

<https://doi.org/10.17816/ecogen17171-80>

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) *cdt* (*cadmium tolerance*) НА ГИСТОЛОГИЧЕСКУЮ И УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ КЛУБЕНЬКОВ

© А.В. Цыганова¹, Е.В. Селивёрстова^{1,2}, В.Е. Цыганов¹¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург;² ФГБНУ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург

Для цитирования: Цыганова А.В., Селивёрстова Е.В., Цыганов В.Е. Влияние мутации в гене гороха (*Pisum sativum* L.) *cdt* (*cadmium tolerance*) на гистологическую и ультраструктурную организацию клубеньков // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 1. — С. 71–80. <https://doi.org/10.17816/ecogen17171-80>.

Поступила: 10.12.2018

Одобрена: 19.02.2019

Принята: 25.03.2019

✿ Был проведен сравнительный анализ структурной организации симбиотических клубеньков исходной линии гороха SGE и мутантной линии SGEcd¹, характеризующейся повышенной устойчивостью к кадмию и увеличенной его аккумуляцией. Было показано, что не обработанные CdCl₂ клубеньки SGE и SGEcd¹ имели сходную гистологическую и ультраструктурную организацию. При действии 100 мкМ CdCl₂ в клубеньках SGE в инфицированных клетках наблюдались следующие аномалии: расширение перибактероидного пространства, разрушение симбиосомной мембраны, слияние симбиосом и, как следствие, образование симбиосом, содержащих несколько бактериоидов. В клубеньках SGEcd¹ инфицированные клетки в зонах инфекции и азотфиксации не были подвержены сильным изменениям. При действии 1 мМ CdCl₂ в основании клубеньков SGE появлялись стареющие инфицированные клетки с полностью разрушенной цитоплазмой и деградирующими бактериоидами. Присутствовали также клетки, в которых содержимое симбиосом лизировалось, и в них оставались лишь «тени» бактериоидов. У SGEcd¹ в некоторых инфицированных клетках аномалии проявлялись в увеличении перибактероидного пространства, частичном разрушении симбиосомных мембран, слиянии симбиосом и высвобождении бактериоидов в вакуоль. Таким образом, устойчивость клубеньков гороха к кадмию может быть повышена благодаря единичной рецессивной мутации *cdt*.

✿ **Ключевые слова:** растительно-микробные взаимодействия; симбиотический клубенек; устойчивость к кадмию; симбиосома; бактериоид; инфекционная нить.

INFLUENCE OF MUTATION IN PEA (*PISUM SATIVUM* L.) *cdt* (*cadmium tolerance*) GENE ON HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL NODULE ORGANIZATION

© A.V. Tsyganova¹, E.V. Seliverstova^{1,2}, V.E. Tsyganov¹¹ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, Saint Petersburg, Russia

For citation: Tsyganova AV, Seliverstova EV, Tsyganov VE. Influence of mutation in pea (*Pisum sativum* L.) *cdt* (*cadmium tolerance*) gene on histological and ultrastructural nodule organization. *Ecological genetics*. 2019;17(1):71-80. <https://doi.org/10.17816/ecogen17171-80>.

Received: 10.12.2018

Revised: 19.02.2019

Accepted: 25.03.2019

✿ **Background.** A comparative analysis out of the structural organization of the symbiotic nodules of the pea initial line SGE and the mutant line SGEcd¹, characterized by increased tolerance to cadmium and increased its accumulation, was carried out. **Materials and methods.** Nodules of initial line SGE and mutant SGEcd¹ were analyzed using light and transmission electron microscopy. **Results.** The non-treated nodules of SGE and SGEcd¹ were characterized by a similar histological and ultrastructural organization. In the nodules of SGE exposed to 100 μM CdCl₂ in infected cells, the following abnormalities were observed: expansion of the peribacteroid space, destruction of the symbiosome membrane, fusion of symbiosomes and, as a result, the formation of symbiosomes containing several bacteroids. In the nodules of SGEcd¹, infected cells did not undergo pronounced changes. In the nodules of SGE exposed to 1 mM CdCl₂, at the base of the nodule, senescent infected cells with completely destroyed cytoplasm and degrading bacteroids appeared. Also there were present cells in which the contents of symbiosomes were lysing, and only the “ghosts” of the bacteroids remained in them. In SGEcd¹, in some infected cells, abnormalities were manifested in an increase in the peribacteroid space, partial destruction of symbiosome membranes, fusion of symbiosomes, and release of bacteroids into the vacuole. **Conclusions.** The tolerance of pea nodules to cadmium can be significantly increased due to a single recessive *cdt* mutation.

✿ **Keywords:** plant-microbe interactions; symbiotic nodule; tolerance to cadmium; symbiosome; bacteroid; infection thread.

ВВЕДЕНИЕ

Кадмий попадает в окружающую среду в результате естественных процессов, а также из-за постоянно уве-

личивающейся антропогенной деятельности [1]. Из почвы кадмий поглощается корнями, откуда он поступает в наземные части растений. При этом кадмий — это

токсичный элемент, который вызывает различные аномалии в развитии растений [2, 3]. Растения отличаются по степени устойчивости к кадмию, большинство из них проявляют основную устойчивость, но встречаются растения, демонстрирующие гиперустойчивость, которая может сопровождаться гипераккумуляцией [4, 5]. Оба вида устойчивости характеризуются разнообразными молекулярно-генетическими, биохимическими и клеточными механизмами [6].

Кадмий влияет не только на развитие и функционирование растений, но и на их взаимодействие с симбиотическими микроорганизмами [7–12]. Было установлено, что развитие растений гороха, а особенно рост ризобий, ингибируется при значительно более высоких концентрациях кадмия по сравнению с развитием клубеньков [13]. Очевидно, что для создания резистентных к кадмию растительно-микробных систем необходимо повысить устойчивость к нему процесса образования клубеньков. Поскольку ризобиям свойственен высокий уровень устойчивости к кадмию [13], представляется целесообразным повысить уровень устойчивости симбиотической системы за счет изменений в геноме растения.

