowski K., Sirrenberg A. (2003). Symbiosis between *Frankia* and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. *Indian J Exp Biol.*; 41(10):1165-83. PMID: 15242283.
255. Perrine-Walker F.M., Lartaud M., Kouchi H., Ridge R.W. (2014). Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Protoplasma.*;251(5):1099-1111. doi:10.1007/s00709-014-0618-z.
256. Petrova O., Parfirova O., Gogolev Y., Gorshkov V. (2023) Stringent Response in Bacteria and Plants with Infection. *Molecular and Physiological Plant Pathology. Int J Mol Sci.*, 24(24):17348. doi: 10.3390/ijms242417348.
257. Pfeffer S., and Aivazian, D. (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 886–896. doi: 10.1038/nrm1500.
258. Pfeffer S.R. (2007). Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu. Rev. Biochem.*, 76: 629–645, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.061705.130002.
259. Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., Mathesius U., Crespi M., Frugier F. (2011) MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 65, 622–633. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04447.x.
260. Pollard T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36:451-477. doi: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936.

261. Pollard T. D., Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326:1208-1212, doi: 10.1126/science.1175862.
262. Poole P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, 16: 291–303. doi: 10.1038/nrmicro.2017.171.
263. Pozhvanov G.A., Gobova A.E., Bankin M.P., Medvedev S.S., Vissenberg K. (2016) Ethylene is involved in the actin cytoskeleton rearrangement during the root gravitropic response of *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology: a Comprehensive Russian Journal on Modern Phytophysiology*, 2016, 63, 587–596. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050095>.
264. Pozhvanov G., Sharova E. Medvedev S.S. (2021) Microgravity modelling by two-axial clinorotation leads to scattered organisation of cytoskeleton in *Arabidopsis* seedlings. *Funct Plant Biol.*;48(10):1062-1073. doi: 10.1071/FP20225.
265. Pueyo J.J., Quiñones M.A., Coba de la Peña T., Fedorova E.E., Lucas M.M. (2021), Nitrogen and Phosphorus Interplay in Lupin Root Nodules and Cluster Roots. *Front Plant Sci.*,3;12:644218. doi: 10.3389/fpls.2021.644218. eCollection 2021.
266. Provorov N. A., Andronov E.E, Kimeklis A.K., Onishchuk O. P, Igolkina A. A., Karasev E. S. (2022) Microevolution, speciation and macroevolution in rhizobia: Genomic mechanisms and selective patterns. *Front Plant Sci.*, doi: 10.3389/fpls.2022.1026943.
267. Puppo A, Groten K, Bastian F *et al.* (2005) Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.*;165(3):683-701. doi:10.1111/j.1469-8137.2004. 01285.x.
268. Qiao Z., Libault M. (2017) Function of plasma membrane microdomain-associated proteins during legume nodulation. *Plant Signal Behav.*;12(10):e1365215. doi:10.1080/15592324.2017.1365215.
269. Qin Y., and Dong, J. (2015). Focusing on the focus: What else beyond the master switches for polar cell growth? *Mol. Plant.*, 8, 582–594. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.023.
270. Qiu L., Lin J.-S., Xu J., Sato S., Parniske M., Wang T.L., Downie J. A., Xie. F. (2015) SCARN a Novel Class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume Nodulation. *PLoS Genet.*, 30;11(10):e1005623. doi: 10.1371/journal.pgen.1005623.
271. Quezada-Rodríguez EH, Gómez-Velasco H, Arthikala MK, Lara M, Hernández-López A, Nanjareddy K. (2021) Exploration of Autophagy Families in Legumes and Dissection of the ATG18 Family with a Special Focus on *Phaseolus vulgaris*. *Plants (Basel).*;10(12):2619. doi:10.3390/plants10122619.
272. Ragel P, Raddatz N, Leidi EO, Quintero FJ, Pardo JM. (2019) Regulation of K(+) Nutrition in Plants. *Front Plant Sci.*, 20;10:281. doi: 10.3389/fpls.2019.00281.
273. Read A, Schröder M. (2021). The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)*, 29;10(5):384. doi: 10.3390/biology10050384.
274. Reguera M.; Bassil, E.; Tajima, H.; Wimmer, M.; Chanoca, A.; Otegui, M.S.; Paris, N.; Blumwald, E. (2015). pH Regulation by NHX-Type Antiporters Is Required for Receptor-Mediated Protein Trafficking to the Vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 27, 1200–1217. doi: 10.1105/tpc.114.135699.

275. Rehman H.M, Nawaz M.A, Shah Z.H, Daur I., Khatoon S, Yang SH, Chung G. (2017) In-depth genomic and transcriptomic analysis of five K⁺transporter gene families in soybean confirm their differential expression for nodulation. *Frontiers in Plant Science*, 8, 804, doi: 10.3389/fpls.2017.00804.
276. Reisen D., Marty, F., Leborgne-Castel, N. (2005) New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biol.*, 5: 13.doi: 10.1186/1471-2229-5-13.
277. Ridge RW, Uozumi Y, Plazinski J, Hurley UA, Williamson RE. (1999) Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol.*; 40(12):1253-1261. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029513.
