



© В. Е. Цыганов¹,
Е. В. Селивёрстова^{1*},
В. А. Ворошилова¹,
А. В. Цыганова¹,
З. Б. Павлова¹, В. К. Лебский^{1**},
А. Ю. Борисов¹, Н. Дж. Бревин²,
И. А. Тихонович¹

¹ ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной
микробиологии Россельхозакадемии,
Санкт Петербург

² Центр Джона Иннеса, Норвич,
Великобритания

* Институт эволюционной
физиологии и биохимии
имени И. М. Сеченова, Россия,
** текущий адрес: Centro de
Investigaciones Biológicas del
Noroeste, México

✿ С использованием одиночных
мутантных линий: E135f (*sym13*),
SGEFix⁻-1 (*sym40*) и SGEFix⁻-2
(*sym33*), блокированных на различных
стадиях развития клубенька, были
созданы две двойные мутантные
линии, несущие пары симбиотических
генов *sym13*, *sym40* и *sym33*, *sym40*.
Выявлен эпистаз мутантной аллели
sym40 над мутантной аллелью *sym13*,
а также *sym33* над мутантной аллелью
sym40 в отношении гистологической
и ультраструктурной организации
клубеньков. Таким образом,
подтвержден ранее предположенный
порядок функционирования генов
во время инфекционного процесса
Sym33→*Sym40*→*Sym13*.

✿ **Ключевые слова:**

растительно-микробные взаимодействия;
развитие симбиотического клубенька;
взаимодействие генов; эпистаз;
инфекционная нить; инфекционная капля.

Поступила в редакцию 03.11.2009
Принята к публикации 17.03.2010

АНАЛИЗ ДВОЙНЫХ МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) *SYM13*, *SYM33* И *SYM40* ВО ВРЕМЯ РАЗВИТИЯ СИМБИОТИЧЕСКОГО КЛУБЕНЬКА

В течение последних двух десятилетий интенсивное изучение генетического контроля бобово-ризобияльного симбиоза со стороны растения привело к созданию больших коллекций симбиотических мутантов у различных видов бобовых культур (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1991; Bhatia et al., 2001). До настоящего времени, самые крупные коллекции симбиотических мутантов были созданы для гороха (Borisov et al., 2004). С использованием мутантов из этих коллекций была предположена последовательность функционирования как ранних (Walker et al., 2000; Guinel, Geil, 2002; Tsyganov et al., 2002), так и поздних (Borisov et al., 1997; Morzhina et al., 2000; Voroshilova et al., 2001) симбиотических генов гороха.

Последние достижения в молекулярной генетике модельных бобовых таких, как *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*, позволили идентифицировать многие гены, контролирующие ранние симбиотические стадии, и подтвердить схему последовательности их функционирования (Oldroyd, Downie, 2004; 2008). Между тем успехи в идентификации последовательности функционирования генов, контролирующих более поздние стадии клубенькообразования, очень ограничены. Анализ генетического эпистаза является мощным методом для определения порядка функционирования генов даже в том случае, когда продукты генов неизвестны (Avery, Wasserman, 1992).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Целью данной работы являлось создание двух двойных мутантных линий и их анализ для выявления типов взаимодействия и последовательности функционирования симбиотических генов гороха *Sym33*, *Sym40* и *Sym13*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Растительный материал

В данном исследовании были использованы две одиночных Fix⁻ мутантных линии с нечетко выраженными (leaky) фенотипами. SGEFix⁻-1 (*sym40*) формирует многочисленные маленькие белые клубеньки и изредка — розовые клубеньки, SGEFix⁻-2 (*sym33*) формирует мелкие и крупные белые клубеньки с темной ямкой на дистальном конце и изредка — розоватые клубеньки (Tsyganov et al., 1998). Данные мутантные линии, также как и соответствующая линия дикого типа SGE (Kosterin, Rozov, 1993), взяты из коллекции ГНУ ВНИИСХМ. Fix⁻ мутантная линия E135f (*sym13*), формирующая маленькие зеленоватые клубеньки, и соответствующий сорт дикого типа Sparkle были любезно предоставлены Т. А. Лярю (Институт исследований растений им. Бойса Томпсона Корнельского университета, США).