Мутантная линия гороха SGE^{Cd}, характеризующаяся как повышенной устойчивостью к кадмию, так и увеличенным его накоплением в тканях растения, была получена в результате использования ЭМС-мутагенеза. Мутантная линия SGE^{Cd} несет рецессивную мутацию *cdt* [14], локализованную в VI группе сцепления гороха [15, 16]. В результате прививочных экспериментов было показано, что генотип корня определяет повышенную устойчивость к кадмию и увеличенное его накопление в тканях мутантной линии [17].

Мутантная линия SGE^{Cd} обладает повышенной устойчивостью к действию кадмия в процессе образования клубеньков по сравнению с исходной линией SGE [13, 18]. Однако влияние кадмия на структурную организацию зрелых клубеньков у мутантной линии не изучено.

Цель данной работы заключалась в анализе влияния кадмия на структурную организацию симбиотических клубеньков у исходной линии SGE и мутантной линии SGE^{Cd}.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Растительный материал

В исследовании были использованы мутантная линия гороха посевного (*Pisum sativum* L.) SGE^{Cd} (*cdt*), характеризующаяся повышенной устойчивостью к кадмию и увеличенной его аккумуляцией [14], и исходная линия SGE [19] из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ.

Штамм бактерий

Растения были инокулированы коммерческим штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (= CIAM 1026) [20] из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ.

Условия выращивания и сбор материала для анализа

Семена стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 30 мин и промывали стерильной водой 10 раз. Семена располагали на плотиках, плавающих в гидропонном растворе, причем корневая система находилась в растворе, а семядоля и побег — на поверхности плотика. Гидропонный раствор имел следующий состав: KH_2PO_4 — 110 мМ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — 50 мМ; MgSO_4 — 400 мМ; KCl — 300 мМ; CaCl_2 — 70 мМ; H_3BO_3 — 1 мМ; MnSO_4 — 1 мМ; ZnSO_4 — 1 мМ; Na_2MoO_4 — 0,03 мМ; $\text{FeC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ — 2,5 мМ. Гидропонный раствор подвергали постоянному барботированию, смену раствора гидропоники проводили каждые 3 дня. Растения были выращены в климатической камере MLR-352H (Sanyo Electric Co., Ltd., Япония) в режиме день/ночь 16/8 ч при 21 °С, относительной влажности 75 %, освещенности 280 мкМ фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Через 23 дня после инокуляции в гидропонный раствор был добавлен CdCl_2 до концентраций 100 мкМ и 1 мМ. Через 24 ч после добавления CdCl_2 клубеньки с пяти растений были собраны для фиксации.

Микроскопический анализ

Для электронно-микроскопического анализа клубеньки подвергали мягкому вакуумированию и фиксировали в 2,5 % растворе глутаральдегида на 0,3 М фосфатном буфере (pH 7,2) при 4 °С в течение ночи. После фиксации образцы промывали в четырех сменах 0,3 М фосфатного буфера и дополнительно фиксировали в 1 % растворе четырехоксида осмия на 0,3 М фосфатном буфере в течение 2 ч. После промывания в трех сменах по 15 мин в дистиллированной воде образцы обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации — 50 %, 70 % (оставляли на ночь при температуре 4 °С), 96 % по 15 мин в каждом, в двух сменах абсолютного этанола по 10 мин, в смеси абсолютного этанола и ацетона в соотношении 1 : 1 в течение 10 мин, в двух сменах ацетона по 10 мин.

В качестве заливочной среды применяли смолу Epon 812 с катализатором DMP-30 (Honeywell FlukaTM, Fisher Scientific, Великобритания). Ткани пропитывали в смесях абсолютного ацетона и заливочной среды в соотношении 1 : 1 и 1 : 3 в течение 1 ч каждая и далее в чистой смоле в течение ночи при комнатной температуре. Заливку клубеньков осуществляли путем переноса образцов в предварительно просушенные полиэтиленовые капсулы, заполненные свежей заливочной средой. Полимеризацию выполняли при температуре 60 °С в течение двух суток в термостате IN55 (Memmert GmbH, Германия).

Полутонкие срезы (0,5–1 мкм) окрашивали толлуидиновым синим и изучали под микроскопом Leica DM LB2 (Leica Microsystems, Австрия), используя объективы $\times 5$, $\times 10$ и $\times 20$. Ультратонкие срезы толщиной 90–100 нм готовили на ультратоме Leica Ultracut UCT (Leica Microsystems, Австрия) и собира-

ли на медные сеточки, покрытые формваром. Ультратонкие срезы контрастировали 1 % водным раствором уранилацетата в течение 20 мин и цитратом свинца по Рейнольдсу в течение 1 мин. Наблюдение и съемку ультратонких срезов проводили на трансмиссионном электронном микроскопе LEO 910 (LEO Electron Microscopy Group, Германия) при ускоряющем напряжении 60 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гистологическая и ультраструктурная организация симбиотических клубеньков гороха исходной линии SGE и мутантной линии SGECd¹

Клубеньки линий SGE и SGECd¹, выращенные в условиях гидропонной культуры без добавления CdCl₂, обладали сходной гистологической организацией, типичной для клубеньков недетерминированного типа, в которых выделялись меристема, зона инфекции и зона азотфиксации (рис. 1, а, б). Тем не менее

отдельные клетки подверглись деградации, вызванной, вероятно, условиями роста в гидропонной культуре (см. рис. 1, а, б). Ультраструктурная организация таких клубеньков была сходна у SGE и SGECd¹ и не отличалась от ранее описанной для клубеньков гороха. Наблюдались инфекционные нити, заполненные бактериями (рис. 1, ж), симбиосомы, содержащие единичные плейоморфные бактериоиды (рис. 1, з).

