

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»**

На правах рукописи

Киричек Евгений Андреевич

**Симбиотическая совместимость штаммов *Rhizobium laguerreae* и гороха
посевного (*Pisum sativum* L.)**

1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д. б. н. Цыганов Виктор Евгеньевич

Санкт-Петербург
2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: Феномен симбиотической совместимости в бобово-ризобиальном симбиозе	12
1.1. Ключевые особенности ризобий — микросимбионтов Бобовых	12
1.1.1. Общая характеристика представителей семейства <i>Rhizobiaceae</i>	13
1.1.2. Механизм работы нитрогеназы	14
1.1.3. Гены ризобий, вовлеченные в симбиоз	16
1.1.4. Горизонтальный перенос генов в эволюции и адаптации к хозяину ..	20
1.1.5. Видовой комплекс <i>Rhizobium leguminosarum</i>	22
1.2. Установление бобово-ризобиального симбиоза.....	24
1.2.1. Влияние Nod-факторов на специфичность симбиоза	24
1.2.2. Ключевые этапы сигнального каскада инфекции	26
1.2.3. Инфекционный процесс и органогенез клубенька.....	30
1.2.4. Типы онтогенеза клубенька	35
1.3. Симбиотическая совместимость.....	37
1.3.1. Определение термина	37
1.3.2. «Бактерии-мошенники» и санкции со стороны растений	40
1.4. Заключение к обзору литературы.....	42
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1. Растительный материал и бактериальные штаммы.....	44
2.2. Секвенирование и сборка геномов	44
2.3. Вычисление идентичности нуклеотидных последовательностей и реконструкция филогении по данным полных геномов	45
2.4. Выращивание растений в контролируемых условиях	46
2.5. Моделирование природных условий	47
2.6. Просвечивающая электронная микроскопия	47
2.7. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.....	48
2.8. Иммуноцитохимический анализ	48
2.9. Гистохимическое выявление суберина и каллозы	51
2.10. Фенотипический анализ и оценка содержания питательных веществ....	51
2.11. Статистический анализ.....	52

2.12. Транскриптомный анализ клубеньков	52
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
3.1. Анализ филогенетических связей между штаммами <i>Rhizobium laguerreae</i>	54
3.2. Влияние генотипа хозяина	59
3.2.1. Фенотипы клубеньков и рост растений после инокуляции.....	59
3.2.1.1. Инокуляция <i>Rhizobium johnstonii</i> 3841 (геновид В).....	62
3.2.1.2. Инокуляция <i>Rhizobium laguerreae</i> AMPS22 (геновид N)	63
3.2.1.3. Инокуляция <i>Rhizobium laguerreae</i> AMPS05 (геновид O)	65
3.2.1.4. Инокуляция <i>Rhizobium laguerreae</i> AMPS34 (геновид O)	67
3.2.1.5. Инокуляция <i>Rhizobium laguerreae</i> AMPS04 (геновид R).....	69
3.2.1.6. Инокуляция <i>Rhizobium laguerreae</i> AMPS17 (геновид R).....	71
3.2.1.7. Инокуляция <i>Rhizobium laguerreae</i> AMPS23 (геновид R).....	73
3.2.2. Симбиотическая отзывчивость изученных генотипов гороха	75
3.3. Влияние генотипа микросимбионта.....	80
3.3.1. Симбиотический интерфейс: гомогалактуронан.....	82
3.3.2. Симбиотический интерфейс: рамногалактуронан I	87
3.3.3. Симбиотический интерфейс: гемицеллюлоза.....	89
3.3.4. Симбиотический интерфейс: арабиногалактановые белки	90
3.3.5. Симбиотический интерфейс: отложения каллозы и суберина.....	94
3.3.6. Симбиотический интерфейс: бактериальные липополисахариды	94
3.3.7. Транскриптомный анализ клубеньков.....	97
3.4. Влияние окружающей среды	102
Заключение	109
Выводы	111
Список литературы	114
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Иллюстративные материалы	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

На сегодняшний день одним из основных компонентов интенсивного земледелия является применение удобрений. Эффективность сельского хозяйства зависит от минеральных удобрений, которые используются для производства более половины всех продуктов питания в мире (Chojnacka *et al.*, 2023).