Штаммы бактерий

При проведении генетических экспериментов и экспериментов по ультраструктурному анализу растения были инокулированы коммерческим штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM 1026 (Safronova, Novikova, 1996) из коллекции ГНУ ВНИИСХМ. В исследованиях гистологической организации клубеньков был использован штамм VF39 *gusA* (*const.*). Данный штамм, любезно предоставленный У. Б. Прифер (Аахенский технический университет, Германия), характеризовался конститутивной экспрессией репортерного гена *gusA* (Voroshilova et al., 2001). Штамм 3841 (Wang et al., 1982) из коллекции Центра Джона Иннеса (Великобритания) был использован в иммуноцитохимических экспериментах.

Конструирование двойных мутантных линий

После скрещивания мутантных линий E135f (*sym13*) и SGEFix⁻-2 (*sym33*) с мутантной линией SGEFix⁻-1 (*sym40*), было получено поколение F₂ путем самоопыления растений F₁. Двойные рецессивные гомозиготные растения были отобраны после анализа поколений F₂ и F₃ на основе фенотипических различий в морфологии клубеньков одиночных мутантных линий. После отбора двойных гомозиготных растений, они были размножены. Генотипы отобранных двойных мутантов были подтверждены контрольными возвратными скрещиваниями растений поколения F₅ с родительскими одиночными мутантными линиями. Двойные мутантные линии были созданы после отбора в ряду 10 поколений. Данная селекция была необходима для отбора форм, проявляющих отсутствие расщепления по морфологическим признакам, т. к. в скрещиваниях были вовлечены мутанты, полученные на разном генетическом фоне (E135f (*sym13*) и SGEFix⁻-2 (*sym33*)).

Условия выращивания и сбор материала для анализа

Для генетических экспериментов и размножения растения выращивались в условиях, описанных ранее (Borisov et al., 1992). Для сравнительного анализа одиночных и двойных мутантных линий растения были выращены в климатических камерах HPS2000 («Heraeus Vötsch GmbH», Германия) в режиме день/ночь 16/8 ч, 21/19 °C, относительной влажности 75 %, освещенности 38 тыс. люкс. Безазотный питательный раствор и методика инокуляции семян были описаны ранее (Borisov et al., 1997).

Для электронной микроскопии растения были выращены в сосудах, содержащих 6 кг стерильного кварцевого песка (7 растений в сосуде), а для световой микроскопии растения были выращены индивидуально в двухсотмиллилитровых сосудах, заполненных 25 г стерильного вермикулита.

Для визуализации бактерий с использованием репортерного гена (во время инфекционного процесса и во время развития поздних стадий клубенька), клубеньки окрашивали по ранее описанной методике (Voroshilova et al.,

2001) на 28 день после инокуляции. При изучении стадий клубенькообразования срезы клубеньков толщиной 70 мкм получали посредством вибротома VT 1000 S («Leica Microsystems Wetzlar GmbH», Германия).

Анализ методами световой микроскопии

Все образцы были изучены с использованием микроскопа Opton Axiovert-35 («Opton Feinttechnik GmbH», Германия).

Электронно-микроскопический анализ

Методики, использованные для микроскопии, были описаны ранее (Tsyganov et al., 1998). Для иммунного мечения золотом клубеньки были зафиксированы в 2,5%-м водном растворе глутаральдегида и залиты в акриловую смолу London Resin White («Sigma-Aldrich», США) с использованием УФ-полимеризации при –20 °C (Цыганова и др., 2009).

Локализация с помощью иммунного мечения коллоидным золотом

Для иммунного мечения коллоидным золотом ультратонкие срезы (90–100 нм) инкубировали с первичными антителами MAC265 к арабиногалактанпротеину-экстензину матрикса инфекционных нитей (Цыганова и др., 2009). Ткани клубеньков были исследованы и сфотографированы в просвечивающем электронном микроскопе JEM-1200 EM («JEOL Corp.», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание двойных мутантных линий RBT1 и RBT3