Гистологическая и ультраструктурная организация симбиотических клубеньков гороха исходной линии SGE и мутантной линии SGECd¹ при воздействии 100 мкМ CdCl₂

При обработке корневых систем различными концентрациями CdCl₂ воздействию подвергались клубеньки различного возраста, при этом зрелые клубеньки характеризовались большим размером по сравнению с молодыми. Соответственно, они отличались большей устойчивостью к воздействию и были проанализированы в ходе данного исследования.

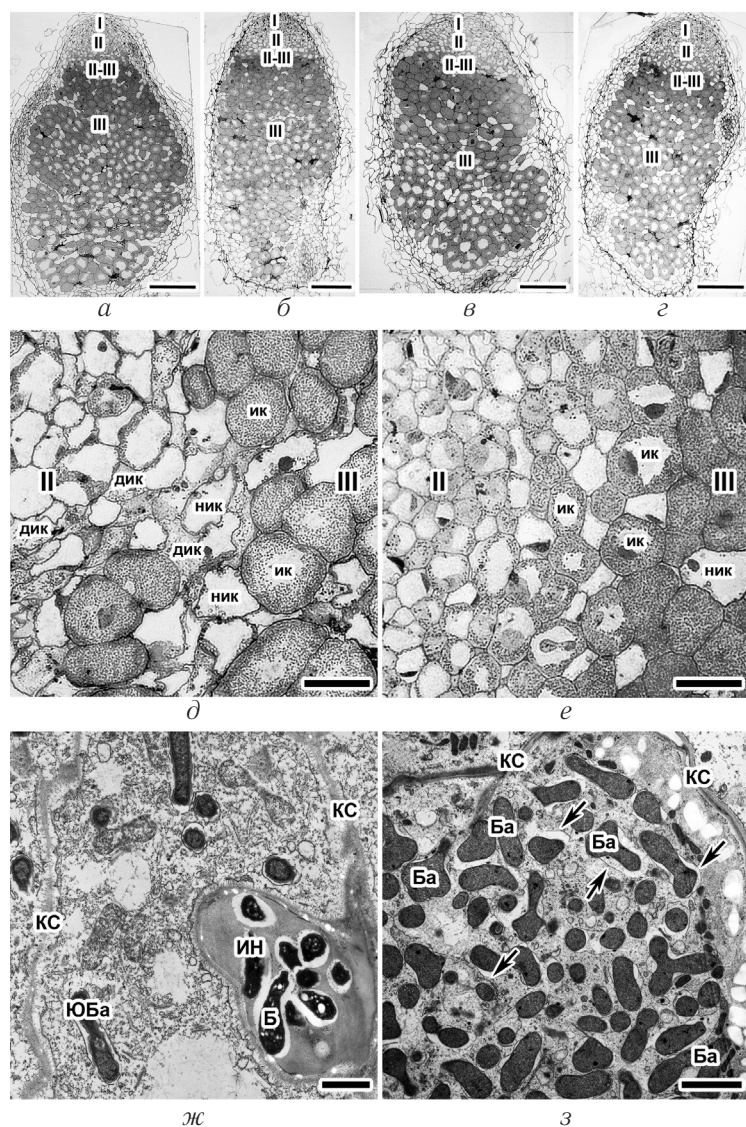


Рис. 1. Гистологическая организация клубеньков гороха исходной линии SGE и мутантной линии SGECd¹, не обработанных и обработанных 100 мкМ CdCl₂, и ультраструктурная организация необработанных клубеньков SGECd¹: а — гистологическая организация необработанных клубеньков SGE; б — гистологическая организация необработанных клубеньков SGECd¹; в, д — гистологическая организация клубеньков SGE, обработанных 100 мкМ CdCl₂; г, е — гистологическая организация клубеньков SGECd¹, обработанных 100 мкМ CdCl₂; ж — инфицированная клетка SGECd¹ из зоны инфекции с инфекционной нитью и ювенильными бактериоидами; з — инфицированная клетка SGECd¹ из зоны азотфиксации с плейоморфными бактериоидами. I — меристема, II — зона инфекции, II–III — переходная зона между зонами инфекции и азотфиксации, III — зона азотфиксации, ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка, ДИК — деградирующая инфицированная клетка, ИН — инфекционная нить, КС — клеточная стенка, Б — бактерия, Ба — бактериоид, ЮБа — ювенильный бактериоид; стрелки указывают на симбиосомную мембрану. Масштабная линейка: а–г — 100 мкм, д, е — 20 мкм, ж, з — 1 мкм

В зрелых клубеньках SGE и SGEcd¹ присутствовали все гистологические зоны (рис. 1, *в, г*), но в клубеньках исходной линии выявлялись инфицированные клетки с признаками деградации (рис. 1, *д*). При этом в клубеньках у мутантной линии отмеченные нарушения отсутствовали (рис. 1, *е*).