Значительный рост цен на минеральные удобрения заставляет фермеров и производителей сельскохозяйственной продукции пересматривать подход к их использованию и все больше обращаться к биологическим решениям (Mäder *et al.*, 2002; Adesemoye *et al.*, 2008). Большой интерес в развитии «зеленого», «устойчивого» (от англ. sustainable) сельского хозяйства может представлять использование генетических ресурсов микроорганизмов (Tikhonovich, Provorov, 2011; Busby *et al.*, 2017). Уже сейчас инновационные стартапы и частные компании активно проявляют инициативу и предлагают свои разработки; за последние годы несколько биотехнологических решений в сельском хозяйстве продемонстрировали свою эффективность (Wen *et al.*, 2021; Woodward *et al.*, 2025).

Биологическая азотфиксация обеспечивает значительную часть связанного азота в природе (Kebede, 2021). Так, большинство видов Бобовых способны фиксировать атмосферный азот, вступая в симбиотические отношения с различными α -, β - или γ - протеобактериями (вместе объединяемых термином «ризобии»). Взаимодействие ризобий и бобовых растений приводит к формированию нового для растений органа — симбиотического клубенька, в котором создаются оптимальные условия для функционирования нитрогеназы — фермента, восстанавливающего молекулярный азот (Oldroyd, 2013). Бобовые растения могут получить конкурентное преимущество в условиях, когда в почве мало азота, благодаря взаимовыгодному сосуществованию с микросимбионтами. Это особенно актуально, если другие факторы благоприятствуют их росту и развитию. Кроме того, Бобовые, фиксируя

атмосферный азот, значительно способствуют естественному обогащению этим элементом природных и сельскохозяйственных экосистем (Schwember *et al.*, 2019).

При взаимодействии симбионтов происходит интеграция геномов макро- и микроорганизмов, что повышает адаптационный потенциал обоих партнёров (Tikhonovich *et al.*, 2005). Отношения между организмами оказываются достаточно стабильны, поскольку в процессе коэволюции партнёры выработали механизмы контроля и координации взаимодействия (Provorov *et al.*, 2012). Для успешного симбиоза необходимо, чтобы оба организма были совместимы на всех этапах симбиотического развития. Несовместимость партнеров приводит к прерыванию инфекции или образованию неэффективных клубеньков с низким уровнем азотфиксации или ее полным отсутствием. Необходимо отметить, что у некоторых сортов люцерны, сои, клевера и других Бобовых несовместимость не является полной, в зависимости от используемого для инокуляции штамма ризобий или условий окружающей среды отдельные клубеньки могут формироваться (Walker *et al.*, 2020).

Симбиотическая совместимость — важный феномен современных исследований взаимодействия ризобий и растений-хозяев, зависящий от их генотипа (Takács *et al.*, 2018). Несмотря на широкое использование термина, его точное определение до сих пор не сформулировано. Симбиотическая совместимость отражает *качественную* характеристику взаимодействия партнеров, определяющую его эффективность и стабильность, что делает этот феномен ключевым объектом исследований.

Феномен симбиотической совместимости в сельском хозяйстве является частью сложного уравнения, охватывающего генотипы бактерий и растений, а также условия окружающей среды (Busby *et al.*, 2017; Mendoza-Suárez *et al.*, 2021). В контексте данной работы под симбиотической совместимостью будет подразумеваться способность конкретных генотипов ризобий и генотипов бобовых растений взаимодействовать друг с другом на протяжении всего процесса формирования симбиоза. Стоит учитывать, что микроорганизмы,

которые показывают многообещающие результаты в лабораторных условиях, могут не обладать ключевыми характеристиками для широкого внедрения в устойчивых и продуктивных сельскохозяйственных системах (Parnell *et al.*, 2016). По этой причине видится целесообразным проводить детальную оценку потенциальных микроорганизмов-кандидатов на предмет их симбиотической совместимости с хозяином.