Двойные гомозиготные растения, несущие пары генов: *sym13*, *sym40* и *sym33*, *sym40*, были отобраны при анализе поколений F₂ и F₃ от скрещиваний мутантной линии SGEFix⁻-1 (*sym40*) с мутантными линиями E135f (*sym13*) и SGEFix⁻-2 (*sym33*). Основными критериями отбора были фенотипические различия в морфологии клубеньков одиночных мутантов. В случае двойного мутанта, несущего аллели *sym13*, *sym40*, растения проявляли мутантный фенотип клубеньков, сходный с фенотипом клубеньков SGEFix⁻-1 (*sym40*). В случае двойного мутанта, несущего аллели *sym33*, *sym40*, клубеньки были сходны с клубеньками SGEFix⁻-2 (*sym33*). После размножения до поколения F₅ растения были повторно скрещены с каждым родительским мутантом. Анализ потомства от этих возвратных скрещиваний подтвердил, что отобранные комбинации были рецессивными дигомозиготами по генам *sym13*, *sym40* и *sym33*, *sym40*, соответственно. Двойные мутантные линии были названы RBT1 (*sym13*, *sym40*) и RBT3 (*sym33*, *sym40*).

Параметры клубенькообразования

Двойная мутантная линия RBT1 (*sym13*, *sym40*) формировала многочисленные мелкие белые клубеньки, которые были сходны с одним из типов клубеньков, наблю-

даемых у мутантной линии SGEFix⁻1 (*sym40*). В данных условиях появления второго типа клубеньков — розового цвета — не наблюдалось ни у SGEFix⁻1 (*sym40*), ни у RBT1 (*sym13*, *sym40*).

Двойная мутантная линия RBT3 (*sym33*, *sym40*) формировала белые клубеньки, подобные одному из типов клубеньков мутантной линии SGEFix⁻2 (*sym33*). В данных условиях появления второго типа клубеньков — розового цвета — не наблюдалось ни у SGEFix⁻2 (*sym40*), ни у RBT3 (*sym13*, *sym40*).

Гистологическая организация клубеньков

Структура клубенька двойной мутантной линии RBT1 (*sym13*, *sym40*) характеризовалась отсутствием ярко выраженной зональности (рис. 1, *з*), в то время как в клубеньках растений дикого типа наблюдались три зоны: меристема (зона I), зона инфекции (зона II) и зона азотфиксации (зона III) (рис. 1, *е*). По данному признаку двойная мутантная линия RBT1 (*sym13*, *sym40*) не отличалась от родительской мутантной линии SGEFix⁻1 (*sym40*), в клубеньках которого нет четко выделенных зон (рис. 1, *в*).

Клубеньки растений второй родительской мутантной линии E135f (*sym13*) характеризовались зональностью клубенька сходной с таковой у дикого типа, за исключением уменьшенного размера зон II и III и увеличенного размера зоны старения (зоны IV) (рис. 1, *д*).

Структура клубеньков у двойной мутантной линии RBT3 (*sym33*, *sym40*) также характеризовалась отсутствием типичной зональности клубенька (рис. 1, *б*). Область от верхушки клубенька к центру была занята сильно разветвленной инфекционной нитью, при этом не наблюдалось эндоцитоза бактерий в цитоплазму клеток (рис. 1, *б*). Такая структура характерна для родительской мутантной линии SGEFix⁻2 (*sym33*) (рис. 1, *а*), но не для другой родительской мутантной линии SGEFix⁻1 (*sym40*) (рис. 1, *в*).

Ультраструктурная организация клубеньков

Было показано, что у двойной мутантной линии RBT1 (*sym13*, *sym40*) инфекционные нити и инфекционные капли занимают большую часть инфицированных клеток (рис. 2, *з*). Эндоцитированные бактерии дифференцируются в бактериоиды различного размера и формы, иногда несколько бактериоидов окружены общей симбиотической мембраной (рис. 2, *з*). Сходный фенотип наблюдался у одиночной мутантной линии SGEFix⁻1 (*sym40*) (рис. 2, *в*), но он сильно отличался от фенотипов одиночной мутантной линии E135f (*sym13*) (рис. 2, *д*) и от обеих линий дикого типа SGE (рис. 2, *е*) и Sparkle (данные не представлены).

Клубеньки двойной мутантной линии RBT3 (*sym33*, *sym40*) не содержали клеток с высвобожденными бактериоидами: наблюдались только «запертые» инфекционные нити с толстыми клеточными стенками (рис. 2, *б*). Этот фенотип был идентичен фенотипу, описанному для одиночной мутантной линии SGEFix⁻2 (*sym33*) (рис. 2, *а*), но он сильно отли-

чался от фенотипов одиночной мутантной линии SGEFix⁻1 (*sym40*) (рис. 2, *в*) и линии дикого типа SGE (рис. 2, *е*).