278. Riely BK, Lougnon G, Ané JM, Cook DR. (2007) The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots *Plant J.* 49(2):208-16. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02957.x.
279. Rodrigues A., Adamo M., Crozet P., *et al.* (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*;25(10):3871-3884. doi:10.1105/tpc.113.114066.
280. Rodríguez-López J., López A.H., Estrada-Navarrete G., Sánchez F., Díaz-Camino C. (2019). The Noncanonical Heat Shock Protein PvNod22 Is Essential for Infection Thread Progression During Rhizobial Endosymbiosis in Common Bean. *Mol Plant Microbe Interact.*;32(8):939-948. doi:10.1094/MPMI-02-19-0041-R.
281. Rodríguez-Rosales M.P.; Gálvez, F.J.; Huertas, R.; Aranda, M.N.; Baghour, M.; Cagnac, O.; Venema, K. (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal. Behav.* 4, 265–276.doi: 10.4161/psb.4.4.7919.
282. Rojo E., Gillmor, C.S., Kovaleva, V., Somerville, C.R., and Raikhel, N.V. (2001) VACUOLELESS1 Is an Essential Gene Required for Vacuole Formation and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 1, 303-310.doi: 10.1016/s1534-5807(01)00024-7.
283. Rojo E., Zouhar, J., Kovaleva, V., Hong, S., and Raikhel, N.V. (2003). The AtC-VPS Protein Complex Is Localized to the Tonoplast and the Prevacuolar Compartment in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 361-369.doi: 10.1091/mbc.e02-08-0509.
284. Rosado A.; Bayer, E.M. (2021) Geometry and cellular function of organelle membrane interfaces. *Plant Physiol.*,185, 650–662.doi: 10.1093/plphys/kiab079.
285. Roth L.E., Stacey G. (1989) Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol.*, 49(1):13-23. PMID: 2759097.
286. Rothe G., Klingel, S., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., Zirkelbach, C., Banati, R.B., Mangel, W.F., and Valet, G. (1992) Flow Cytometric Analysis of Protease Activities in Vital Cells, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, vol. 373, pp. 547–554, doi: 10.1515/bchm3.1992.373.2.547.
287. Roudier F, Fedorova E, Györgyey J, *et al.* (2000) Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J.*;23(1):73-83. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00794.x.

288. Roudier F, Fedorova E, Lebris M, *et al.* (2003) The *Medicago* species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiol.* 131(3):1091-1103. doi:10.1104/pp.102.011122.
289. Roux B.; Rodde, N.; Jardinaud, M.-F.; Timmers, T.; Sauviac, L.; Cottret, L.; Carrère, S.; Sallet, E.; Courcelle, E.; Moreau, S.; *et al.* (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J.*, 77, 817–837, doi: 10.1111/tpj.12442.
290. Roux B.; Rodde, N.; Moreau, S.; Jardinaud, M.-F.; Gamas, P. (2018) Laser Capture Micro-Dissection Coupled to RNA Sequencing: A Powerful Approach Applied to the Model Legume *Medicago truncatula* in Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Methods Mol.Biol.*, 1830, 191–224. doi: 10.1007/978-1-4939-8657-6_12.
291. Roy S, Liu W, *et al.* (2020) Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell.*; 32(1):15-41. doi:10.1105/tpc.19.00279.
292. Rubio F, Nieves-Cordones M, Horie T, Shabala S. (2020). Doing ‘business as usual’ comes with a cost: evaluating energy cost of maintaining plant intracellular K⁺ homeostasis under saline conditions. *New Phytologist*, 225, 1097–1104. doi: 10.1111/nph.15852.
293. Rucker H.R, Kaçar B. (2024) Enigmatic evolution of microbial nitrogen fixation: insights from Earth's past. *Trends Microbiol.*, 32(6):554-564, doi: 10.1016/j.tim.2023.03.011.
294. Rutten L., Miyata K., Roswanjaya Y.P., Huisman R., Bu F., Hartog M., Linders S., van Velzen R., van Zeijl A., Bisseling T., Kohlen W., Geurts R. (2020) Duplication of Symbiotic Lysin Motif Receptors Predates the Evolution of Nitrogen-Fixing Nodule Symbiosis. *Plant Physiol.*, 184(2):1004-1023. doi: 10.1104/pp.19.01420.
295. Rutten P.J.; Poole, P.S. (2019) Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia. *Advan. Microb. Physiol.* 75, 325–389. doi: 10.1016/bs.ampbs.2019.08.001.
296. Sackmann E. Endoplasmatic reticulum shaping by generic mechanisms and protein-induced spontaneous curvature. (2014) *Adv Colloid Interface Sci.*, 208:153-160. doi: 10.1016/j.cis.2014.02.006.
297. Safronova V.I, Guro P. V., Sazanova A. L, Kuznetsova I. G, Belimov A. A, Yakubov V. V., Chirak E. R, Afonin A. M., Gogolev Y. V, Andronov E. E., Tikhonovich I. A. (2020) Rhizobial Microsymbionts of Kamchatka *Oxytropis* Species Possess Genes of the Type III and VI Secretion Systems, Which Can Affect the Development of Symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact*, 33(10):1232-1241. doi: 10.1094/MPMI-05-20-0114-R.
