

<https://doi.org/10.17816/ecogen1745-14>

ОРГАНИЗАЦИЯ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В КЛЕТКАХ ЭФФЕКТИВНЫХ И НЕЭФФЕКТИВНЫХ КЛУБЕНЬКОВ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

© А.В. Цыганова¹, В.Е. Цыганов^{1,2}

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург;

² Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербург

Для цитирования: Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Организация эндоплазматического ретикулума в клетках эффективных и неэффективных клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 4. – С. 5–14. <https://doi.org/10.17816/ecogen1745-14>.

Поступила: 04.05.2019

Одобрена: 14.09.2019

Принята: 17.12.2019

✿ Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) является самой большой, окруженной мембраной органеллой, которая выполняет важную роль в функционировании растительной клетки и участвует в ее дифференцировке. С помощью методов просвечивающей электронной микроскопии были исследованы морфологические особенности и динамика структурных изменений ЭПР в симбиотических клубеньках гороха (*Pisum sativum* L.) дикого типа и мутантов, блокированных на различных стадиях развития клубенька. ЭПР развивался от сети отдельных канальцев в меристематических клетках, к развитой сети цистерн вокруг ядра и плазмалеммы и сети гранулярных и гладких канальцев, сопровождающих инфекционные структуры в колонизированных и инфицированных клетках и симбиосомы в инфицированных клетках. Была выявлена корреляция между уровнем развития сети ЭПР и степенью дифференцировки бактериоидов.

✿ **Ключевые слова:** бобово-ризобияльный симбиоз; симбиотический клубенек; неэффективные мутанты; клеточные органеллы; *Pisum sativum* L.

ORGANIZATION OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM IN CELLS OF EFFECTIVE AND INEFFECTIVE PEA NODULES (*PISUM SATIVUM* L.)

© A.V. Tsyganova¹, V.E. Tsyganov^{1,2}

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia;

²Saint Petersburg Scientific Center RAS, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Tsyganova AV, Tsyganov VE.

Organization of the endoplasmic reticulum in cells of effective and ineffective pea nodules (*Pisum sativum* L.).

Ecological genetics. 2019;17(4):5-14. <https://doi.org/10.17816/ecogen1745-14>.

Received: 04.05.2019

Revised: 14.09.2019

Accepted: 17.12.2019

✿ **Background.** The endoplasmic reticulum (ER) is the largest membrane-bound organelle, which plays an important role in the functioning of a plant cell and participates in its differentiation. **Materials and methods.** Using the methods of transmission electron microscopy, the morphological features and dynamics of structural changes in the ER in symbiotic nodules of pea (*Pisum sativum* L.) wild-type and mutants blocked at different stages of nodule development were studied. **Results.** ER developed from a network of individual tubules in meristematic cells, to a developed network of cisterns around the nucleus and plasmalemma, and a network of granular and smooth tubules accompanying infection structures in colonized and infected cells and symbiosomes in infected cells. **Conclusions.** A correlation was found between the level of development of the ER network and the degree of bacteroid differentiation.

✿ **Keywords:** legume-rhizobial symbiosis; symbiotic nodule; ineffective mutants; cell organelles; *Pisum sativum* L.

ВВЕДЕНИЕ

Все клетки, в том числе и растительные, содержат основные клеточные органеллы, такие как ядра, пластиды, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), аппарат Гольджи и другие компартменты [1, 2]. ЭПР представляет собой взаимосвязанную сеть цистерн и канальцев, которые располагаются по всей цитоплазме.

Это самая большая, окруженная мембраной органелла в эукариотических клетках, которая играет важную роль в синтезе, модификации и перемещении как растворимых, так и мембранных белков, в биосинтезе и распределении фосфолипидов и стероидов, а также в детоксикации различных токсинов [3–5]. Различные функции, в которые вовлечен ЭПР, определяют разнообразие его

морфологии в различных типах клеток. В развивающихся клетках растений, таких как клетки корневого чехлика и корневых волосков, ЭПР представлен в основном цистернами, тогда как в зрелых клетках растений чаще всего встречаются каналцы ЭПР. Кроме того, ЭПР претерпевает переходы от цистерн к каналцам и наоборот в ходе развития клетки, а также в ответ на биотические и абиотические воздействия, что делает его крайне динамической структурой [5].

ЭПР принимает участие в развитии симбиотического клубенька бобовых растений как на ранних, так и на поздних стадиях [6, 7]. Так, показано, что при взаимодействии бактерий *Mesorhizobium loti* с корневыми волосками *Lotus japonicus* формирование микроколонии ризобий и индукция инфекционной нити ассоциированы с конденсированной формой ЭПР, при которой каналцы формируют плотную сеть [6]. ЭПР связывает кончик инфекционной нити с ядром в клетке корневого волоска, принимая участие наряду с микротрубочками [8] в формировании цитоплазматических мостиков [6]. После достижения инфекционной нитью основания клетки корневого волоска, конденсированный ЭПР изменяет свою конфигурацию на открытую, представленную небольшими цистернами [6]. Для клубеньков *Pisum sativum* было показано, что сеть ЭПР активно развивается в ходе дифференцировки инфицированных клеток, однако в зоне азотфиксации количество профилей гранулярного ЭПР (ГрЭПР) снижается [7]. При исследовании организации ЭПР при формировании неэффективных клубеньков мутантными штаммами ризобий были получены противоречивые результаты. Так, два штамма *Rhizobium meliloti* R21 *vio-r* и R21 *tum-r* формировали на корнях *Medicago sativa* неэффективные клубеньки, в которых наблюдалось интенсивное развитие сети ГрЭПР [9]. Мутанты *R. meliloti* по генам *nifA*, *nifD*, *nifH*, *nifK* и *fixA* также образовывали клубеньки, в инфицированных клетках которых присутствовали многочисленные профили ГрЭПР [10, 11]. В клубеньках мутанта *R. meliloti* по гену, кодирующему сукцинат дегидрогеназу, происходило расширение са-

мих профилей ГрЭПР [12]. В то же время штамм 1019 *R. leguminosarum* образовывал неэффективные клубеньки на сорте гороха Little Marvel, в которых профили ГрЭПР и полирибосомы встречались редко [13].