В зрелых клубеньках SGE инфицированные клетки в зоне азотфиксации были заполнены многочисленными

бактероидами (рис. 2, *а*). Мембраны бактериоидов характеризовались повышенной складчатостью (рис. 2, *б*). Перибактероидное пространство в симбиозах было увеличено, часто наблюдалось разрушение симбиосомных мембран и слияние симбиосом, что приводило к появлению симбиосом, содержащих несколько бактериоидов (см. рис. 2, *б*). Инфекционные нити имели ультраструктурную организацию, близкую к норме, однако у некото-

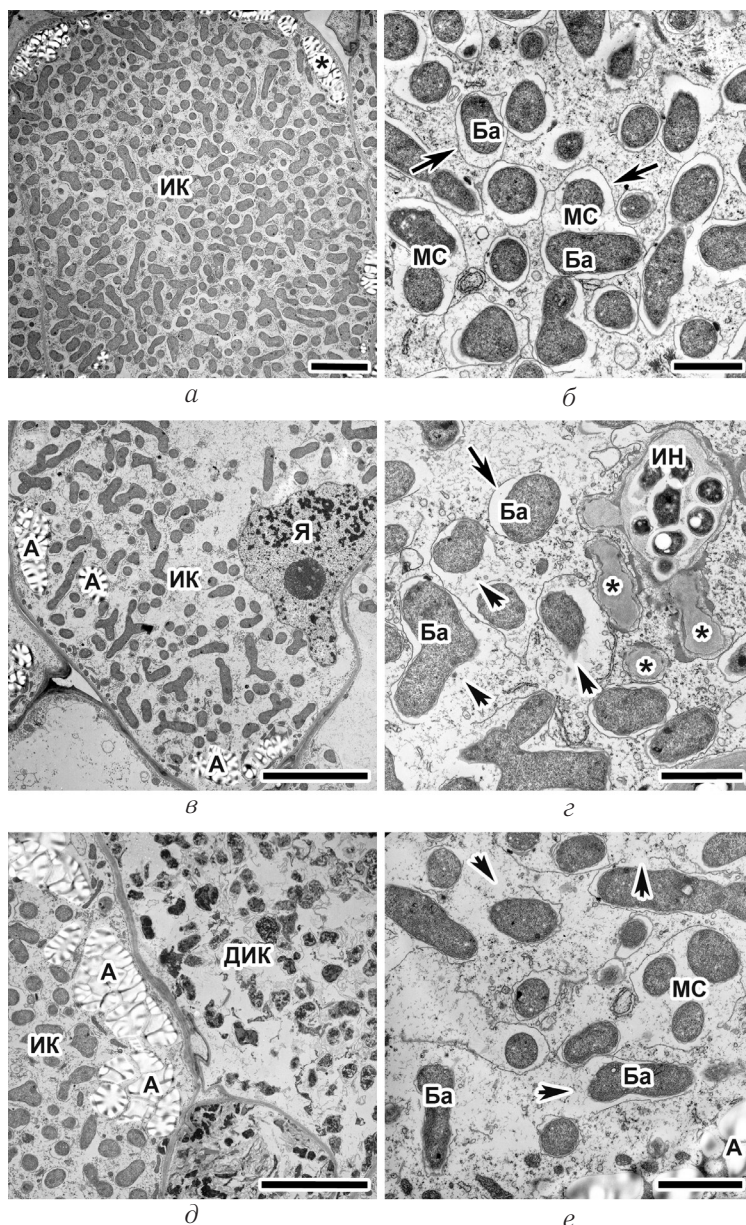


Рис. 2. Ультраструктурная организация клубеньков гороха исходной линии SGE, обработанных 100 мкМ CdCl₂: *а, б* — инфицированные клетки из зоны азотфиксации с плеiomорфными бактериоидами; *в, г* — инфицированные клетки из зоны азотфиксации с первичными признаками старения (деградация цитоплазмы и нарушения строения инфекционных нитей); *д, е* — деградирующие инфицированные клетки из зоны старения. ИК — инфицированная клетка, ДИК — деградирующая инфицированная клетка, Я — ядро, А — амилопласт, ИН — инфекционная нить, Ба — бактериоид, МС — «множественная» симбиосома, образующаяся в результате слияния симбиосом и содержащая несколько бактериоидов; стрелки указывают на симбиосомную мембрану, наконечники стрелок — на разрушающиеся симбиосомные мембраны, звездочки — на выросты инфекционной нити, содержащие матрикс без бактерий. Масштабная линейка: *а, в, д* — 5 мкм; *б, г, е* — 1 мкм