Во время детального анализа ультраструктуры клубеньков у линий SGEFix⁻2 (*sym33*) и RBT3 (*sym33*, *sym40*) были выявлены структуры, неограниченные клеточными стенками и содержащие бактерии, и, предположительно, являющиеся инфекционными каплями (рис. 3, *в* и *з*). Этот признак не был описан в предыдущих исследованиях (Tsyganov et al., 1998; Voroshilova et al., 2001). Для доказательства того, что наблюдаемые объекты являются именно инфекционными каплями, был проведен иммуноцитологический анализ с использованием антител MAC265, которые идентифицируют гликопротеин матрикса, характерный для инфекционных нитей и капель: соответствующий антиген наблюдался у дикого типа SGE (рис. 3, *а*), одиночных мутантных линий SGEFix⁻1 (*sym40*) (рис. 3, *б*) и SGEFix⁻2 (*sym33*) (рис. 3, *д*), а также у двойной мутантной линии RBT3 (*sym33*, *sym40*) (рис. 3, *е*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании были изучены две новые двойные мутантные линии, названные RBT1 (*sym13*, *sym40*) и RBT3 (*sym33*, *sym40*). Соответствующие одиночные мутантные линии гороха E135f (*sym13*), SGEFix⁻

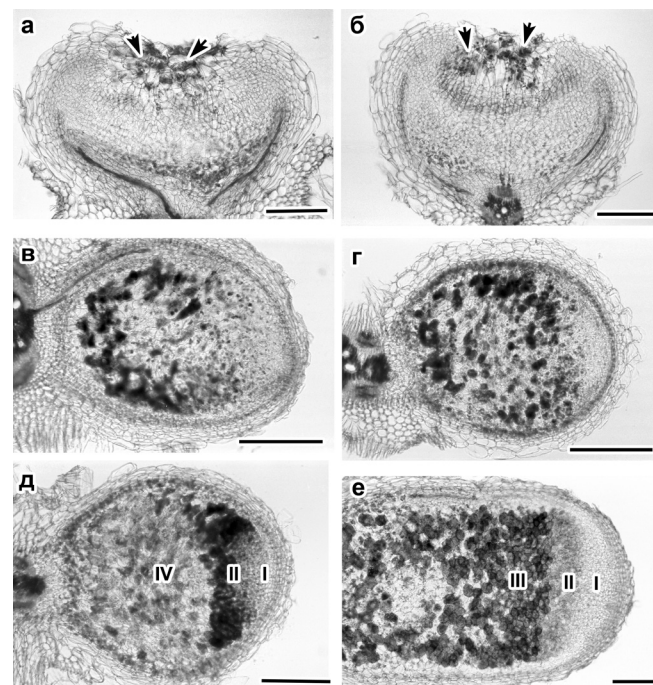


Рис. 1. Гистологическая структура клубеньков: *а* — SGEFix⁻2 (*sym33*); *б* — RBT3 (*sym33*, *sym40*); *в* — SGEFix⁻1 (*sym40*); *з* — RBT1 (*sym13*, *sym40*); *д* — E135F (*sym13*); *е* — SGE (дикий тип). I, II, III, IV: гистологические зоны клубенька (отмечены там, где идентифицируются); стрелки — инфекционные нити; масштабная линейка — 0,4 мм

-1 (*sym40*) и SGEFix⁻² (*sym33*) блокированы на различных стадиях развития клубенька и, следовательно, анализ двойных мутантных линий мог указать последовательность функционирования соответствующих генов во время инфекционного процесса.

Двойные мутанты активно используются в генетике развития арабидопсиса, например, при анализе морфогенеза корневого волоска (Parker et al., 2000), инициации цветения (Коопнеф et al., 1998a,b), тогда как в исследованиях бобово-ризобияльного симбиоза этот подход применяется редко. Ранее он был применен только для выявления порядка действия симбиотических генов в случае двойной мутантной линии RBT (*sym13*, *sym31*) (Borisov et al., 1997; Tsyganov et al., 2003).