Цель данной работы заключалась в изучении формирования ЭПР в развитии симбиотического клубенька гороха при эффективном и неэффективном симбиозе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Растительный материал и штамм бактерий

Использованные в исследовании генотипы гороха (*P. sativum* L.) представлены в таблице. Для инокуляции был использован штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 [14].

Условия выращивания и сбор материала для анализа

Методика стерилизации и инокуляции семян была описана ранее [23]. Растения выращивали в пластиковых горшках, содержащих 200 г вермикулита и 100 мл безазотного питательного раствора [24]. Растения выращивали в климатических камерах (Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Japan) при контролируемых условиях: день/ночь, 16/8 ч; температура, 21 °С; относительная влажность 75 %; освещенность ~280 мЕ/м² · с.

Пробоподготовка материала

После сбора клубеньки были перенесены непосредственно в 2,5 % водный раствор глутаральдегида на 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,2). После фиксации в течение 16 ч при температуре 4 °С клубеньки были проведены по серии спиртов возрастающей концентрации (по 20 мин в 30, 50, 70, 90 и 100 % этаноле при комнатной температуре), затем они были помещены на 10 мин в смесь из 100 % этанола и ацетона в соотношении 1 : 1, после этого их выдерживали дважды по 20 мин в чистом ацетоне. Далее материал пропитывали по 1 ч в трех сменах смеси эпоксидной смолы EMbed-812 (Honeywell Fluka, Thermo Fisher Scientific, Лонгборроу, Великобритания)

Таблица

Исходные и мутантные линии гороха (*Pisum sativum* L.), использованные в эксперименте

Генотип	Фенотип	Ссылка
SGE	Дикий тип	[15, 16]
SGEFix ⁻ -1 (<i>sym40</i>)*	Гипертрофированные инфекционные капли и инфекционные нити, аномальные бактериоиды	[15, 17, 18]
SGEFix ⁻ -2(<i>sym33-3</i>)**	Аномальный рост инфекционных нитей внутри клубенька, отсутствие выхода бактерий***	[15, 17, 18]
SGEFix ⁻ -3 (<i>sym26</i>)	Раннее старение	[19]
Sprint-2	Дикий тип	[20]
Sprint-2Fix ⁻ (<i>sym31</i>)	Недифференцированные бактериоиды	[20]

Примечание. *Ген *Sym40* является ортологом гена *EFD* *M. truncatula* [21]. **Ген *Sym33* является ортологом гена *IPD3* *M. truncatula* [22]. ***У мутантной линии SGEFix⁻-2 (*sym33-3*) «leaky» фенотип, поэтому в некоторых клетках или некоторых клубеньках происходит выход бактерий [17, 18].

и ацетона (в соотношении 1 : 1, 2 : 1 и 3 : 1 соответственно), затем в свежеприготовленной смеси чистой смолы в течение ночи при комнатной температуре. Полимеризацию проводили в термостате IN55 (Mettmert GmbH, Швабах, Германия) при 60 °С в течение 48 ч.

Трансмиссионная электронная микроскопия

Для просвечивающей электронной микроскопии ультратонкие срезы (90–100 нм), полученные на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Вена, Австрия), были собраны на медно-палладиевые сеточки, покрытые 4 % раствором пироксиллина и углеродом. Срезы были контрастированы 2 % водным раствором уранилацетата в течение 1 ч и цитратом свинца по Рейнольдсу в течение

1 мин. Ткани клубеньков были исследованы и сфотографированы на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL Corporation, Токио, Япония) с цифровой камерой Olympus-SIS Veleta (Olympus Corporation, Токио, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организация ЭПР в симбиотических клубеньках гороха дикого типа

В клубеньках линий дикого типа SGE и Sprint-2 наблюдалась сходная организация ЭПР. В цитоплазме меристематических клеток располагалось большое количество свободных рибосом и редкие профили ГрЭПР (рис. 1, *a*). В колонизированных меристематических