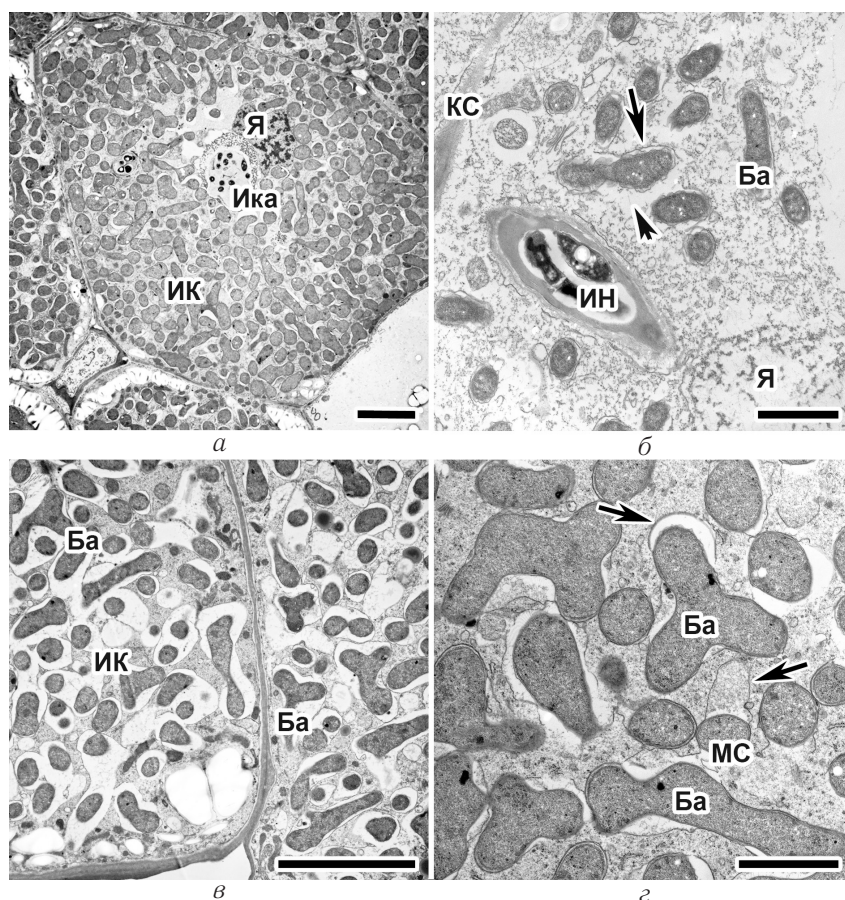


Рис. 3. Ультраструктурная организация клубеньков гороха мутантной линии $SGECd^1$, обработанных 100 мкМ CdCl_2 : а — инфицированная клетка из зоны азотфиксации с инфекционной нитью и инфекционной каплей; б — инфицированная клетка из зоны инфекции с инфекционной нитью и ювенильными бактериоидами; в — инфицированные клетки из зоны азотфиксации, заполненные симбиосомами с расширенными перибактероидными пространствами; г — плеоморфные бактериоиды из зоны азотфиксации. ИК — инфицированная клетка, Я — ядро, КС — клеточная стенка, ИН — инфекционная нить, Ика — инфекционная капля, Ба — бактериоид, МС — «множественная» симбиосома, образующаяся в результате слияния симбиосом и содержащая несколько бактериоидов; стрелки указывают на симбиосомную мембрану, наконечники стрелок — на разрушение симбиосомных мембран. Масштабная линейка: а — 5 мкм ; б, г — 1 мкм ; в — 2 мкм

рых присутствовали многочисленные выросты, окруженные клеточной стенкой и заполненные матриксом без бактерий (рис. 2, г). В инфицированных клетках с признаками деградации симбиосомные мембраны разрушались (см. рис. 2, г), в результате чего бактериоиды высвобождались в просветленную цитоплазму (рис. 2, в, е) и претерпевали полную деградацию (рис. 2, д).

В зрелых клубеньках $SGECd^1$ инфицированные клетки в зонах инфекции и азотфиксации не были подвержены сильным изменениям (рис. 3, а). Строение инфекционных нитей и капель не отличалось от таковых у необработанных растений (рис. 3, а, б). Однако в некоторых инфицированных клетках из зон инфекции и азотфиксации наблюдались симбиосомы с увеличенным перибактероидным пространством (рис. 3, б, в). Кроме того, в инфицированных клетках в зоне азотфиксации встречались признаки разрушения симбиосомных

мембран и слияния симбиосом (рис. 3, г). В основании клубенька в отдельных клетках были заметны признаки деградации: разрушение цитоплазмы и органелл растительных клеток, высвобождение бактериоидов из симбиосом (данные не представлены).

Гистологическая и ультраструктурная организация симбиотических клубеньков гороха исходной линии SGE и мутантной линии $SGECd^1$ при воздействии 1 мМ CdCl_2

В зрелых клубеньках SGE инфицированные клетки зоны азотфиксации часто имели неровную, складчатую поверхность (данные не представлены). Зрелые клубеньки $SGECd^1$ имели строение, сходное с клубеньками, обработанными 100 мкМ CdCl_2 (данные не представлены).

При анализе ультраструктурной организации в зрелых клубеньках SGE наблюдались признаки преждевременной деградации симбиотических ком-