Недавно на северо-западе Испании из клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.), эффективно фиксирующих азот, были выделены штаммы *Rhizobium laguerreae* (Martínez-Molina *et al.*, 2016). Отмечено, что, учитывая широкое распространение *R. laguerreae* в разных странах и их высокую эффективность в симбиозе с бобовыми культурами, *R. laguerreae* можно рассматривать как перспективного кандидата для биоудобрения гороха во всем мире (Flores-Félix *et al.*, 2020). Однако, оценка симбиотической совместимости этих штаммов с хозяином, как и изучение структурно-функциональной изменчивости образуемых клубеньков, не проводились.

Целью данной работы являлось изучение симбиотической совместимости на примере шести штаммов *R. laguerreae*, выделенных из клубеньков гороха в Испании, и трёх генотипов гороха посевного.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести полногеномное секвенирование, сборку геномов *de novo* и оценку филогенетического положения шести штаммов *R. laguerreae*.
2. Провести анализ гистологической и ультраструктурной организации клубеньков, индуцированных шестью штаммами *R. laguerreae*, на растениях гороха посевного сортов Frisson и Rondo, а также лабораторной линии SGE.
3. Оценить параметры роста (биомассу) и накопление азота растениями гороха посевного сорта Rondo при инокуляции шестью штаммами *R. laguerreae*.
4. Провести транскриптомный анализ растительных клеток клубеньков, индуцированных на растениях гороха посевного сорта

Rondo наиболее и наименее эффективным штаммами *R. laguerreae* из проанализированных ранее.

5. Провести анализ компонентов симбиотической поверхности взаимодействия в клубеньках гороха посевного сорта Rondo, индуцированных шестью штаммами *R. laguerreae*.
6. Оценить влияние условий изменяющейся окружающей среды на процесс клубенькообразования и гистологическую структуру клубеньков, индуцированных на растениях гороха посевного сорта Rondo шестью штаммами *R. laguerreae*.

Научная новизна

В ходе работы впервые были собраны полные геномы шести штаммов *R. laguerreae* AMPS, выделенных из клубеньков гороха в северо-западном регионе Испании. Анализируемые штаммы были помещены в пределах комплекса видов *R. leguminosarum* с присвоением штамму AMPS22 геновида N, штаммам AMPS04, AMPS17 и AMPS23 — геновида R, а штаммам AMPS05 и AMPS34 — геновида O.

Для конкретной симбиотической системы, *R. laguerreae* – горох посевной, в ходе цитологического анализа впервые были описаны гистологические и ультраструктурные нарушения процессов инфекции и клубенькообразования. Выявлены сортовая специфичность и штаммоспецифичность, определяющие наблюдаемые аномалии развития симбиотических клубеньков гороха сортов Frisson и Rondo, а также лабораторной линии SGE. Для изученных шести штаммов *R. laguerreae* AMPS был впервые выявлен факт активации защитных реакций в клубеньках как на структурном, так и транскрипционном уровнях. Показано, что лабораторная линия SGE демонстрирует наибольшую избирательность по отношению к анализируемым штаммам *R. laguerreae*, активируя защитные реакции против неэффективных партнеров, а сорт Rondo — наименьшую, формируя розовые клубеньки с четырьмя из шести штаммов.

Впервые был проведен анализ локализации пектинов, гемицеллюлозы, арабиногалактановых белков, суберина и каллозы, а также бактериальных

липополисахаридов в симбиотическом интерфейсе, сформированном горохом посевным и шестью анализируемыми штаммами *R. laguerreae*. Для клубеньков, образованных после инокуляции штаммами AMPS04, AMPS17, AMPS23 и AMPS34, показаны аномалии в локализации компонентов симбиотической поверхности взаимодействия: арабиногалактановых белков, арабиногалактанпротеин-экстенсина матрикса инфекционной нити и каллозы.