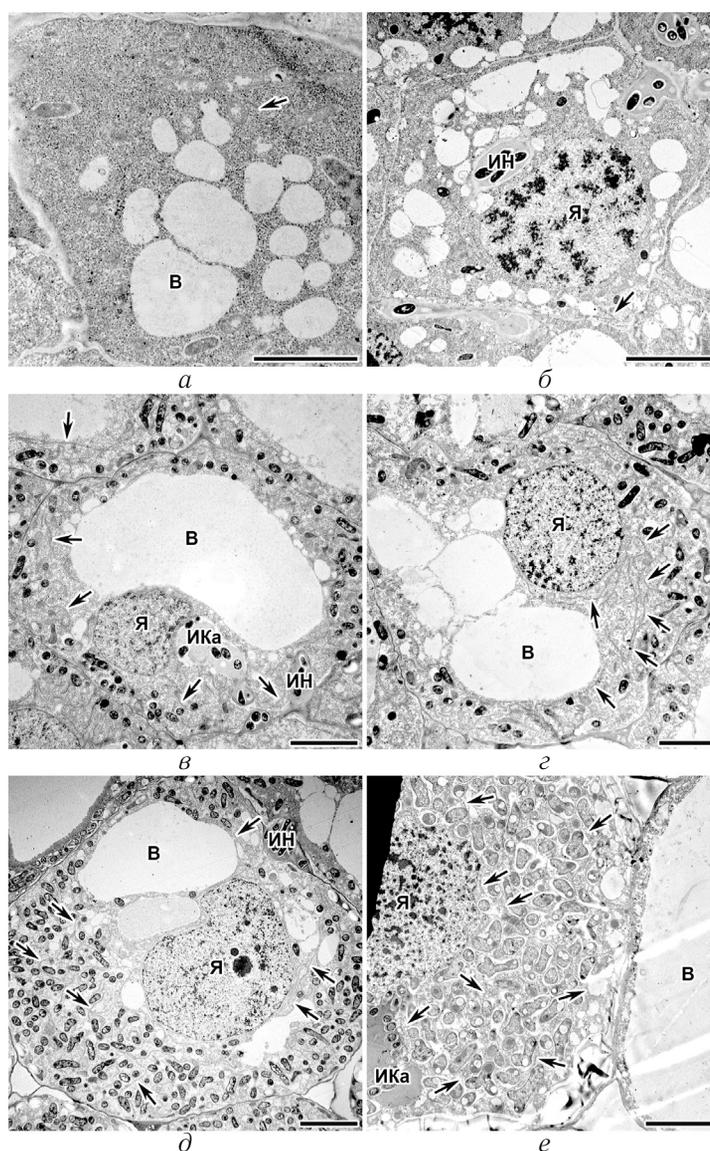


Рис. 1. Эндоплазматический ретикулум в симбиотических клубеньках гороха дикого типа. *a* — клетка меристемы; *b* — клетка меристемы с профилями инфекционных нитей; *в* — клетка из ранней зоны инфекции; *г* — инфицированная клетка из ранней зоны азотфиксации; *е* — зрелая инфицированная клетка из зоны азотфиксации. *a*, *б*, *д*, *е* — Sprint2; *в*, *г* — SGE. Я — ядро; В — вакуоль; ИН — инфекционная нить; ИКа — инфекционная капля; стрелки указывают на профили гранулярного ЭПР. Масштабная линейка: 5 мкм

клетках с инфекционными нитями количество профилей ГрЭПР также было невелико (рис. 1, б). В зоне инфекции в молодых инфицированных клетках с редкими ювенильными бактериоидами, расположенными на периферии клетки, по-прежнему присутствовали многочисленные свободные рибосомы, а профили ГрЭПР становились более протяженными (рис. 1, в). По мере дифференцировки инфицированных клеток в зоне инфекции увеличивалось количество полирибосом, а количество профилей ГрЭПР возрастало (рис. 1, г). В центре

клетки вокруг ядра они были представлены длинными тяжами канальцев ГрЭПР (рис. 1, г). В зрелых инфицированных клетках в зоне инфекции ГрЭПР наблюдался между многочисленными бактериоидами, а также рядом с ядром, где он формировал параллельные тяжи канальцев (рис. 1, д). В инфицированных клетках в зоне азотфиксации элементы сети ГрЭПР также присутствовали среди многочисленных бактериоидов (рис. 1, е).

Параллельные тяжи канальцев ГрЭПР располагались вдоль ядра (рис. 2, а) и на периферии клетки