298. Samaj J., Read, N.D., Volkmann, D., Menzel, D., and Baluska, F. (2005). The endocytic network in plants. *Trends Cell Biol.*, 15: 424–433, doi: 10.1016/j.tcb.2005.06.006.
299. Sanderfoot A. (2007). Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants. *Plant Physiol.*, 144: 6–17, doi: 10.1104/pp.106.092973.

300. Sandhu D., Pudussery, M.V., Kaundal, R., Suarez, D.L., Kaundal, A., Sekhon, R.S. (2017) Molecular characterization and expression analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger gene family in *Medicago truncatula*. *Funct. Integr. Genom.*, 18, 141–153. doi: 10.1007/s10142-017-0581-9.
301. Sasaki T, Suzuki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M. (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature Communications*, 5, 4983. doi: 10.1038/ncomms5983.
302. Sauviac L, Rémy A, Huault E, Dalmasso M, Kazmierczak T, Jardinaud MF, Legrand L, Moreau C, Ruiz B, Cazalé AC, Valière S, Gourion B, Dupont L, Gruber V, Boncompagni E, Meilhoc E, Frendo P, Frugier F, Bruand C. (2022) A dual legume-rhizobium transcriptome of symbiotic nodule senescence reveals coordinated plant and bacterial responses. *Plant Cell Environ.*, 45(10):3100-3121. doi: 10.1111/pce.14389.
303. Schapire A. L., Voigt, B., Jasik, J., Rosado, A., Lopez-Cobollo, R., Menzel, D., *et al.* (2008) *Arabidopsis* synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *Plant Cell*, 20, 3374–3388. doi: 10.1105/tpc.108.063859.
304. Schiessl K., Lilley J.L.S., Lee T., Tamvakis I., Kohlen W., Bailey P.C., Thomas A., Luptak J., Ramakrishnan K., Carpenter M.D., Mysore K.S., Wen J., Ahnert S., Grieneisen V.A., Oldroyd G.E.D. (2019) NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. *Curr Biol.* 4;29(21):3657-3668.e5. doi: 10.1016/j.cub.2019.09.005.
305. Schneider S., Schintlmeister, A., Becana, M., Wagner, M., Wobken, D., Wienkoop, S. (2019). Sulfate is transported at significant rates through the symbiosome membrane and is crucial for nitrogenase biosynthesis. *Plant Cell Environ.* 42, 1180–1189. doi: 10.1111/pce.13481.
306. Schnitzer D., Seidel, T., Sander, T., Golldack, D., and Dietz, K.-J. (2011) The cellular energization state affects peripheral stalk stability of plant vacuolar H⁺-ATPase and impairs vacuolar acidification. *Plant Cell Physiol.*, 52: 946–956. doi: 10.1093/pcp/pcr044.
307. Sinha J, Singh Y, Verma PK. (2024) Cytoskeleton remodeling: a central player in plant-fungus interactions. *J Exp Bot.*, 7;75(11):3269-3286. doi: 10.1093/jxb/erae133.
308. Shumaev KB, Kosmachevskaya OV, Nasybullina EI, Ruuge EK, Topunov AF. (2022) Role of Nitric Oxide-Derived Metabolites in Reactions of Methylglyoxal with Lysine and Lysine-Rich Protein Leghemoglobin. *Int J Mol Sci.*, 22;24(1):168. doi: 10.3390/ijms24010168.
309. Semenova M.G., Petina A. N., Fedorova E.E. (2024) Autophagy and Symbiosis: Membranes, ER, and Speculations. *Int J Mol Sci.* 2;25(5):2918. doi: 10.3390/ijms25052918.
310. Senechal F, Wattier C, Rusterucci C, Pelloux J. (2014) Homogalacturonan modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *J. Exper.Bot.*, 65: 5125–5160, doi: 10.1093/jxb/eru272.
311. Senovilla M.; Castro-Rodríguez, R.; Abreu, I.; Escudero, V.; Kryvoruchko, I.; Udvardi, M.K.; Imperial, J., González-Guerrero, M. (2018) *Medicago truncatula* copper

- transporter 1 (Mt COPT 1) delivers copper for symbiotic nitrogen fixation. *New Phytol.*, 218,696–709.doi: 10.1111/nph.14992.
312. Serova T.A., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. (2017) Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization *J Plant Physiol.* 212:29-44. doi: 10.1016/j.jplph.2017.01.012.
313. Serova T.A., Tsyganova A.V., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. (2019) Gibberellins Inhibit Nodule Senescence and Stimulate Nodule Meristem Bifurcation in Pea (*Pisum sativum* L.). *Front Plant Sci.* 10:285. doi:10.3389/fpls.2019.00285.
314. Serova T.A., Tsyganova A.V., Tsyganov V. E. (2018) Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages. *Protoplasma*, 255(5):1443-1459. doi: 10.1007/s00709-018-1246-9.