Было показано, что двойная мутантная линия RBT1 (*sym13*, *sym40*) формирует клубеньки без выраженной зональности (рис. 1, *з*), в которых инфицированные клетки содержат гипертрофированные инфекционные нити и капли. Все эти фенотипические проявления наблюдались в

данном и предыдущих исследованиях и у одиночной мутантной линии SGEFix⁻¹ (*sym40*) (рис. 1, *в* и 2, *в*; Tsyganov et al., 1998), но не у E135f (*sym13*), другой одиночной мутантной линии, использованной для создания линии RBT1 (*sym13*, *sym40*) (данное исследование рис. 1, *д*; Borisov et al., 1997; Kneep et al., 1990). Таким образом, рецессивный эпистаз мутантной аллели *sym40* над мутантной аллелью *sym13* был показан в отношении гистологической и ультраструктурной организации клубенька.

Было показано, что двойная мутантная линия RBT3 (*sym33*, *sym40*) формирует клубеньки без инфицированных клеток (рис. 1, *б*). Наблюдались только сильно разветвленные (рис. 1, *б*) «запертые» инфекционные нити (рис. 2, *з*). Этот фенотип схож с фенотипом, описанным в этом и предыдущих исследованиях для одиночной мутантной линии SGEFix⁻² (*sym33*) (рис. 1, *а* и 2, *а*; Tsyganov et al., 1998). В данном детальном исследовании было описано формирование инфекционных капель для одиночной мутантной линии SGEFix⁻² (*sym33*) и двой-

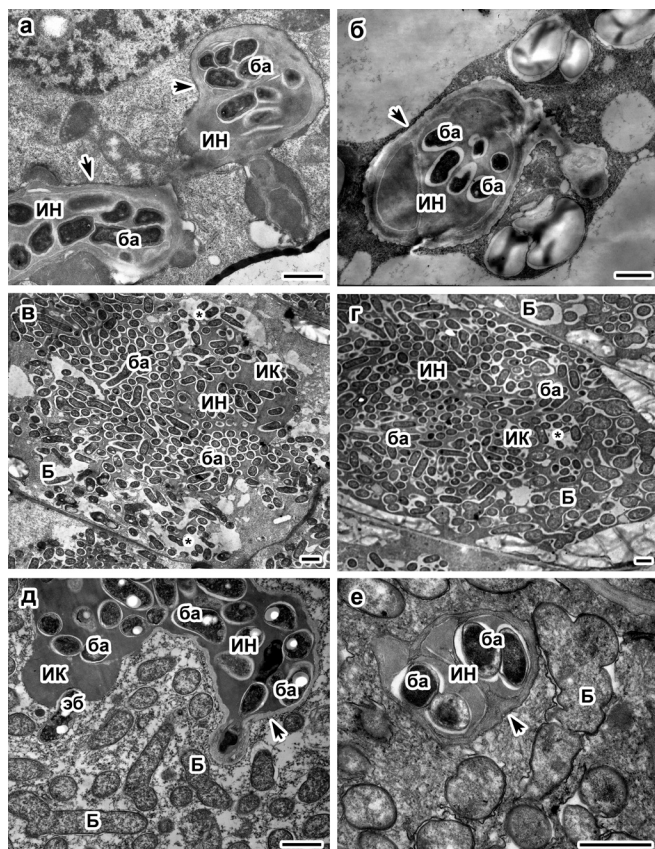


Рис. 2. Ультраструктурная организация клубеньков: *а* — SGEFix⁻² (*sym33*); *б* — RBT3 (*sym33*, *sym40*); *в* — SGEFix⁻¹ (*sym40*); *г* — RBT1 (*sym13*, *sym40*); *д* — E135F (*sym13*); *е* — SGE (дикий тип).

Стрелки указывают на клеточную стенку, ИН — инфекционная нить, ИК — инфекционная капля, ба — бактерия, эб — эндоцитируемая бактерия, Б — бактерионд; * — симбиосомы, содержащие несколько бактериондов, масштабная линейка — 1.0 мкм