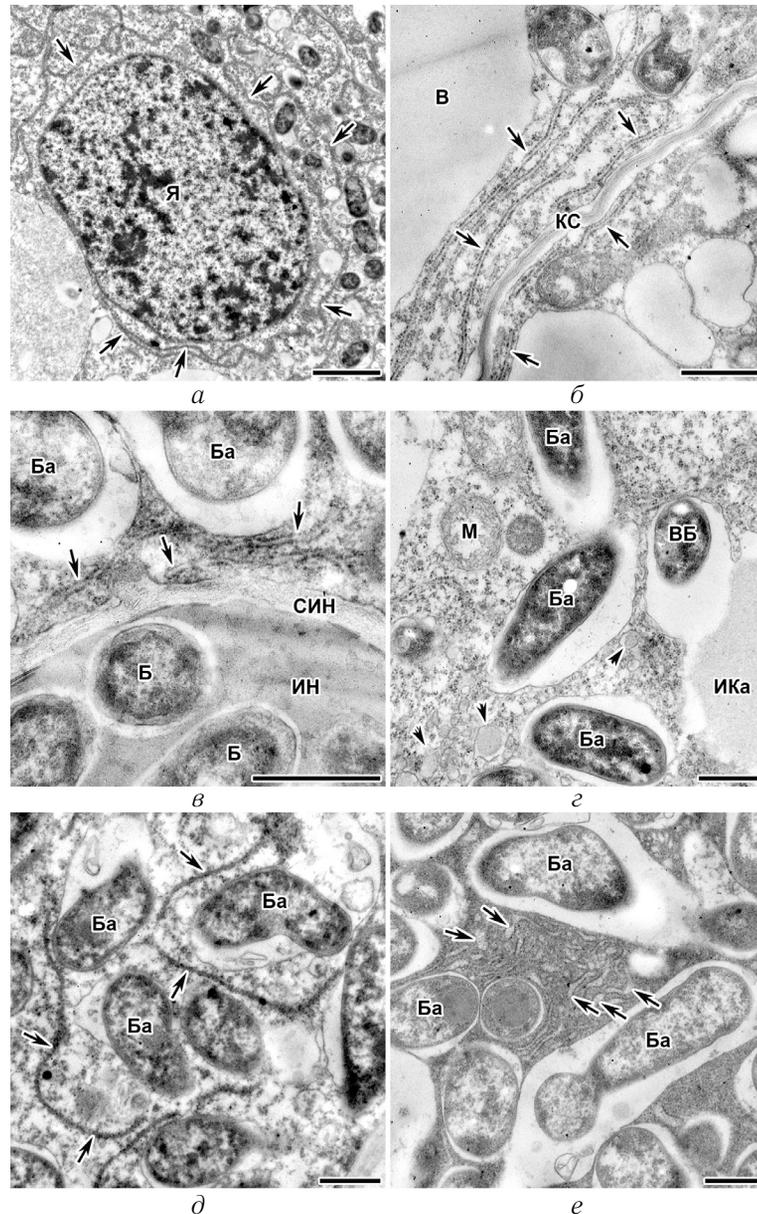


Рис. 2. Распределение эндоплазматического ретикулума в симбиотических клубеньках гороха дикого типа. а — эндоплазматический ретикулум вокруг ядра; б — вдоль плазматической мембраны; в — вдоль инфекционных нитей; г — сеть агранулярного эндоплазматического ретикулума с материалом матрикса инфекционных капелек; д — вокруг единичных симбиосом или группы симбиосом; е — расширение профилей эндоплазматического ретикулума в стареющих клетках. Я — ядро; М — митохондрия; В — вакуоль; КС — клеточная стенка; ИН — инфекционная нить; СИН — стенка инфекционной нити; ИКа — инфекционная капля; Б — бактерия; ВБ — высвобождающаяся бактерия; Ба — бактериоид; стрелки указывают на профили гранулярного ЭПР, наконечники стрелок — на профили агранулярного ЭПР. Масштабная линейка: а — 2 мкм, б–е — 500 нм

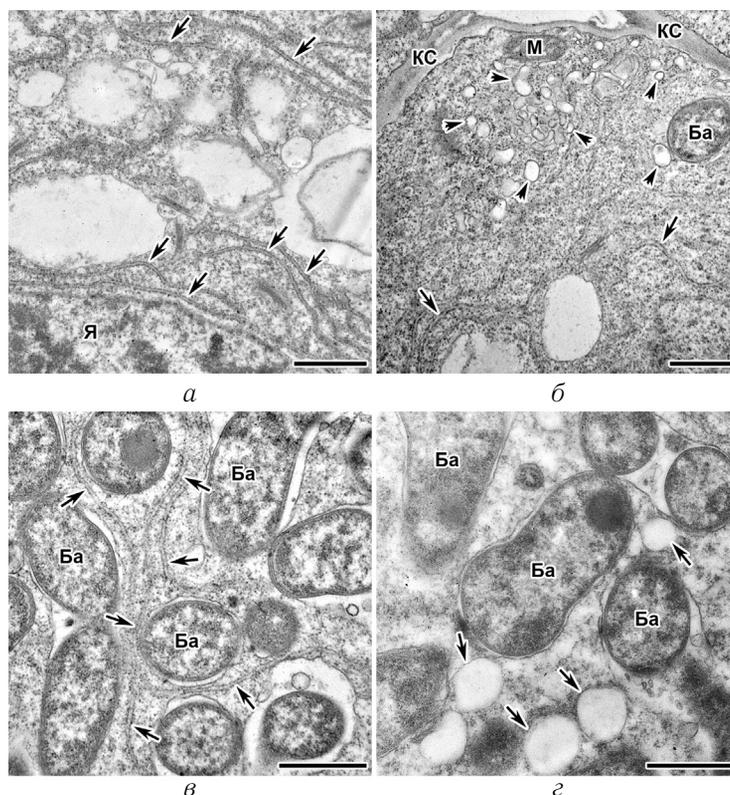


Рис. 3. Эндоплазматический ретикулум в симбиотических клубеньках гороха мутантной линии SGEFix⁻³ (*sym26*). *a* — параллельные тяжи вокруг ядра; *б* — сеть агранулярного эндоплазматического ретикулума; *в* — вокруг единичных симбиосом или группы симбиосом; *г* — расширение профилей и частичная утрата рибосом на профилях гранулярного ЭПР в некоторых клетках. Я — ядро; М — митохондрия; КС — клеточная стенка; Ба — бактериод; стрелки указывают на профили гранулярного ЭПР, наконечники стрелок — на профили агранулярного ЭПР. Масштабная линейка: 500 нм

вдоль плазматической мембраны (рис. 2, б). ЭПР был тесно связан с инфекционными структурами. Так, каналцы ГрЭПР контактировали со стенкой инфекционной нити (рис. 2, в), а везикулы агранулярного ЭПР (АгрЭПР) находились вблизи инфекционных капель и содержали материал, по электронной плотности сходный с матриксом инфекционных капель (рис. 2, г). Отдельные профили ГрЭПР наблюдались вокруг одиночных симбиосом или групп симбиосом, образуя сеть каналцев (рис. 2, д). При старении инфицированной клетки в клубеньках дикого типа было заметно расширение каналцев ГрЭПР (рис. 2, е).

Организация ЭПР в симбиотических клубеньках гороха мутантных линий

У мутантной линии SGEFix⁻³ (*sym26*) характер расположения профилей ЭПР в основном совпадал с таковым в симбиотических клубеньках гороха дикого типа (рис. 3). В инфицированных клетках в поздней зоне инфекции и в зоне, соответствующей ранней зоне азотфиксации в клубеньках дикого типа, параллельные протяженные каналцы ГрЭПР распо-

лагались вдоль ядра (рис. 3, а), был хорошо развит АгрЭПР (рис. 3, б). Профили ГрЭПР наблюдались в тесной ассоциации как с одиночными симбиосомами, содержащими дифференцированные бактериоды, так и с группами симбиосом (рис. 3, в). Нередко встречались инфицированные клетки с признаками деградации симбиотических структур и с расширенными цистернами ГрЭПР, которые теряли рибосомы на мембранах (рис. 3, г).