315. Shabala S, Pottosin I. (2014) Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol Plant.* ,151(3):257-79. doi: 10.1111/ppl.12165.
316. Sharma T, Dreyer I, Riedelsberger J. (2013) The role of K⁺ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.*, 4, 224.doi: 10.3389/fpls.2013.00224.
317. Sheahan MB, Rose RJ, McCurdy DW. (2004) Organelle inheritance in plant cell division: the actin cytoskeleton is required for unbiased inheritance of chloroplasts, mitochondria and endoplasmic reticulum in dividing protoplasts. *The Plant Journal*, 37, 379–390.doi: 10.1046/j.1365-313x.2003.01967.x.
318. Shen D., Bisseling T. (2020) The Evolutionary Aspects of Legume Nitrogen-Fixing Nodule Symbiosis. *Results Probl Cell Differ.* 69:387-408. doi: 10.1007/978-3-030-51849-3_14.
319. Shimmen T., Yokota E. (2004) Cytoplasmic streaming in plants. *Current Opin. Cell Biol.*, 16, 68–72.doi: 10.1016/j.ceb.2003.11.009.
320. Joshi S., Nath J., Singh A. K. Pareek A., Joshi R. (2022) Ion transporters and their regulatory signal transduction mechanisms for salinity tolerance in plants. *Physiol Plant.* 174(3):e13702. doi: 10.1111/ppl.13702.
321. Shumaev K.B, Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Kalenikova E.I., Topunov A.F. (2023) Histidine-Bound Dinitrosyl Iron Complexes: Antioxidant and Antiradical Properties. *Int J Mol Sci.*, 7;24(24):17236. doi: 10.3390/ijms242417236.
322. Shumaev K.B, Kosmachevskaya OV, Nasybullina EI, Ruuge EK, Topunov AF. (2022) Role of Nitric Oxide-Derived Metabolites in Reactions of Methylglyoxal with Lysine and Lysine-Rich Protein Leghemoglobin. *Int J Mol Sci.*, 22;24(1):168. doi: 10.3390/ijms24010168.
323. Shumilina J., Soboleva A., Abakumov E., Shtark O. Y., Zhukov V. A., Frolov A. (2023) Signaling in Legume-Rhizobia Symbiosis. *Int J Mol Sci.*, 12;24(24):17397. doi: 10.3390/ijms242417397.
324. Si Z., Guan N., Zhou Y., Mei L., Li Y., Li Y. (2020) A Methionine Sulfoxide Reductase B Is Required for the Establishment of *Astragalus sinicus*-*Mesorhizobium* Symbiosis. *Plant Cell Physiol.*, 61(9):1631-1645. doi: 10.1093/pcp/pcaa085.

325. Sieberer BJ, Chabaud M, Fournier J, Timmers AC, Barker D.G. (2012) A switch in Ca²⁺ spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *Plant J.*,69(5):822-30. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04834.x.
326. Sinharoy S., Torres-Jerez I., Bandyopadhyay K., Kereszt A., Pislariu C.I., Nakashima J., Benedito V.A., Kondorosi E., Udvardi M.K. (2013) The C₂H₂ transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 25(9):3584-601. doi: 10.1105/tpc.113.114017.
327. Sinha J., Singh Y., Verma P.K. (2024) Cytoskeleton remodeling: a central player in plant-fungus interactions. *J Exp Bot.*, 7;75(11):3269-3286. doi: 10.1093/jxb/erae133.
328. Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C., Bisseling T. (2007) *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol.*, 145(1):183-191. doi:10.1104/pp.107.100495.
329. Smit P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., and Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308:1789–1791. doi: 10.1126/science.1111025.
330. Spinoso M., A Riccio, L. Mandrich, G. Manco, A. Lamberti, M. Iaccarino, M. Merrick, E. J. Patriarca. (2000) Inhibition of glutamine synthetase II expression by the product of the *gstI* gene. *Mol Microbiol.* 37(2):443-52. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02018.x.
331. Sprent J.I, Ardley J, James E.K. (2017) Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol.*;215(1):40-56. doi:10.1111/nph.14474.
332. Staehelin LA. (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.*, 11(6):1151-1165. doi:10.1046/j.1365-313x.1997.11061151. x.
333. Stonoha-Arther C, Wang D. (2018) Tough love: accommodating intracellular bacteria through directed secretion of antimicrobial peptides during the nitrogen-fixing symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 44:155-163. doi:10.1016/j.pbi.2018.04.017.
334. Stüeken E. E., Buick R., Guy B. M., Koehler M. C. (2015) Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. *Nature*, 520, 666–669. doi:10.1038/nature14180.
335. Su C, Zhang G., Rodriguez-Franco M., Hinnenberg R., Wietschorke J., Liang P., Yang W., Uhler L., Li X., Ott T. (2023) Transcellular progression of infection threads in *Medicago truncatula* roots is associated with locally confined cell wall modifications. *Curr Biol.* 6;33(3):533-542.e5. doi: 10.1016/j.cub.2022.12.051.