Для штамма *R. laguerreae* AMPS23 впервые показано позитивное влияние повышенной температуры на развитие симбиотических структур (инфекционных нитей, симбиосом), а для штамма *R. laguerreae* AMPS34 — негативное влияние.

Теоретическая и практическая значимость

Интенсивное земледелие, базирующееся на использовании минеральных удобрений, сталкивается с рядом серьезных ограничений. В современных реалиях развития агропромышленного комплекса наблюдается пересмотр традиционных подходов к интенсификации сельскохозяйственного производства (Busby *et al.*, 2017). В этих условиях особую значимость приобретает изучение альтернативных подходов к снабжению растений азотом, одним из которых является бобово-ризобиальный симбиоз. Бобово-ризобиальный симбиоз представляет собой динамичную систему, где генетические и экологические факторы тесно переплетаются, формируя сложную сеть взаимодействий (Mendoza-Suárez *et al.*, 2021). Симбиотическая совместимость, характеризующая действие всех этих факторов, выступает ключевым звеном, связывающим их с непосредственным результатом — эффективным или неэффективным симбиозом.

Практическая значимость исследований симбиотической совместимости заключается в возможности использования полученных данных для селекции эффективных штаммов ризобий, создания устойчивых симбиотических систем, разработки биоудобрений нового поколения, повышения продуктивности бобовых культур. Особую актуальность приобретает изучение новых штаммов ризобий, таких как *R. laguerreae*, которые демонстрируют высокую

эффективность в симбиозе с бобовыми культурами и могут служить перспективными кандидатами для создания инокулятов (Flores-Félix *et al.*, 2020).

Таким образом, исследование симбиотической совместимости представляет собой фундаментальную научную проблему, решение которой имеет важное прикладное значение для развития современного сельского хозяйства и обеспечения продовольственной безопасности в контексте устойчивого развития.

Методология и методы исследования

В процессе выполнения настоящей работы для получения и анализа результатов был применён широкий спектр микроскопических, классических микробиологических и молекулярных методов, а также биоинформатического и статистического анализа. Разнообразие использованных методов и комплементарное подтверждение результатов с их помощью свидетельствует о достоверности полученных данных.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая достоверность полученных результатов обеспечена использованием адекватных моделей, повторностями экспериментов, использованием современного прецизионного оборудования, проведением статистической обработки полученных результатов. Материалы диссертации были представлены на отечественных и международных конференциях, в том числе: III международной конференции PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (2022 г. Санкт-Петербург), II Международной конференции «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов» (2023 г. Санкт-Петербург), X съезде Общества физиологов растений России (2023 г. Уфа), Международном конгрессе «VIII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров» (2024 г. Саратов), III Международной конференции «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов» (2024 г. Санкт-Петербург), 5-ом Российском Микробиологическом Конгрессе (2025 г. Волгоград).

Связь работы с научными программами и личный вклад соискателя

Работу финансово поддержал Российский научный фонд (грант № 23-16-00090). Все исследования, посвященные анализу структуры клубеньков гороха, иммунолокализации компонентов симбиотической поверхности взаимодействия в клубеньках, сборке, аннотации и анализу бактериальных геномов были проведены автором лично. Эксперименты по анализу ультраструктуры клубеньков гороха выполнены совместно с А.В. Цыгановой, а эксперименты по транскриптомному анализу выполнены совместно с П.Г. Кусакиным. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и научным руководителем работы.

По теме работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК, индексируемые в международных базах Web of Science и/или Scopus:

1. **Kirichek E.A.**, Flores-Félix J.D., Velázquez E., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Whole-genome sequence of six *Rhizobium laguerreae* strains // *Microbiology Resource Announcements*. — 2024. — V. 13. — Art. e00279-00224. doi: 10.1128/mra.00279-24.