У мутантной линии SGEFix⁻¹ (*sym40*) в колонизированных клетках, содержащих гипертрофированные инфекционные капли и инфекционные нити, в тонком слое цитоплазмы наблюдались отдельные тяжи ГрЭПР (рис. 4, а). В инфицированных клетках из поздней зоны инфекции и из зоны, соответствующей зоне азотфиксации в клубеньках дикого типа, каналцы ГрЭПР сопровождали симбиосомы, в каждой из которых содержалось несколько недифференцированных бактериодов (рис. 4, б). Встречались инфицированные клетки, где цистерны ГрЭПР были расширены и фрагментированы, у них наблюдалась частичная утрата рибосом на мембранах (рис. 4, в).

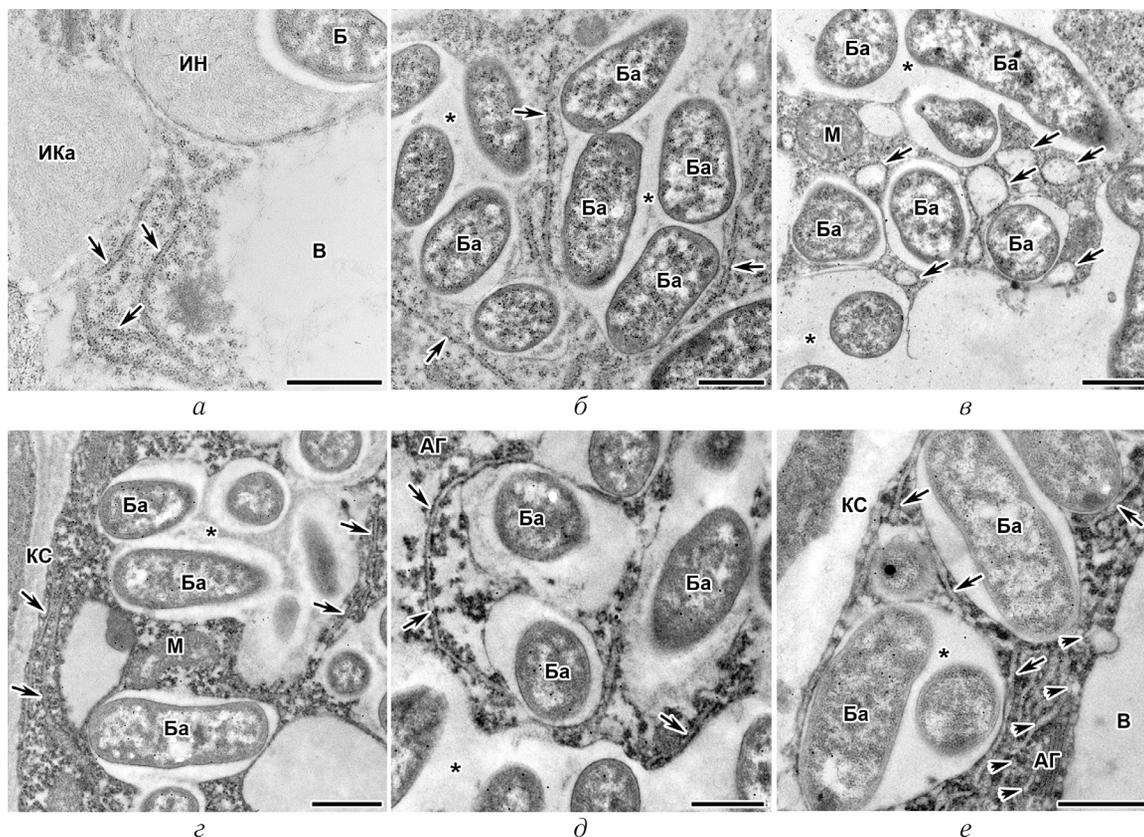


Рис. 4. Эндоплазматический ретикулум в симбиотических клубеньках гороха мутантных линий SGEFix⁻¹ (*sym40*) (а–в) и SGEFix⁻² (*sym33-3*) (д–е). а — вдоль вакуоли и инфекционных нитей и капель; б — вокруг симбиосом; в — расширение и фрагментация с частичной утратой рибосом профилей гранулярного ЭПР; г — вдоль плазматической мембраны; д — вокруг симбиосом; е — сеть агранулярного ЭПР. М — митохондрия; АГ — аппарат Гольджи; В — вакуоль; КС — клеточная стенка; ИН — инфекционная нить; ИКа — инфекционная капля; Б — бактерия; Ба — бактериод; * — симбиосома, содержащая несколько бактериодов, окруженных одной симбиосомной мембраной; стрелки указывают на профили гранулярного ЭПР, наконечники стрелок — на профили агранулярного ЭПР. Масштабная линейка: 500 нм

У мутантной линии SGEFix⁻² (*sym33-3*) наблюдались клетки как без выхода бактерий в цитоплазму, так и с выходом. В инфицированных клетках из зоны, соответствующей зоне азотфиксации в клубеньках гороха дикого типа, каналцы ГрЭПР располагались вдоль плазматической мембраны (рис. 4, г) и окружали симбиосомы, содержащие несколько недифференцированных бактериодов, или группы симбиосом (рис. 4, д). АгрЭПР также был развит в инфицированных клетках мутантной линии SGEFix⁻² (*sym33-3*) (рис. 4, е). В клубеньках, в которых выход бактерий не обнаруживался, цитоплазма располагалась тонким слоем вдоль клеточных стенок, ядер и инфекционных нитей, и немногочисленные профили ГрЭПР наблюдались в этом слое (рис. 5, а). Единичные каналцы ГрЭПР сопровождали инфекционные нити (рис. 5, а) и инфекционные капли, не содержащие бактерий (рис. 5, б).