336. Sulima A.S., Zhukov V.A., Afonin A.A., Zhernakov A.I., Tikhonovich I.A., Lutova L.A. (2017) Selection Signatures in the First Exon of Paralogous Receptor Kinase Genes from the Sym2 Region of the *Pisum sativum* L. Genome. *Front Plant Sci.*, 14;8:1957. doi: 10.3389/fpls.2017.01957.
337. Sulima A.S., Zhukov V.A., Kulaeva O.A., Vasileva E.N., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. (2019) New sources of Sym2A allele in the pea (*Pisum sativum* L.) carry the unique variant of candidate LysM-RLK gene LykX. *Peer J* 20;7:e8070. doi: 10.7717/peerj.8070.

338. Surpin M., Raikhel, N., (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 100–109, doi: 10.1038/nrm1311.
339. Suzuki N.; Koussevitzky, S.; Mittler, R.; Miller, G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.*, 35, 259–270. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x.
340. Sze H.; Chanroj, S. (2018) Plant Endomembrane Dynamics: Studies of K⁺/H⁺ Antiporters Provide Insights on the Effects of pH and Ion Homeostasis. *Plant Physiol.*, 177, 875–895. doi: 10.1104/pp.18.00142.
341. Takemoto D., Hardham A.R. (2004) The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. *Plant Physiol.*, 136, 3864–3876, doi: 10.1104/pp.104.052159.
342. Taté R., A Riccio, M Merrick, E J Patriarca. (1998) The *Rhizobium etli* amt B gene coding for an NH₄⁺ transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. *Mol Plant Microbe Interact.*;11(3):188-98. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.3.188.
343. Telewski F. W. (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am. J. Bot.* 93, 1466–1476. doi: 10.3732/ajb.93.10.1466.
344. Tian F.; Chang, E.; Li, Y.; Sun, P.; Hu, J.; Zhang, J. (2017) Expression and integrated network analyses revealed functional divergence of NHX-type Na⁺/H⁺ exchanger genes in poplar. *Sci. Rep.*, 7, 2607, doi: 10.1038/s41598-017-02894-8.
345. Timmers AC, Auriac MC, de Billy F, Truchet G. (1998). Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development*. 125(3):339-49. doi: 10.1242/dev.125.3.339. PMID: 9425130.
346. Timmers AC. (2008) The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *J Microsc.*,231(2):247-56. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02040.x.
347. Timmers A.C.J., Auriac M-C, Truchet G. (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, 126, 3617–3628, doi: 10.1242/dev.126.16.3617.
348. Torres M.J.; Rubia, M.I.; de la Peña, T.C.; Pueyo, J.J.; Bedmar, E.J.; Delgado, M.J. (2014) Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol.* 14, 142. doi: 10.1186/1471-2180-14-142.
349. Trdá L, Boutrot F, Claverie J, Brulé D, Dorey S, Poinssot B. (2015). Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Front. Plant Sci.*, 6:219. doi: 10.3389/fpls.2015.00219.
350. Montiel J., Arthikala M-K., Cárdenas L., Quinto C. (2016) Legume NADPH Oxidases Have Crucial Roles at Different Stages of Nodulation. *Int. J. Mol. Sci.* 17(5), 680; <https://doi.org/10.3390/ijms17050680>.
351. Trifonova N.A, Kamyshinsky R, Coba de la Peña T, Koroleva M.I, Kulikova O, Lara-Dampier V, Pashkovskiy P, Presniakov M, Pueyo JJ, Lucas MM, Fedorova EE. (2022) Sodium Accumulation in Infected Cells and Ion Transporters Mistargeting in Nodules of *Medicago truncatula*: Two Ugly Items That Hinder Coping with Salt Stress Effects. *Int J Mol Sci.* 13;23(18):10618. doi: 10.3390/ijms231810618.

352. Tse Y.C., Mo, B., Hillmer, S., Zhao, M., Lo, S.W., Robinson, D.G., Jianga, L (2004). Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell*, 16: 672–693, doi: 10.1105/tpc.019703.
353. Tsyganov V.E., Kitaeva, A.B.; Demchenko, K.N. (2019) Comparative analysis of tubulin cytoskeleton rearrangements in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*. In: *The Model Legume Medicago truncatula*; De Bruijn, F.J., Ed.; JohnWiley& Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, pp. 543–547, doi: 10.1111/nph.13792.
354. Tsyganova A.V.; Seliverstova, E.V.; Brewin, N.J.; Tsyganov, V.E. (2019), Comparative analysis of remodelling of the plant—Microbe interface in *Pisum sativum* and *Medicago truncatula* symbiotic nodules. *Protoplasma* 256, 983–996.doi: 10.1007/s00709-019-01355-5.
355. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Tsyganov V.E. (2023) Comparison of the Formation of Plant-Microbial Interface in *Pisum sativum* L. and *Medicago truncatula* Gaertn. Nitrogen-Fixing Nodules. *Int J Mol Sci.* 8;24(18):13850. doi: 10.3390/ijms241813850. PMID: 37762151
356. Tyrrell T. (1999) The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature*, 400, 525–531. doi:10.1038/22941.
357. Udvardi M, Poole P.S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Ann. Rev.Plant Biol.*, 64, 781–8056, doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235.