2. **Kirichek E.A.**, Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. A fair-weather friend: the impact of environmental factors on *Rhizobium laguerreae* nodulation efficiency // *Russian Journal of Plant Physiology*. — 2024. — V. 71, № 6. — Art. 226. doi: 10.1134/S102144372460908X.

3. **Kirichek E.A.**, Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. *Rhizobium laguerreae* pan-genome: insights into genetic diversity and symbiotic performance // *Microbiology*. — 2025. — V. 94, Suppl. 1. — P. S134-S138. doi: 10.1134/S002626172560452X.

4. **Kirichek E.A.**, Tsyganova A.V., Flores-Félix J.D., Velázquez E., Tsyganov V.E. Symbiotic compatibility between *Rhizobium laguerreae* and its host // *Archives of Microbiology*. — 2026. — V. 208, № 2. — Art. 91. doi: 10.1007/s00203-025-04595-7.

Также по материалам работы подготовлено 6 тезисов конференций.

Объём и структура диссертационной работы.

Диссертация изложена на 164 страницах и включает 27 рисунков и 5 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание объекта и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы из 373 наименований, в том числе 6 на русском и 367 на английском языке, а также приложения, включающего 18 дополнительных иллюстраций.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлен вклад макросимбионта в проявление симбиотической совместимости гороха посевного и бактерий *R. laguerreae*: сорт Rondo проявляет наибольший уровень совместимости, сорт Frisson — промежуточный, а линия SGE — наименьший.
2. Выявлен вклад генотипа микросимбионта в проявление симбиотической совместимости гороха посевного и бактерий *R. laguerreae*: штамм AMPS05 может рассматриваться как наиболее совместимый микросимбионт, штамм AMPS04 — как несовместимый, а штаммы AMPS17, AMPS22, AMPS23 и AMPS34 — как проявляющие промежуточный уровень симбиотической совместимости.
3. Степень развития симбиотических клубеньков при инокуляции штаммами *R. laguerreae* зависит от условий окружающей среды. Выявлена позитивная регуляция развития симбиотических структур (инфекционных нитей, симбиосом) при действии на клубенек повышенной температуры после инокуляции штаммом AMPS23 и негативная — после инокуляции штаммом AMPS34.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: Феномен симбиотической совместимости в бобово-ризобийном симбиозе

1.1. Ключевые особенности ризобий — микросимбионтов Бобовых

Семейство *Fabaceae* (Бобовые) является третьим по числу видов среди покрытосеменных растений (Bruneau *et al.*, 2013). Важнейшая экологическая роль семейства обусловлена способностью к симбиотической азотфиксации, что обеспечивает азотным питанием как сами растения, так и агроэкосистемы в целом (Рисунок 1). Симбиотические характеристики определяются способностью к формированию взаимовыгодных отношений с α -протеобактериями порядка *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) (Skerman *et al.*, 1980; diCenzo *et al.*, 2024) и представителями β - или γ -протеобактерий (рассматривается переклассификация класса *Betaproteobacteria* как порядка в пределах класса *Gamma proteobacteria* (Parks *et al.*, 2018)).