У мутантной линии Sprint-2Fix⁻ (*sym31*), характеризующейся недифференцированными бактериодами, наблюдался определенный градиент развития: от ин-

фицированных клеток с симбиосомами с единичными бактериодами в поздней зоне инфекции к инфицированным клеткам с симбиосомами, содержащими несколько бактериодов в зоне, соответствующей зоне азотфиксации в клубеньках дикого типа (рис. 5, в, г). И в тех и в других клетках профили ЭПР были немногочисленны и представлены единичными каналцами вдоль плазмалеммы (рис. 5, в) и среди симбиосом (рис. 5, г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С помощью методов просвечивающей электронной микроскопии были исследованы морфологические особенности и динамика структурных изменений ЭПР в симбиотических клубеньках гороха исходных и мутантных линий, заблокированных на различных стадиях инфекционного процесса.

Ранее у гороха было описано распределение ГрЭПР в различных типах клеток и в различных гистологических зонах симбиотического клубенька дикого типа [7]. Так, большое количество свободных рибосом и редкие

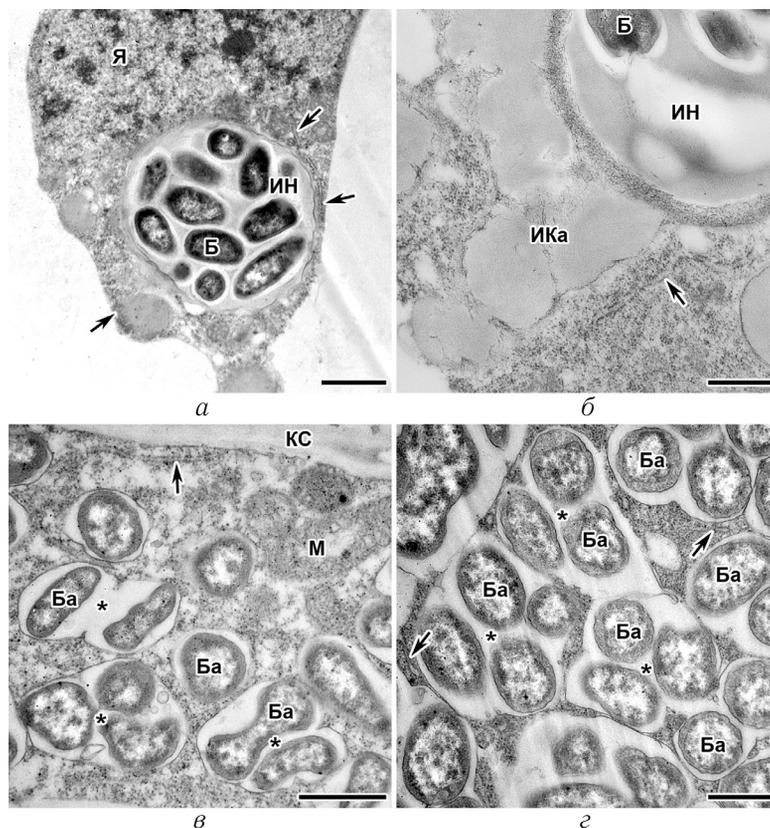


Рис. 5. Эндоплазматический ретикулум в симбиотических клубеньках гороха мутантных линий *SGEFix⁻² (sym33-3)* (а, б) и *Sprint-2Fix⁻ (sym31)* (в, з). а — в узком слое цитоплазмы вокруг ядра и инфекционных нитей; б — вдоль инфекционных капель, не содержащих бактерий; в — вдоль плазматической мембраны; з — вокруг симбиосом. Я — ядро; М — митохондрия; КС — клеточная стенка; ИН — инфекционная нить; ИКа — инфекционная капля; Б — бактерия; Ба — бактериод; * — симбиосома, содержащая несколько бактериодов, окруженных одной симбиосомной мембраной; стрелки указывают на профили гранулярного ЭПР. Масштабная линейка: а, в — 1 мкм, б, з — 500 нм

профили ГрЭПР наблюдались в меристематических клетках. В недавно инфицированных клетках, содержащих небольшое число бактериодов, количество профилей ГрЭПР начинало увеличиваться, в них присутствовали многочисленные полирибосомы. По мере дифференцировки инфицированных клеток и заполнения их бактериодами в зоне инфекции наблюдалось значительное увеличение профилей ГрЭПР, они располагались между бактериодами. В инфицированных клетках в зоне азотфиксации количество профилей ГрЭПР снова снижалось. В неинфицированных клетках количество профилей ГрЭПР было также невелико [7]. В данном исследовании в целом наблюдалась сходная динамика развития ЭПР от сети отдельных каналцев в меристематических, активно делящихся клетках, к развитой сети цистерн вокруг ядра и плазмалеммы и сети гранулярных и гладких каналцев, сопровождающих развивающиеся и зрелые симбиосомы и инфекционные структуры (см. рис. 1). Однако в данном исследовании мы не наблюдали значительного снижения интенсивности сети ГрЭПР в зоне азотфиксации, описанное ранее, что

может быть связано как с различиями в использованных генотипах растений гороха и штаммов ризобий, так и с затрудненной идентификацией профилей ЭПР в инфицированных клетках, заполненных многочисленными бактериодами (см. рис. 1, е).

Ранее было описано, что усиление развития ЭПР, наблюдаемое после выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки в клубеньках гороха и сои, сопровождается формированием везикул ЭПР, сливающихся с симбиосомными мембранами, и было предположено, что этот процесс способствует дифференцировке бактериодов [25]. Позднее показано, что, действительно, ЭПР играет важную роль в синтезе NCR-пептидов, обеспечивающих необратимую дифференцировку бактериодов [26].