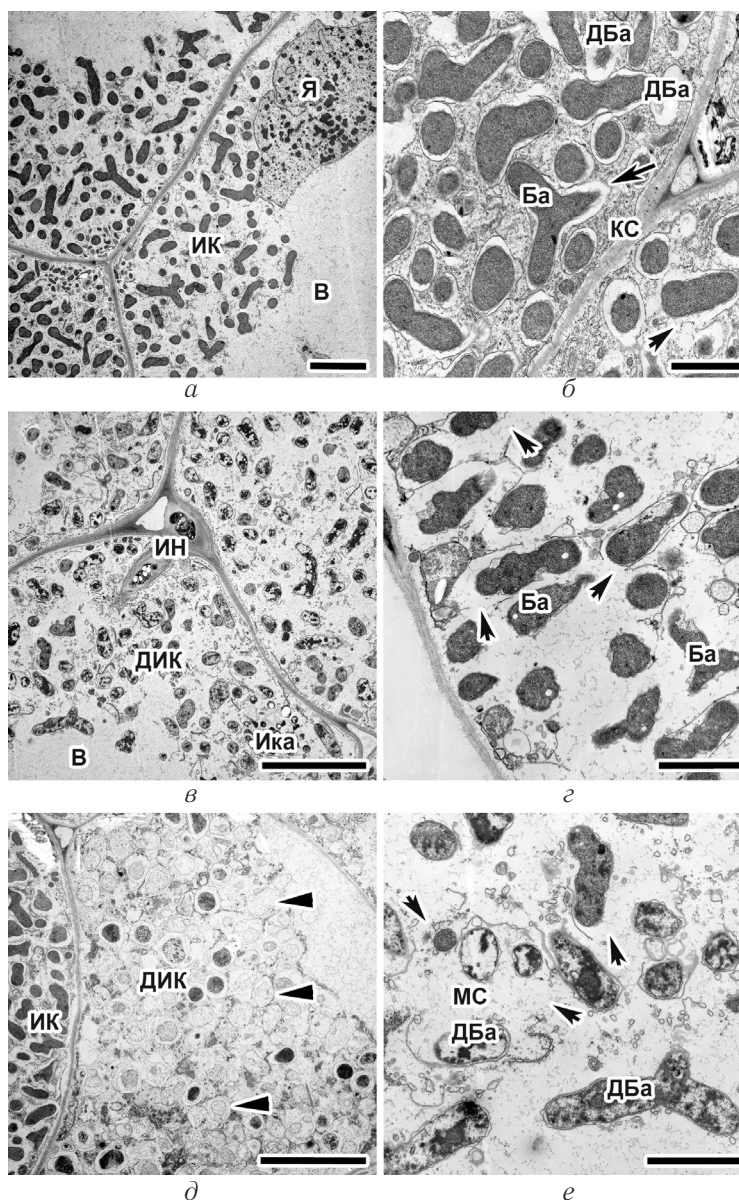


Рис. 4. Ультраструктурная организация клубеньков гороха исходной линии SGE, обработанных 1 мМ CdCl_2 : *а* — инфицированные клетки из зоны азотфиксации с начальными признаками деградации; *б* — плеiomорфные бактериоды из зоны азотфиксации; *в* — деградирующая инфицированная клетка из зоны старения с инфекционной нитью и инфекционной каплей; *г* — бактериоды нерегулярной формы и со складчатой поверхностью в деградирующей инфицированной клетке из зоны старения; *д* — деградирующая инфицированная клетка из зоны старения, заполненная «теньями» бактериодов; *е* — деградирующие бактериоды с частично просветленным матриксом и разрушенной симбиотической мембраной. ИК — инфицированная клетка, ДИК — деградирующая инфицированная клетка, Я — ядро, В — вакуоль, КС — клеточная стенка, ИН — инфекционная нить, Ика — инфекционная капля, Ба — бактериод, ДБа — деградирующий бактериод, МС — «множественная» симбиосома, образующаяся в результате слияния симбиосом и содержащая несколько бактериодов; стрелки указывают на симбиотическую мембрану, наконечники стрелок — на разрушение симбиотических мембран, треугольники — на «тени» бактериодов. Масштабная линейка: *а, в, д* — 5 мкм; *б, г, е* — 1 мкм

партментов (рис. 4, *а, в, д*). В зоне азотфиксации в большинстве клеток симбиотические мембраны были частично или полностью разрушены, встречались деградирующие бактериоды (рис. 4, *б*). В зоне старения присутствовали клетки с полностью разру-

шенной цитоплазмой и деградирующими, свободно расположенными бактериодами (рис. 4, *в, г*). Бактериоды приобретали нерегулярную форму, складчатую поверхность (см. рис. 4, *г*), матриксы в них частично или полностью просветлялись (рис. 4, *в, е*). Выявлялись

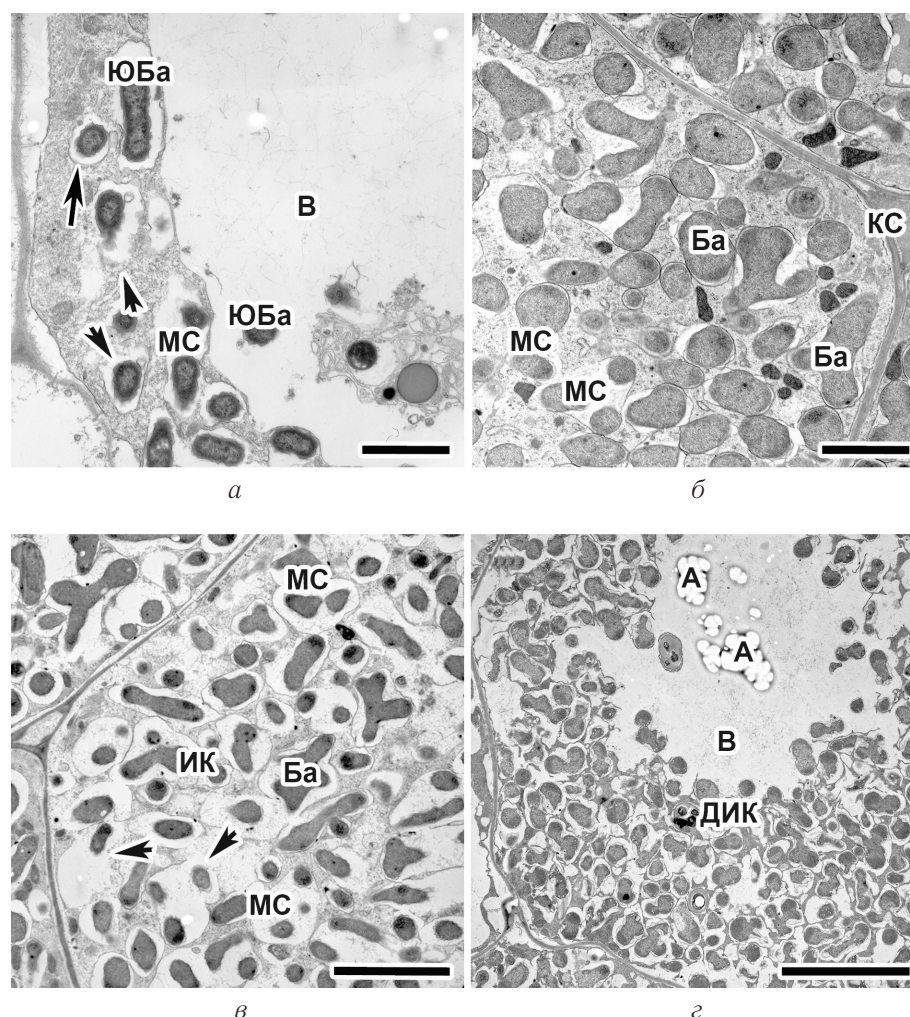


Рис. 5. Ультраструктурная организация клубеньков гороха мутантной линии $SGECd^1$, обработанных 1 мМ $CdCl_2$: а — инфицированная клетка из зоны инфекции с ювенильными бактериоидами; б — плеоморфные бактериоиды в инфицированной клетке из зоны азотфиксации; в — инфицированная клетка из зоны азотфиксации с начальными признаками деградации симбиозом: расширением перибактероидного пространства, разрушением симбиозомной мембраны и слиянием симбиозом; г — деградирующая инфицированная клетка из зоны старения. ИК — инфицированная клетка, В — вакуоль, КС — клеточная стенка, А — амилопласт, Ба — бактериоид, ЮБа — ювенильный бактериоид, МС — «множественная» симбиосома, образующаяся в результате слияния симбиозом и содержащая несколько бактериоидов, стрелки указывают на симбиозомную мембрану, наконечники стрелок — на разрушение симбиозомных мембран. Масштабная линейка: а, б — 1 мкм; в — 2 мкм; г — 5 мкм