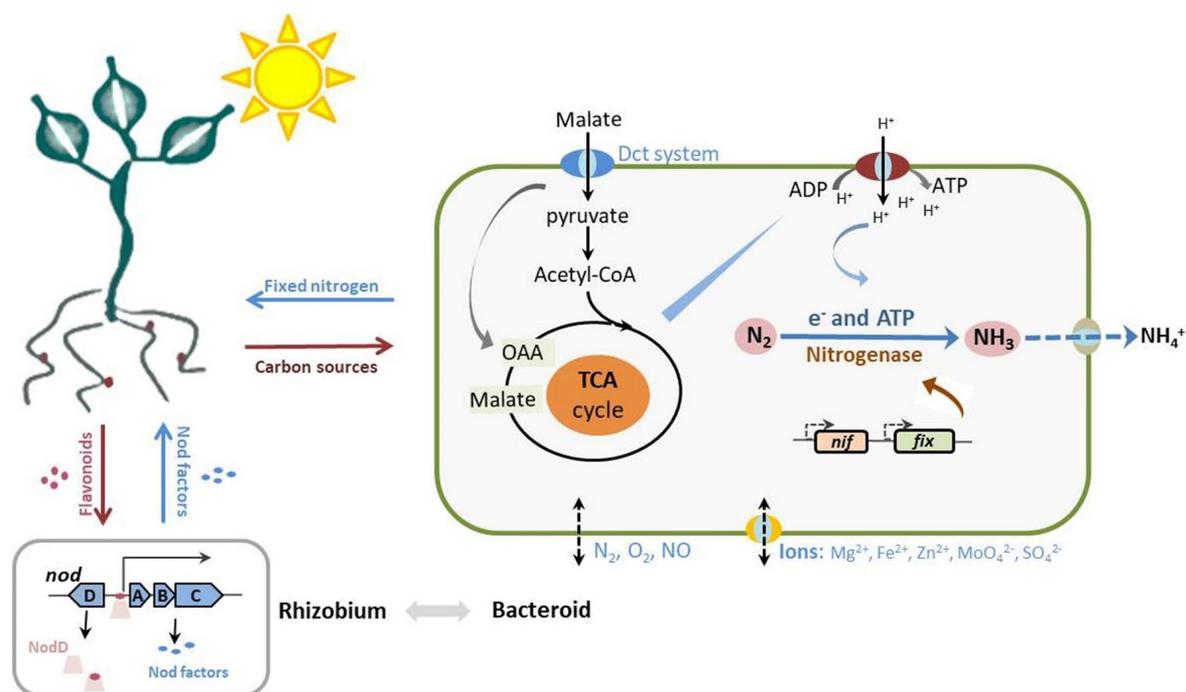


Рисунок 1 — Симбиоз между ризобиями и растением-хозяином

Схематическое изображение; показана транскрипция бактериальных генов, необходимых для синтеза сигнальных Nod-факторов (*nodA*, *nodB*, *nodC*), и основные биохимические процессы, протекающие в бактериоидах (ТСА — цикл трикарбоновых кислот; ОАА — оксалоацетат) (цит. по Li, Li, 2023).

1.1.1. Общая характеристика представителей семейства *Rhizobiaceae*

Впервые микроорганизмы, способные вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, были выделены М. Бейеринком в XIX веке и названы *Bacillus radicolica*. Данный изолят позднее был переименован в *Rhizobium* (Frank, 1889; цит. по Young *et al.*, 2001). Исходный род *Rhizobium* со временем претерпел ряд изменений, которые привели к появлению многочисленных новых таксонов.

Бактерии из семейства *Rhizobiaceae* представляют собой фенотипически гетерогенную группу микроорганизмов. Это грамотрицательные, преимущественно, аэробные подвижные палочковидные бактерии (Spaink *et al.*, 1998). Особенность этих микроорганизмов заключается в крупных геномах, размер которых может достигать 10,5 Мб (млн. пар оснований). У активно растущих бактерий геном обычно разделён на несколько репликонов, что позволяет эффективно управлять генетическим материалом (Spaink *et al.*, 1998). Характерным примером мультипартитной геномной организации является геном почвенной бактерии *Sinorhizobium meliloti*, эндосимбионта Бобовых родов *Medicago*, *Melilotus* и *Trigonella*, обладающей хромосомой размером примерно 3,4–4,2 Мб и двумя мегаплазмидами: pSymA (0,9–1,7 Мб) и pSymB (1,6–2 Мб) (Kearsley *et al.*, 2024). Мегаплазмиды несут ключевые гены, необходимые для установления симбиотических отношений с растением-хозяином (MacLean *et al.*, 2007). pSymB помимо генов, ответственных за биосинтез экзополисахаридов, необходимых для инфекционного процесса, и генов, участвующих в развитии бактерий внутри клеток хозяина, включает кластеры, ответственные за углеродный метаболизм и ген тРНК аргинина (DiCenzo *et al.*, 2013). Таким образом, pSymB представляет собой гибридный репликон (хромиду), обладающий характеристиками как плазмиды, так и хромосомы (Harrison *et al.*, 2010). Примечательно, что многие штаммы дополнительно включают вспомогательные плазмиды среднего размера, благодаря чему геном *S. meliloti* может насчитывать до 9000 генов.