Следует отметить, что в корневых волосках паттерн сети ЭПР в инфицированных клетках повторяет паттерн микротубулярного цитоскелета [6]. Вероятно, сходная корреляция наблюдается и в инфицированных клетках клубеньков. Известно, что симбиосомы в зрелых инфицированных клетках симбиотических клубень-

ков гороха располагаются неупорядоченным образом, и в этих клетках пучки микротрубочек поддерживают организацию не отдельных симбиосом, а скорее групп симбиосом [27]. В данном исследовании профили ГрЭПР также были выявлены между группами симбиосом (см. рис. 1, д).

При анализе мутантов гороха, формирующих неэффективные клубеньки, были выявлены различия в степени развития ЭПР. Так, для мутантной линии SGEFix⁻³ (*sym26*), характеризующейся формированием морфологически дифференцированных бактериоидов, подвергающихся преждевременной дегградации [19], степень развития ЭПР в инфицированных клетках клубеньков практически не отличалась от таковой у дикого типа (см. рис. 3). В клубеньках мутантной линии SGEFix⁻¹ (*sym40*), формирующей наряду с гипертрофированными инфекционными каплями аномальные бактериоиды, а также в клубеньках мутантной линии SGEFix⁻² (*sym33-3*), в которых произошел выход бактерий, ЭПР был представлен протяженными канальцами (см. рис. 4), в целом он был менее развит, а степень его развития соответствовала степени развития ЭПР в инфицированных клетках клубеньков линии дикого типа из зоны инфекции (см. рис. 1, з).

В клубеньках мутантной линии SGEFix⁻² (*sym33-3*), характеризующихся «запертыми» инфекционными нитями и отсутствием выхода бактерий, и мутантной линии Sprint-2Fix⁻ (*sym31*), отличающейся недифференцированными бактериоидами, наблюдалась наименьшая степень развития ЭПР (см. рис. 5). Он был представлен отдельными разрозненными канальцами, которые наблюдаются в недавно инфицированных клетках клубеньков дикого типа до начала их дифференцировки (см. рис. 1, б, в).

На основе анализа мутантных генотипов, можно видеть корреляцию между степенью дифференцировки симбиосом и уровнем развития ЭПР. Ранее в неэффективных клубеньках гороха, образуемых штаммом 1019 *R. leguminosarum*, наблюдалось резкое снижение уровня развития ЭПР, при этом бактериоиды характеризовались сниженной степенью дифференцировки по сравнению с клубеньками, формируемыми эффективным штаммом [13]. В то же время для ряда штаммов *R. meliloti*, формирующих неэффективные клубеньки на *M. sativa*, было показано усиление развития ЭПР по сравнению с эффективными штаммами [9–12]. Так, для клубеньков, формируемых штаммами *R. meliloti* R21 *vio-r* и R21 *tum-r*, было характерно интенсивное развитие сети ГрЭПР, включающей в том числе стопки параллельно ориентированных канальцев, ассоциированных с деградирующими бактериоидами [9]. Ранее было предположено, что в неэффективных клубеньках *M. sativa* ЭПР активно развивается в ответ на азотное голодание, приводя

к усиленному синтезу литических ферментов, разрушающих клетки ризобий для использования растением высвобождающегося при этом азота [9]. Другое объяснение активного развития ЭПР предполагает отсутствие в неэффективных клубеньках репрессии синтеза нодулинов — белков, специфически синтезирующихся в клубеньках [10]. В то же время у гороха не наблюдалось усиленного развития ЭПР при формировании неэффективных клубеньков как мутантным штаммом ризобий [13], так и мутантами растений. В то же время в клубеньках мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*) наблюдалось расширение профилей ГрЭПР (см. рис. 4, в), а мутанта SGEFix⁻³ (*sym26*), характеризующегося ранним старением клубеньков [19], расширение ГрЭПР с утратой рибосом наблюдалось в клетках с признаками дегградации симбиотических структур (см. рис. 3, з). Подобное расширение было характерно для мутанта *R. meliloti* по гену, кодирующему сукцинат дегидрогеназу [12].

Выявленные различия в организации ЭПР в клубеньках *P. sativum* и *M. sativum* могут указывать на определяющее значение вида растения в развитии ЭПР. Действительно, хорошо развитая сеть ЭПР была описана для различных видов *Astragalus* и *Oxytropis*, как приспособление к произрастанию в арктических условиях [28]. Недавно интенсивное развитие ЭПР было описано для клеток клубеньков реликтового бобового растения *O. popoviana*, сформированных штаммом *M. japonicum* Oro-235 [29].

Таким образом, показано, что в клубеньках *P. sativum* в ходе дифференцировки инфицированной клетки наблюдается постепенное формирование тонкой структуры ЭПР, интенсивность развития которого коррелирует со степенью дифференцировки бактериоидов.

Благодарность

Данная работа была финансирована грантом Российского научного фонда (16-16-10035). Работа выполнена с использованием оборудования Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» ФГБОУ ВО СПбГУ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wada M, Suetsugu N. Plant organelle positioning. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7(6):626-631. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.09.005>.
2. Agrawal GK, Bourguignon J, Rolland N, et al. Plant organelle proteomics: collaborating for optimal cell function. *Mass Spectrom Rev.* 2011;30(5):772-853. <https://doi.org/10.1002/mas.20301>.
3. Shibata Y, Shemesh T, Prinz WA, et al. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell.* 2010;143(5):774-788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.007>.