клетки, в которых содержимое симбиозом было лизировано, и в них присутствовали лишь мембраны бактериоидов (рис. 4, д).

Анализ ультраструктурной организации зрелых клубеньков $SGECd^1$ показал, что в инфицированных клетках в зоне инфекции мембраны бактериоидов характеризовались повышенной складчатостью (рис. 5, а). Перибактероидное пространство в симбиозомах было увеличено, симбиозомные мембраны в некоторых клетках зоны инфекции были частично разрушены, в результате чего ювенильные бактериоиды высвобождались в вакуоль (см. рис. 5, а). В зоне азотфиксации в инфицированных клетках наблюдалось слияние симбиозом

(рис. 5, б), при этом происходило увеличение перибактероидного пространства с разрушением симбиозомных мембран (рис. 5, в). В отдельных стареющих клетках была видна деструкция симбиозом и тонопласта инфицированных клеток (рис. 5, г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования влияния кадмия на развитие и функционирование симбиотических клубеньков на структурном уровне немногочисленны. Так, при концентрации 18 мкМ Cd^{2+} происходили изменения в гистологической и ультраструктурной организации клубеньков у люпина белого (*Lupinus albus* L.) при

выращивании растений в течение 49 дней. Наблюдались заполнение гликопротеинами межклеточных пространств в коре клубенька и деградация бактериоидов в части инфицированных клеток [8]. В клубеньках сои (*Glycine max* (L.) Мегг.) с увеличением концентрации кадмия уменьшались число инфицированных клеток в зоне азотфиксации и число бактериоидов в симбиосомах [7]. Наиболее детально влияние кадмия на структуру клубеньков было изучено для люцерны (*Medicago sativa* L.) [9]. Было показано, что обработка кадмием приводит к нарушениям формы инфицированных и неинфицированных клеток, исчезновению в них органелл, при этом в инфицированных клетках сохранялись инфекционные нити. В зоне азотфиксации формировалось много мелких вакуолей вместо одной центральной. В результате анализа ультраструктурной организации клубеньков было установлено, что в зоне инфекции присутствуют клетки как с нормальными инфекционными нитями и бактериоидами, так и сильно поврежденные, с разрушенными бактериоидами и очень темной цитоплазмой. В зоне азотфиксации отмечались клетки с многочисленными вакуолями и проявлениями плазмолиза. При этом, кроме симбиосом и митохондрий, другие органеллы не наблюдались. Бактериоиды подвергались деградации, а симбиосомы характеризовались нерегулярной формой. В некоторых клубеньках влияние кадмия было менее выражено и симптомы деградации в инфицированных клетках в зоне азотфиксации проявлялись лишь в увеличении перибактероидного пространства и усилении слияния симбиосом, в результате чего они содержали несколько бактериоидов [9]. В этой же работе изучалось влияние на устойчивость клубеньков к кадмию штамма *Sinorhizobium meliloti* со сверхэкспрессией флаводоксина. Такие клубеньки были более устойчивы к кадмию, симптомы повреждений в них были менее выражены. В некоторых клетках зоны инфекции они проявлялись в расширении перибактероидного пространства и захвате бактерий вакуолью, а в зоне азотфиксации деградации подвергались симбиосомы, содержащие несколько бактериоидов [9]. Таким образом, как в клубеньках люцерны, так и в клубеньках гороха кадмий индуцирует слияние симбиосом и появление симбиосом, содержащих несколько бактериоидов, что может рассматриваться как признак активации старения симбиотического клубенька [21]. Кроме того, в клетках обоих видов зафиксировано присутствие бактерий в вакуоли, что свидетельствует о потере тонопластом его целостности, служит одним из проявлений программируемой клеточной гибели [22] и часто наблюдается во время старения клубенька [23, 24].

Генетические модели практически не применяли при изучении функционирования клубеньков в условиях кадмиевого стресса. Лишь для гороха было

проведено исследование, в котором изучали влияние кадмия на развитие клубеньков у двух контрастных генотипов: VIR8456 и VIR3429, различающихся по устойчивости к кадмию [25]. Клубеньки VIR8456 при концентрации в почве 4,4 ppm Cd были менее устойчивы, в инфицированных клетках происходила деградация перибактероидных мембран и аккумуляция электронно-плотных включений. При концентрации в почве 22 ppm Cd аномалии на ультраструктурном уровне наблюдались в клубеньках обоих генотипов, хотя у VIR8456 они были выражены в большей степени [26].

Таким образом, данная работа является пионерным исследованием генетического контроля функционирования симбиотических клубеньков в условиях кадмиевого стресса. Полученные результаты показали, что устойчивость клубеньков гороха к кадмию может быть значительно повышена за счет единичной рецессивной мутации *cdt*.