Другой типичный представитель — *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, эндосимбионт гороха, вики, чины и чечевицы, обладает хромосомой размером 5,057 Мб и набором из шести плазмид: pRL12, pRL11, pRL10, pRL9, pRL8 и pRL7 (MacLean *et al.*, 2007).

Важной особенностью многих видов семейства *Rhizobiaceae*, включая указанных *Rhizobium* и *Sinorhizobium*, является наличие в их геномах комплекса генов *nifHDK*, которые кодируют ключевую ферментативную систему — нитрогеназу, ответственную за diazotrophy. Кроме того, в их геномах присутствуют дополнительные *nif*-гены, участвующие в синтезе кофакторов и регуляции биосинтеза нитрогеназы. Большинство свободноживущих ризобий не способны фиксировать азот, а их *nif*-гены активируются только в процессе симбиоза с растениями (Spaink *et al.*, 1998). Организация кластеров этих генов может существенно различаться даже внутри одного рода ризобий: у одних видов *nif*-гены располагаются на плазмидах, у других — интегрированы в хромосому. Внехромосомное расположение симбиотических генов — характерная черта не только мутуалистических микроорганизмов, но и патогенов, у которых последние часто отвечают за вирулентность (Adams *et al.*, 2014).

1.1.2. Механизм работы нитрогеназы

Ключевым ферментом, ответственным за процесс diazotrophy, является нитрогеназа, которая катализирует превращение молекулярного азота в аммиак. Этот процесс включает восстановление двух молекул аммиака из молекулы N_2 , что требует разрыва прочной тройной связи, одной из самых устойчивых в природе. Для осуществления этой реакции необходимо сложное взаимодействие металлопротеинов, сопровождающееся значительными энергетическими затратами. На каждый цикл преобразования тратится энергия, эквивалентная гидролизу 16 молекул АТФ (аденозинтрифосфат). Кроме того, реакция требует наличия мощного восстановителя, в роли которого обычно выступают ферредоксин или флаводоксин (Sickerman *et al.*, 2017; Einsle, Rees, 2020).

В природе существует три формы нитрогеназы: главная и две альтернативные, хотя наиболее исследованной остается молибденовая (главная) нитрогеназа, кодируемая *nif*-генами (Ну, Ribbe, 2016). Механизм восстановления азота молибденовой нитрогеназой основан на взаимодействии двух металлопротеинов (Рисунок 2). Редуктаза динитрогеназы (NifH), также известная как Fe-белок, представляет собой гомодимер с молекулярной массой около 60 кДа. Каждая субъединица содержит сайт связывания MgATФ и [Fe₄:S₄]-кластер, обеспечивающий передачу электронов. Электроны передаются второму компоненту комплекса — динитрогеназе (NifDK), известной как MoFe-белок. MoFe-белок имеет структуру α₂β₂-тетрамера с массой примерно 250 кДа и включает два металлокофактора: [Fe₈:S₇] (P-кластер) на каждой поверхности αβ-субъединицы и [Mo:Fe₇:S₉:C]:гомоцитрат (M-кластер) внутри каждой α-субъединицы (Ну, Ribbe, 2016). P-кластер отвечает за транспорт электронов к M-кластеру, где непосредственно происходит фиксация азота (Sickerman *et al.*, 2017).