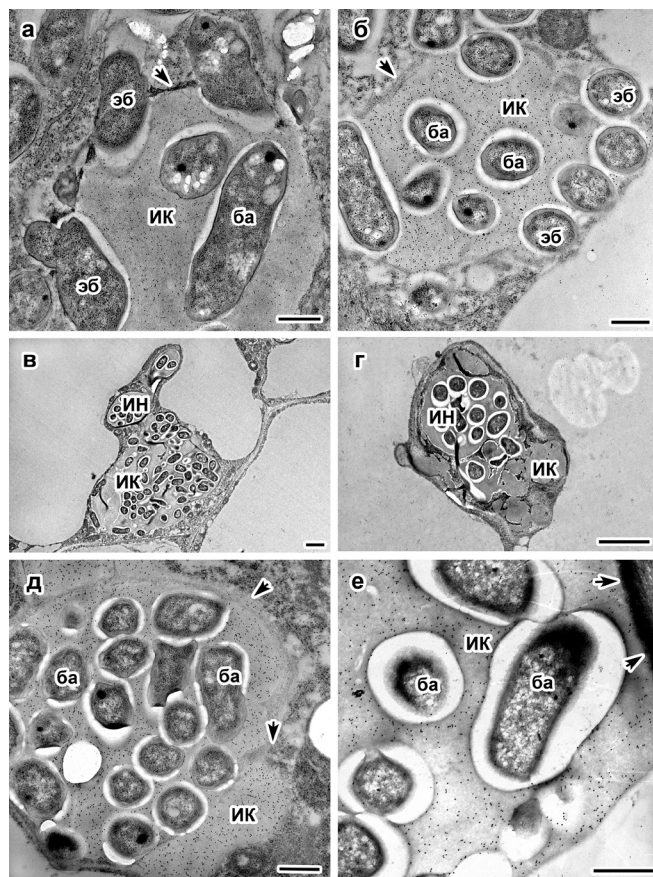


Рис. 3. Выявление инфекционных капель и локализация с помощью иммунного мечення золотом антигена MAC265 в инфекционных нитях и каплях в клубеньках:

а — SGE (дикий тип); *б* — SGEFix⁻¹ (*sym40*); *в* и *д* — SGEFix⁻² (*sym33*); *г* и *е* — RBT3 (*sym33*, *sym40*). Стрелки указывают на клеточную стенку, ИН — инфекционная нить, ИК — инфекционная капля, ба — бактерия, эб — эндоцитируемая бактерия; масштабная линейка *а*, *б*, *д* и *е* — 0,5 мкм, *в* и *г* — 2 мкм

ной мутантной линии RBT3 (*sym33*, *sym40*) (рис. 3, в и г). Этот признак не был описан ранее для одиночного мутанта SGEFix⁻² (*sym33*) (Tsyganov et al., 1998), вероятно из-за того, что количество этих капель снижено, по сравнению с одиночным мутантом SGEFix⁻¹ (*sym40*) и линией дикого типа SGE (данные не представлены). Состав матрикса инфекционных капель был подтвержден с помощью иммуноцитологического анализа у всех проанализированных линий: SGE (рис. 3, а), SGEFix⁻² (*sym33*) (рис. 3, б) и RBT3 (*sym33*, *sym40*) (рис. 3, в). Антитела MAC265 выявляют присутствие арабиногалактанпротеинов-экстензинов, которые являются характерными компонентами инфекционных нитей и капель (Rathbun et al., 2002; Brewin, 2004). Несмотря на формирование инфекционных капель у мутантной линии SGEFix⁻² (*sym33*) и двойной мутантной линии RBT3 (*sym33*, *sym40*), эндоцитоз бактерий в клубеньках этих линий не наблюдался. Это может указывать на неизвестные аномалии в структуре и функционировании инфекционных капель у мутантов, несущих ген *sym33*. Важно отметить, что мутантная линия SGEFix⁻² (*sym33*) проявляет нечетко выраженный (leaky) фенотип и эндоцитоз можно обнаружить в розоватых клубеньках (Tsyganov et al., 1998) и, более того, в некоторых клетках белых клубеньков (Voroshilova et al., 2001), но бактериоиды дифференцируются не полностью. Таким образом, рецессивный эпистаз мутантной аллели *sym33* над мутантной аллелью *sym40* был показан в отношении гистологической и ультраструктурной организации клубенька.

В результате проведенного анализа гистологической и ультраструктурной организации клубеньков у одиночных и двойного мутантов были выявлены эпистатические взаимодействия мутантных аллелей *sym13* и *sym40*, *sym33* и *sym40*, соответственно, в отношении проанализированных признаков. Таким образом, можно сделать вывод, что ген *Sym40* функционирует на более ранней стадии процессов инфекции и развития тканей клубенька, чем ген *Sym13*, а ген *Sym33* функционирует на более ранней стадии процесса инфекции тканей клубенька, чем ген *Sym40*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Л. Е. Дворяниновой, В. М. Семенову, К. К. Финдли, С. Банневелл за их прекрасное техническое обслуживание экспериментов. Наша специальная благодарность К. Павловски за плодотворную дискуссию.