Данная работа поддержана грантом Российского научного фонда (17-76-30016).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Singh OV, Labana S, Pandey G, et al. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;61(5-6):405-412. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1244-4>.
2. Sanità di Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*. 1999;41(2):105-130. [https://doi.org/10.1016/s0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/s0098-8472(98)00058-6).
3. He S, Yang X, He Z, Baligar VC. Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: A review. *Pedosphere*. 2017;27(3):421-438. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(17)60339-4).
4. Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*. 2001;212(4):475-486. <https://doi.org/10.1007/s004250000458>.
5. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*. 2006;88(11):1707-1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>.
6. Kulaeva OA, Tsyganov VE. Molecular-genetic basis of cadmium tolerance and accumulation in higher plants. *Russ J Genet Appl Res*. 2011;1(5):349-360. <https://doi.org/10.1134/s2079059711050108>.
7. Chen YX, He YF, Yang Y, et al. Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. *Chemosphere*. 2003;50(6):781-787. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(02\)00219-9](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(02)00219-9).

8. Carpena RO, Vázquez S, Esteban E, et al. Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiol Biochem.* 2003;41(10):911-919. [https://doi.org/10.1016/s0981-9428\(03\)00136-0](https://doi.org/10.1016/s0981-9428(03)00136-0).
9. Shvaleva A, Coba de la Peña T, Rincón A, et al. Flavodoxin overexpression reduces cadmium-induced damage in alfalfa root nodules. *Plant Soil.* 2010;326(1-2):109-121. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9985-1>.
10. Garg N, Bhandari P. Influence of cadmium stress and arbuscular mycorrhizal fungi on nodule senescence in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Int J Phytoremediation.* 2012;14(1):62-74. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.573822>.
11. Chubukova OV, Postrigan' BN, Baimiev AK, Chermeris AV. The effect of cadmium on the efficiency of development of legume-rhizobium symbiosis. *Biol Bull.* 2015;42(5):458-462. <https://doi.org/10.1134/s1062359015050040>.
12. Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, et al. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J Exp Bot.* 2002;53(371):1177-1185. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.371.1177>.
13. Belimov AA, Puhalsky IV, Safronova VI, et al. Role of plant genotype and soil conditions in symbiotic plant-microbe interactions for adaptation of plants to cadmium-polluted soils. *Water Air Soil Pollut.* 2015;226(8):264. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2537-9>.
14. Tsyganov VE, Belimov AA, Borisov AY, et al. A chemically induced new pea (*Pisum sativum*) mutant SGECD^t with increased tolerance to, and accumulation of, cadmium. *Ann Bot.* 2007;99(2):227-237. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl261>.
15. Tsyganov VE, Kulaeva OA, Knox MR, et al. Using of SSAP analysis for primary localization of mutation *cdt* (cadmium tolerance) in pea linkage group VI. *Russ J Genet Appl Res.* 2013;3(2):152-155. <https://doi.org/10.1134/s2079059713020081>.
16. Kulaeva OA, Tsyganov BE. Fine mapping of a *cdt* locus mutation that leads to an increase in the tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to cadmium. *Russ J Genet Appl Res.* 2013;3(2):120-126. <https://doi.org/10.1134/s2079059713020020>.
17. Belimov AA, Malkov NV, Puhalsky JV, et al. The crucial role of roots in increased cadmium-tolerance and Cd-accumulation in the pea mutant *SGECD^t*. *Biol Plant.* 2018;62(3):543-550. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0789-0>.
18. Tsyganov VE, Zhernakov AI, Khodorenko AV, et al. Mutational analysis to study the role of genetic factors in pea adaptation to stresses during development its symbioses with *Rhizobium* and mycorrhizal fungi. In: Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment. Ed. by Y.P. Wang, M. Lin, Z.X. Tian, et al. Dordrecht: Springer; 2005. P. 279-281.
19. Kosterin OE, Rozov SM. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I. *Pisum Genet.* 1993;25:27-31.
20. Safronova VI, Novikova NI. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen freezing. *J Microbiol Methods.* 1996;24(3):231-237. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00042-9](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00042-9).
21. Hernández-Jiménez MJ, Mercedes Lucas M, de Felipe MR. Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiol Biochem.* 2002;40(6-8):645-657.
22. van Doorn WG. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J Exp Bot.* 2011;62(14):4749-4761. <https://doi.org/10.1093/jxb/err196>.
23. Banba M, Siddique AB, Kouchi H, et al. *Lotus japonicus* forms early senescent root nodules with *Rhizobium etli*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001;14(2):173-180. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.2.173>.
24. Serova TA, Tsyganova AV, Tsyganov VE. Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages. *Protoplasma.* 2018;255(5):1443-1459. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1246-9>.
25. Belimov AA, Safronova VI, Tsyganov VE, et al. Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica.* 2003;131(1):25-35. <https://doi.org/10.1023/a:1023048408148>.
26. Ausili P, Borisov A, Lindblad P, Mårtensson A. Cadmium affects the interaction between peas and root nodule bacteria. *Acta Agric Scand B Soil Plant Sci.* 2002;52(1):8-17. <https://doi.org/10.1080/090647102320259992>.

✿ Информация об авторах

Анна Викторовна Цыганова — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной и клеточной биологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: isaakij@mail.ru.

✿ Information about the authors

Anna V. Tsyganova — Leading Scientist, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: isaakij@mail.ru.

✿ Информация об авторах

Елена Валентиновна Селивёрстова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной и клеточной биологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург; старший научный сотрудник, лаборатория физиологии почки и водно-солевого обмена, ФГБНУ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, Санкт-Петербург. E-mail: elena306@yandex.ru.

Виктор Евгеньевич Цыганов — д-р биол. наук, заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. SPIN: 6532-1332. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.

✿ Information about the authors

Elena V. Seliverstova — Senior Scientist, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia; Senior Scientist, Laboratory of Kidney Physiology and Water-Salt Metabolism, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia. E-mail: elena306@yandex.ru.

Viktor E. Tsyganov — Head of the Laboratory, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. SPIN: 6532-1332. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.