358. 360. Ueda T., Uemura, T., Sato, M.H., and Nakano, A. (2004). Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells. *Plant J.*, 40:783–789.doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02249.x.
359. Ueda T., Yamaguchi, M., Uchimiyia, H., and Nakano, A. (2001) Ara6, a plant unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.*, 17: 4730–4741, doi: 10.1093/emboj/20.17.4730.
360. Untergasser A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J.A.M. (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, 35 (Suppl. S2), W71–W74.doi: 10.1093/nar/gkm306.
361. van Brussel AA, Tak T, Boot KJ, Kijne JW. (2002). Autoregulation of root nodule formation: signals of both symbiotic partners studied in a split-root system of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Mol Plant Microbe Interact.*, 15(4):341-9. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.4.341.
362. Van de Velde W, Pérez Guerra JC, De Keysler A, De Rycke R, Rombauts S, Maunoury N, Mergaert P. (2006) Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 141, 711–720.doi: 10.1104/pp.106.078691.
363. van Velzen R, Doyle JJ, Geurts R. (2019) A Resurrected Scenario: Single Gain and Massive Loss of Nitrogen-Fixing Nodulation. *Trends Plant Sci.*;24(1):49-57. doi: 10.1016/j.tplants.2018.10.005.
364. Van Velzen, R., Holmer, R., Bu, F., Rutten, L., van Zeijl, A., Liu, W., Santuari L. , Qingqin Cao , Sharma T. , Shen D. , Roswanjaya Y , Wardhani T.A. K., Kalhor M. , Jansen J. , Hoogen J., GÜngör B., Hartog M., Hontelez J. , Verver J., Yang W.-C., Schijlen E., Repin R. , Schilthuisen M , Schranz M., Heidstra R. , Miyata K. , Fedorova

- E., Kohlen W., Bisseling T., Smit S. Geurts R. (2018). Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15, E4700–E4709. doi: 10.1073/pnas.1721395115.
365. 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. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of Four Putative Symbiosis Genes of the Tropical Tree *Parasponia andersonii* Reveals Novel Phenotypes. *Front Plant Sci.*, 6;9:284. doi: 10.3389/fpls.2018.00284.
366. van Zelm E., Zhang Y., Testerink C. (2020). Salt Tolerance Mechanisms of Plants. *Annu Rev Plant Biol.*, 29; 71:403-433. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100005.
367. Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.*, 172: 4295–4306, doi: 10.1128/jb.172.8.4295-4306.1990.
368. Vaughn B., Abu Kwaik, Y. (2021) Idiosyncratic Biogenesis of Intracellular Pathogens-Containing Vacuoles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 722433, doi: 10.3389/fcimb.2021.722433.
369. Verdier J.; Kakar, K.; Gallardo, K.; Le Signor, C.; Aubert, G.; Schlereth, A. (2008), Gene expression profiling of *M. truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legume seed filling. *Plant Mol. Biol.* 67, 567–580, doi: 10.1007/s11103-008-9320-x.
370. Verherbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research*, 344: 1858–1862. doi: 10.1016/j.carres.2008.11.010.
371. Véry AA, Nieves-Cordones M, Daly M, Khan I, Fizames C, Sentenac H. 2014. Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: what do we learn from comparison between plant species? *J. Plant Physiol.* 171, 748–769, doi: 10.1016/j.jplph.2014.01.011.
372. Vieira O.V., Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: Aging gracefully. *Biochem. J.*, 366: 689–704, doi: 10.1042/BJ20020691.
373. Vijn, I., Christiansen, H., Lauridsen, P., Kardailsky, I., Quandt, H.-J., Broer, I., Drenth, J., Ostergaard Jensen, E., van Kammen, A., and Bisseling, T. A. (1995). 200 bp region of the pea ENOD12 promoter is sufficient for nodule-specific and nod factor induced expression. *Plant Mol. Biol.*, 28: 1103–1110, doi: 10.1007/BF00032670.
374. Vinardell J.M., Fedorova E., Cebolla A., *et al.* (2003) Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell.* 15(9):2093-2105. doi:10.1105/tpc.014373.
375. Vincent JL, Brewin NJ. (2000) Immunolocalization of a cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiol.*;123(2):521-30. doi: 10.1104/pp.123.2.521.
376. Von Bargen K., Polidori, M., Becken, U., Huth, G., Prescott, J.F., Haas, A. (2009). *Rhodococcusequi* virulence-associated protein A is required for diversion of phagosome

- biogenesis but not for cytotoxicity. *Infect. Immun.*, 77: 5676–5681. doi: 10.1128/IAI.00856-09.
377. Voroshilova VA, Demchenko KN, Brewin NJ, Borisov AY, Tikhonovich IA. (2009). Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads. *New Phytol.*, ;181(4):913-923. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02723.x.
378. Vukašinovic N., and Žárský, V. (2016) Tethering complexes in the Arabidopsis endomembrane system. *Front. Cell Dev. Biol.*, 19:46, doi: 10.3389/fcell.2016.00046.