Данная работа была финансово поддержана Российской академией сельскохозяйственных наук, грантом Президента России (НШ-5399.2008.4), Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК 02.740.11.0276), Федеральным агентством по образованию (ГК П290), Российским фондом фундаментальных исследований (07-04-01171-а; 07-04-01558-а; 08-04-90051-Бел_а), INTAS (YSF 04-83-3196), Совместной программой CRDF Федерального агентства по образованию (RUXO-012-ST-06, DP2M12). Н. Дж. Бревин является Emeritus Fellow в Центре Джона Иннеса.

Литература

1. Цыганова А. В., Цыганов В. Е., Финдли К. К. и др., 2009. Распределение арабиногалактанпротеинов-экстензинов в клубеньках мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) с нарушениями в развитии инфекционной нити // Цитология. Т. 51. № 1. С. 53–62.
2. Avery L., Wasserman S., 1992. Ordering gene function: the interpretation of epistasis in regulatory hierarchies // Trends Genet. Vol. 8. P. 312–316.
3. Bhatia C. R., Nichterlein K., Maluszynski M., 2001. Mutations affecting nodulation in grain legumes and their potential in sustainable cropping systems // Euphytica. Vol. 120. P. 415–432.
4. Borisov A. Y., Morzhina E. V., Kulikova O. A. et al., 1992. New symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) affecting either nodule initiation or symbiosome development // Symbiosis. Vol. 14. P. 297–313.
5. Borisov A. Y., Rozov S. M., Tsyganov V. E. et al., 1997. Sequential functioning of *Sym-13* and *Sym-31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // Mol. Gen. Genet. Vol. 254. P. 592–598.
6. Borisov A. Y., Danilova T. N., Koroleva T. A. et al., 2004. Pea (*Pisum sativum* L.) regulatory genes controlling development of nitrogen-fixing nodule and arbuscular mycorrhiza: fundamentals and application // Biologia. Vol. 59, Suppl. P. 137–144.
7. Brewin N. J., 2004. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis // Crit. Rev. Plant Sci. Vol. 23. P. 293–316.
8. Caetano-Anollés G., Gresshoff P. M., 1991. Plant genetic control of nodulation // Ann. Rev. Microb. Vol. 45. P. 345–382.
9. Guinel F. C., Geil R. D., 2002. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbiosis in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbiosis // Can. J. Bot. Vol. 80. P. 695–720.
10. Kneen B. E., LaRue T. A., Hirsch A. M. et al., 1990. *sym13* — a gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum* // Plant Physiol. Vol. 94. P. 899–905.
11. Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. M. et al., 1998a. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. Vol. 49. P. 345–370.
12. Koornneef M., Alonso-Blanco C., de Vries H. B. et al., 1998b. Genetic interactions among late-flowering mutants in *Arabidopsis* // Genetics. Vol. 148. P. 885–892.
13. Kosterin O. E., Rozov S. M., 1993. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I // Pisum Genet. Vol. 25. P. 27–31.
14. Morzhina E. V., Tsyganov V. E., Borisov A. Y. et al., 2000. Four developmental stages identified by genetic dissection of pea (*Pisum sativum* L.) root nodule morphogenesis // Plant Sci. Vol. 155. P. 75–83.

15. Oldroyd G. E. D., Downie J. A., 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes // *Mol. Cell Biol.* Vol. 5. P. 566–576.
16. Oldroyd G. E. D., Downie J. A., 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 59. P. 519–546.
17. Parker J. S., Cavell A. C., Dolan L. et al., 2000. Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* Vol. 12. P. 1961–1974.
18. Rathbun, E. A., Naldrett, M. J., Brewin N. J., 2002. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules // *Mol. Plant-Microbe Interact.* Vol. 15. P. 350–359.
19. Safronova V. I., Novikova N. I., 1996. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: lyophilization and liquid nitrogen freezing // *J. Microbiol. Methods.* Vol. 24. P. 231–237.
20. Tsyganov V. E., Morzhina E. V., Stefanov S. Y. et al., 1998. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule functioning // *Mol. Gen. Genet.* Vol. 259. P. 491–503.
21. Tsyganov V. E., Voroshilova V. A., Priefer U. B. et al., 2002. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis // *Ann. Bot. (Lond.)* Vol. 89. P. 357–366.
22. Tsyganov V. E., Voroshilova V. A., Herrera-Cervera J. A. et al., 2003. Developmental down-regulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum* L. // *New Phytol.* Vol. 159. P. 521–530.
23. Voroshilova V. A., Boesten B., Tsyganov V. E. et al., 2001. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes (*sym13*, *sym31*, *sym33*, *sym40*) blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* Vol. 14. P. 471–476.
24. Walker S. A., Viprey V., Downie J. A., 2000. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers // *PNAS.* Vol. 97. P. 13413–13418.
25. Wang T. L., Wood, E. A., Brewin N. J., 1982. Growth regulators, *Rhizobium* and nodulation of peas // *Planta.* Vol. 155. P. 345–349.