4. Chen J, Doyle C, Qi X, Zheng H. The endoplasmic reticulum: a social network in plant cells. *J Integr Plant Biol.* 2012;54(11):840-850. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01176.x>.
5. Griffing LR, Lin C, Perico C, et al. Plant ER geometry and dynamics: biophysical and cytoskeletal control during growth and biotic response. *Protoplasma.* 2017;254(1):43-56. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0945-3>.
6. Perrine-Walker FM, Kouchi H, Ridge RW. Endoplasmic reticulum-targeted GFP reveals ER remodeling in *Mesorhizobium*-treated *Lotus japonicus* root hairs during root hair curling and infection thread formation. *Protoplasma.* 2014;251(4):817-826. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0584-x>.
7. Newcomb W. A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules. *Can J Bot.* 1976;54(18):2163-2186. <https://doi.org/10.1139/b76-233>.
8. Fournier J, Teillet A, Chabaud M, et al. Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol.* 2015;167(4):1233-1242. <https://doi.org/10.1104/pp.114.253302>.
9. MacKenzie CR, Jordan DC. Ultrastructure of root nodules formed by ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Can J Microbiol.* 1974;20(5):755-758. <https://doi.org/10.1139/m74-115>.
10. Hirsch AM, Bang M, Ausubel FM. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif::Tn5* mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 1983;155(1):367-380.
11. Hirsch AM, Smith CA. Effects of *Rhizobium meliloti nif* and *fix* mutants on alfalfa root nodule development. *J Bacteriol.* 1987;169(3):1137-1146. <https://doi.org/10.1128/jb.169.3.1137-1146.1987>.
12. Gardiol AE, Truchet GL, Dazzo FB. Requirement of succinate dehydrogenase activity for symbiotic bacteroid differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53(8):1947-1950.
13. Newcomb W, Syono K, Torrey JG. Development of an ineffective pea root nodule: morphogenesis, fine structure, and cytokinin biosynthesis. *Can J Bot.* 1977;55(14):1891-1907. <https://doi.org/10.1139/b77-217>.
14. Wang TL, Wood EA, Brewin NJ. Growth regulators, *Rhizobium* and nodulation in peas. *Planta.* 1982;155(4):350-355. <https://doi.org/10.1007/bf00429464>.
15. Tsyganov VE, Borisov AY, Rozov SM, Tikhonovich IA. New symbiotic mutants of pea obtained after mutagenesis of laboratory line SGE. *Pisum Genetics.* 1994;26:36-37.
16. Kosterin OE, Rozov SM. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I. *Pisum Genetics.* 1993;25:27-31.
17. Tsyganov VE, Morzhina EV, Stefanov SY, et al. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function. *Mol Gen Genet.* 1998;259(5):491-503. <https://doi.org/10.1007/s004380050840>.
18. Voroshilova VA, Boesten B, Tsyganov VE, et al. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001;14(4):471-476. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.4.471>.
19. 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>.
20. Borisov AY, Rozov SM, Tsyganov VE, et al. Identification of symbiotic genes in pea (*Pisum sativum* L.) by means of experimental mutagenesis. *Soviet Genetics.* 1994;30(1):1484-1494.
21. Неманкин Т.А. Анализ генетической системы гороха (*Pisum sativum* L.), контролирующей развитие арбускулярной микоризы и азотфиксирующего симбиоза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2011. — 19 с. [Nemankin TA. Analiz geneticheskoi sistemy gorokha (*Pisum sativum* L.), kontrolirujushei razvitie arbuskulyarnoi mikorizy i azotfiksirovushchego simbioza. [dissertation abstract] Saint Petersburg; 2011. 19 p. (In Russ.). Доступно по: <http://earthpapers.net/analiz-geneticheskoy-sistemy-gorokha-pisum-sativum-1-kontroliruyuschey-razvitie-arbuskulyarnoy-mikorizy-i-azotfiksirovuyusch>. Ссылка активна на 14.08.2019.
22. Ovchinnikova E, Journet EP, Chabaud M, et al. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* spp. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24(11):1333-1344. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-11-0013>.
23. Ivanova KA, Tsyganova AV, Brewin NJ, et al. 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):505-517. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0780-y>.
24. Fahraeus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol.* 1957;16(2):374-381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>.
25. Kijne JW, Pluvque K. Ultrastructural study of the endomembrane system in infected cells of pea and soybean root nodules. *Physiol Plant Pathol.* 1979;14(3):339-345. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(79\)90053-5](https://doi.org/10.1016/0048-4059(79)90053-5).
26. Wang D, Griffiths J, Starker C, et al. A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing

- symbiosis. *Science*. 2010;327(5969):1126-1129. <https://doi.org/10.1126/science.1184096>.
27. Kitaeva AB, Demchenko KN, Tikhonovich IA, et al. 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.* 2016;210(1):168-183. <https://doi.org/10.1111/nph.13792>.
28. Newcomb W, Wood SM. Fine structure of nitrogen-fixing leguminous root nodules from the Canadian Arctic. *Nord J Bot.* 1986;6(5):609-626. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1986.tb00461.x>.
29. Safronova V, Belimov A, Sazanova A, et al. Two broad host range rhizobial strains isolated from relict legumes have various complementary effects on symbiotic parameters of co-inoculated plants. *Front Microbiol.* 2019;10:514. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00514>.

✿ 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. SPIN: 9149-5662. E-mail: isaakij@mail.ru.

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

✿ Authors and affiliations

Anna V. Tsyganova — Candidate of Biological Sciences, Leading Scientist, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. SPIN: 9149-5662. E-mail: isaakij@mail.ru.

Viktor E. Tsyganov — Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia; Senior Scientist of Saint Petersburg Scientific Center RAS, St. Petersburg, Russia. SPIN: 6532-1332. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.