379. Wagner A.O., Hohlbrugger P., Lins P., Illmer P. (2012) Effects of different nitrogen sources on the biogas production - a lab-scale investigation. *Microbiol Res.* 167(10):630-636. doi: 10.1016/j.micres.2011.11.007.
380. Wan X., Hontelez J., Lillo A., Guarnerio C., van de Peut D., Fedorova E., Bisseling T., Franssen H. (2007) *Medicago truncatula* ENOD40-1 and ENOD40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development. *J. Exp. Bot.* 58(8):2033-41. doi: 10.1093/jxb/erm072.
381. Wang D., Griffiths J., Starker C., Fedorova E., Limpens E., Ivanov S., Bisseling T., Long S. (2010) A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science*. 26;327(5969):1126-9. doi: 10.1126/science.1184096.
382. Wang F.; Chen., Z.-H.; Liu., X.; Colmer., T.; Shabala., L.; Salih., A.; Shabala., S. (2016) Revealing the roles of GORK channels and NADPH oxidase in acclimation to hypoxia in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 68, 3191–3204. doi: 10.1093/jxb/erw378.
383. Wang Y., Ji Y., Fu Y., Guo H. (2018). Ethylene-induced microtubule reorientation is essential for fast inhibition of root elongation in Arabidopsis. *J. Integrative Plant Biol.* 60, 864–877. doi: 10.1111/jipb.12666.
384. Welch M. D., Way, M. (2013). Arp2/3-mediated actin-based motility: A tail of pathogen abuse. *Cell Host Microbe* 14:242-255. doi: 10.1016/j.chom.2013.08.011.
385. Wen B., Gong X., Chen X, Tan Q, Li L, Wu H. (2022). Transcriptome analysis reveals candidate genes involved in nitrogen deficiency stress in apples. *J Plant Physiol.*; 279:153822. doi: 10.1016/j.jplph.2022.153822.
386. White J., Prell, J., James, E.K., and Poole, P. (2007) Nutrient Sharing between Symbionts. *Plant Physiology*, 144, 604-614, doi: 10.1104/pp.107.097741.
387. Whitehead L. F., Day D. A. (1997). The peribacteroid membrane. *Physiol. Plant.*, 100, 30–44. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03452.x.
388. Wienkoop S., Saalbach, G. (2003) Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiol.*, 131: 1080–1090. doi: 10.1104/pp.102.015362.
389. Wojciechowska N, Michalak KM, Bagniewska-Zadworna A. (2021) Autophagy-an underestimated coordinator of construction and destruction during plant root ontogeny. *Planta.*;254(1):15. doi:10.1007/s00425-021-03668-3.
390. Wolf S, Hematy K, Hofte H. (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 63: 381–407. doi: 10.1093/plcell/koad324.
391. Wu G.-Q.; Wang, J.-L.; Li, S.-J. (2019) Genome-Wide Identification of Na⁺/H⁺ Antiporter (NHX) Genes in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) and Their Regulated Expression under Salt Stress. *Genes*, 10, 401.

392. Wu X.; Ebine, K.; Ueda, T.; Qiu, Q.-S. (2016) AtNHX5 and AtNHX6 Are Required for the Subcellular Localization of the SNARE Complex That Mediates the Trafficking of Seed Storage Proteins in Arabidopsis. PLoS ONE, 11, e0151658.
393. Xie F., Murray J.D., Kim J., Heckmann A.B., Edwards A., Oldroyd G.E.D., Downie J.A. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 109: 633–638.
394. Xu H., Martinoia E., Szabo I. (2015) Organellar Channels and Transporters. Cell Calcium. 58(1): 1–10. doi: 10.1016/j.ceca.2015.02.006.
395. Xu L., Shen, X., Bryan, A., Banga, S., Swanson, M.S., and Luo, Z.Q. (2010). Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a Legionella pneumophila effector. PLoS Pathog., 6: e1000822, doi: 10.1371/journal.ppat.1000822.
396. Yamazaki T., Kawamura, Y., Minami, A., and Uemura, M. (2008). Calcium dependent freezing tolerance in Arabidopsis involves membrane resealing via synaptotagmin SYT1. Plant Cell, 20, 3389–3404. doi: 10.1105/tpc.108.062679.
397. 399. Yang L., Elmsehli, S., Benyamina, S., Lambert, A., Hopkins, J., Cazareth, J. *et al.* (2020) Glutathione deficiency in Sinorhizobium meliloti does not impair bacteroid differentiation but induces early senescence in the interaction with Medicago truncatula. Front. Plant Sci., 11, 137. doi: 10.3389/fpls.2020.00137.
398. Yang M., Wang L., Chen C., *et al.* (2021) Genome-wide analysis of autophagy-related genes in Medicago truncatula highlights their roles in seed development and response to drought stress. Sci Rep.;11(1):22933. doi:10.1038/s41598-021-02239-6.
399. 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. (2017) Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in Medicago truncatula. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 27;114(26):6848-6853. doi: 10.1073/pnas.1700460114.