DOUBLE MUTANT ANALYSIS OF SEQUENTIAL FUNCTIONING OF PEA (*PISUM SATIVUM* L.) GENES: *SYM13*, *SYM33* AND *SYM40* DURING SYMBIOTIC NODULE DEVELOPMENT

V. E. Tsyganov, E. V. Seliverstova, V. A. Voroshilova, A. V. Tsyganova, Z. B. Pavlova, V. K. Lebsky, A. Y. Borisov, N. J. Brewin, I. A. Tikhonovich

✿ **SUMMARY:** Two double mutants carrying pea symbiotic gene pairs *sym13*, *sym40* and *sym33*, *sym40*, respectively, were constructed using single mutants blocked at different nodule developmental stages: E135f (*sym13*), SGEFix⁻¹ (*sym40*) and SGEFix⁻² (*sym33*). The epistasis of the mutant allele *sym40* over the mutant allele *sym13* and *sym33* over *sym40* was shown with respect to nodule histological and ultrastructural organisation. Thus, the proposed earlier sequential functioning of genes during infection process: *Sym33*→*Sym40*→*Sym13* has been confirmed.

✿ **KEY WORDS:** Plant-microbe interactions; development of symbiotic nodule; gene interactions; epistasis; infection thread; infection droplet.

✿ Информация об авторах

Цыганов Виктор Евгеньевич — заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии, кандидат биологических наук. E-mail: viktor_tsyganov@arriam.spb.ru

Селиверстова Елена Валентиновна — старший научный сотрудник, кандидат биологических наук. E-mail: elena306@yandex.ru.

Ворошилова Вера Александровна — специалист по клиническим исследованиям, к. б. н. E-mail: vera.voroshilova@psi-cro.com.

Цыганова Анна Викторовна — ведущий научный сотрудник. E-mail: anna_khodorenko@arriam.spb.ru.

Павлова Злата Борисовна — кандидат биологических наук. E-mail: zлата.pavlova@psi-cro.com.

Лебский Владимир Константинович — кандидат биологических наук. E-mail: lebsky04@cibnor.mx.

Борисов Алексей Юрьевич — доктор биологических наук, заведующий лабораторией. E-mail: ayborisov@yandex.ru.

Тихонович Игорь Анатольевич — профессор, д. б. н., академик РАСХН. E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3.

Бревин Николас — руководитель группы. John Innes Centre, NR4 7UH, Colney Lane, Norwich, United Kingdom. E-mail: nick.brewin@bbsrc.ac.uk

Tsyganov Viktor Eugenevich — head of the laboratory. E-mail: Viktor_Tsyganov@arriam.spb.ru

Seliverstova Elena Valentinovna — senior scientist. E-mail: elena306@yandex.ru.

Voroshilova Vera Aleksandrovna — expert in clinical trials. E-mail: vera.voroshilova@psi-cro.com.

Tsyganova Anna Viktorovna — senior researcher. E-mail: anna_khodorenko@arriam.spb.ru.

Pavlova Zlata Borisovna — PhD. E-mail: zлата.pavlova@psi-cro.com.

Lebsky Vladimir Konstantinovich — PhD. E-mail: lebsky04@cibnor.mx.

Borisov Aleksei Yurievich — head of the laboratory. E-mail: ayborisov@yandex.ru

Tikhonovich Igor Anatolievich — director. E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.

Brewin Nicholas James — project leader. John Innes Centre, NR4 7UH, Colney Lane, Norwich, United Kingdom. E-mail: nick.brewin@bbsrc.ac.uk