400. Yano K., Yoshida S., Müller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Schuller B., Sato S. (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,105:20540–20545
401. Yokota K, Fukai E, Madsen LH, Jurkiewicz A, Rueda P, Radutoiu S, Held M, Hossain MS, Szczyglowski K, Morieri G, Oldroyd GE, Downie JA, Nielsen MW, *et al.* Stougaard J. (2009) Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of Lotus japonicus roots by Mesorhizobium loti. Plant Cell. 21(1):267-84. doi: 10.1105/tpc.108.063693.
402. Yoon TY, Munson M. (2018) SNARE complex assembly and disassembly. Curr Biol. 23;28(8):R397-R401. doi: 10.1016/j.cub.2018.01.005.
403. Yu H, Xiao A, Wu J, *et al.* (2023) GmNAC039 and GmNAC018 activate the expression of cysteine protease genes to promote soybean nodule senescence. Plant Cell. 35(8):2929-2951. doi:10.1093/plcell/koad129.
404. Yuan S.; Ke, D.; Li, R.; Li, X.; Wang, L.; Chen, H.; Zhang, C.; Huang, Y.; Chen, L.; Hao, Q.; *et al.* (2020) Genome-wide survey of soybean papain-like cysteine proteases and their expression analysis in root nodule symbiosis. BMC Plant Biol. 20, 517. doi: 10.1186/s12870-020-02725-5.
405. Yuan S.; Li, R.; Wang, L.; Chen, H.; Zhang, C.; Chen, L.; Hao, Q.; Shan, Z.; Zhang, X.; Chen, S.; *et al.* (2016) Search for Nodulation and Nodule Development-Related

- Cystatin Genes in the Genome of Soybean (*Glycine max*). *Front. Plant Sci.* 7, 1595. doi: 10.3389/fpls.2016.01595.
406. Zepeda I.; Sánchez-López, R.; Kunkel, J.G.; Bañuelos, L.A.; Hernández-Barrera, A.; Sánchez, F.; Quinto, C.; Cárdenas, L. (2014) Visualization of highly dynamic F-actin plus ends in growing *Phaseolus vulgaris* root hair cells and their responses to *Rhizobium etli* Nod factors. *Plant Cell Physiol.*, 55, 580–592. doi: 10.1093/pcp/pct202.
407. Zhang B., Karnik R, Wang Y, Wallmeroth N, Blatt MR, Grefen C. (2015) The Arabidopsis R-SNARE VAMP721 interacts with KAT1 and KC1 K⁺ channels to moderate K⁺ current at the plasma membrane. *Plant Cell*, 27: 1697–1717. doi: 10.1105/tpc.15.00305.
408. Zhang J., Diaz A., Mao L., Ahlquist P., Wang X. *J Virol.* (2012) Host acyl coenzyme A binding protein regulates replication complex assembly and activity of a positive-strand RNA virus., *J Virol.* 86(9):5110-21, doi: 10.1128/JVI.06701-11.
409. Zhang L., Ma J, Liu H, Yi Q, Wang Y, Xing J, Zhang P, Ji S, Li M, Li J, Shen J, Lin J. (2021) SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 mediate the post-Golgi trafficking required for auxin-mediated development in Arabidopsis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631-643. doi: 10.1111/tpj.15450.
410. Zhang M.; Cao, J.; Zhang, T.; Xu, T.; Yang, L.; Li, X.; Ji, F.; Gao, Y.; Ali, S.; Zhang, Q.; *et al.* (2022) A Putative Plasma Membrane Na⁺/H⁺Antiporter GmSOS1 Is Critical for Salt Stress Tolerance in *Glycine max*. *Front. Plant Sci.* 13, 870695. doi: 10.3389/fpls.2022.870695.
411. Zhang X.; Han, L.; Wang, Q.; Zhang, C.; Yu, Y.; Tian, J.; Kong, Z. (2019) The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 221, 1049–1059. DOI: 10.1111/nph.15423.
412. Zhang Y., Fu Y, Xian W, *et al.* (2024) Comparative phylogenomics and phylotranscriptomics provide insights into the genetic complexity of nitrogen-fixing root-nodule symbiosis. *Plant Commun.*, 5(1):100671. doi: 10.1016/j.xplc.2023.100671.
413. Zhang Y.G., Pagani M., Liu Z., Bohaty S.M., Deconto R. (2013) A 40-million-year history of atmospheric CO₂. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 371 Article 20130096.
414. Zhao C.; Zhang, H.; Song, C.; Zhu, J.K.; Shabala, S. (2020) Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *Innovation*, 1, 100017. doi: 10.1016/j.xinn.2020.100017.
415. Zhao S, Zhang Q, Liu M, Zhou H, Ma C, Wang P. (2021) Regulation of Plant Responses to Salt Stress. *Int J Mol Sci.* 28;22(9):4609. doi: 10.3390/ijms 22094609.
416. Zhou S, Zhang C, Huang Y, Chen H, Yuan S, Zhou X. (2021) Characteristics and Research Progress of Legume Nodule Senescence. *Plants (Basel).* 30;10(6):1103. doi: 10.3390/plants10061103.