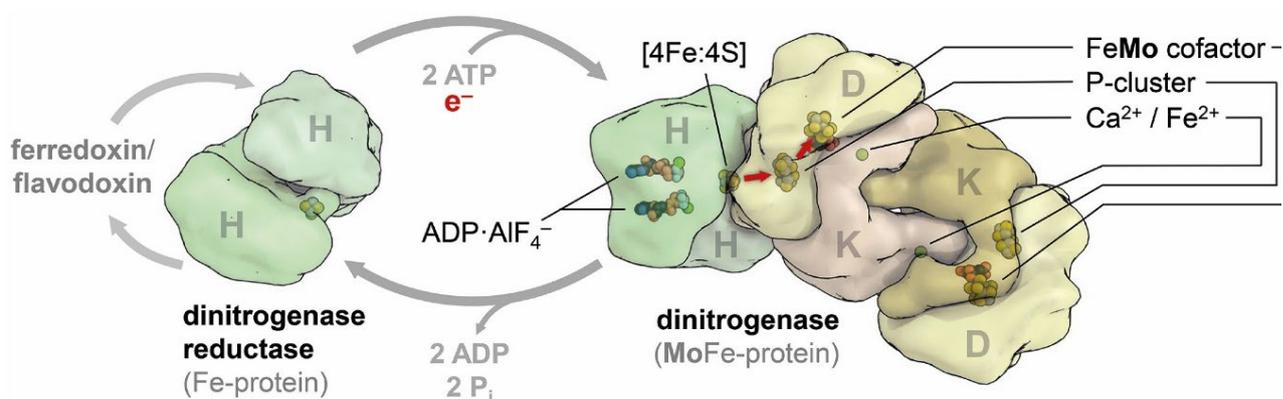


Рисунок 2 — Компоненты нитрогеназы и их взаимодействие

Редуктаза динитрогеназы (Fe-protein), динитрогеназный компонент (MoFe-protein); красные стрелки обозначают кофактор активного центра (цит. по Einsle, 2023).

В условиях дефицита молибдена некоторые свободноживущие азотфиксаторы используют нитрогеназу, содержащую ванадий, с кластером [V:Fe₇:S₉] — в три раза менее активную (Einsle, Rees, 2020). Если же отсутствуют как молибден, так и ванадий, процесс азотфиксации осуществляется железосодержащей нитрогеназой — в двадцать раз менее активной, чем

молибденовая (Crichton, 2019). Эта адаптивная способность позволяет diaзотрофным бактериям выживать и функционировать в различных экологических нишах.

1.1.3. Гены ризобий, вовлеченные в симбиоз

Бактериальные геномы состоят из двух частей: основного генома, общего для всех членов вида, который кодирует жизненно важные функции; и вспомогательного (акцессорного), который различается по составу среди штаммов внутри вида и включает группы генов, контролирующие функции, полезные в определенных условиях окружающей среды, такие как устойчивость к антибиотикам, доступ к новым ресурсам или взаимодействие с эукариотическими хозяевами (Young *et al.*, 2006).

Ризобии характеризуются уникальной экологической адаптацией, включающей выживание в почвенной среде, колонизацию корней растений и внутриклеточную персистенцию в растительных тканях. Функционируя как сапрофиты, они существуют в составе сложных микробных консорциумов, демонстрируя олиготрофный тип метаболизма. В процессе формирования эндосимбиотических взаимоотношений с бобовыми растениями ризобии подвергаются значительной морфологической и физиологической трансформации, дифференцируясь под действием растительных факторов в специализированные эндосимбиотические формы — бактериоды. Эволюционная пластичность генома ризобий, а также подвижность его вспомогательного компонента, вероятно, определяет такой широкий адаптационный потенциал этих бактерий (Poole *et al.*, 2018). Так, например, более 90% генов у *R. johnstonii* 3841 (ранее *R. leguminosarum* sv. *viciae*)* могут считаться вспомогательными, поскольку они не являются универсальными даже среди близких видов (Young *et al.*, 2006).

* Здесь и далее штамм 3841 будет обозначаться в соответствии с современной таксономической классификацией как *Rhizobium johnstonii*, даже если в оригинальной работе использовалось ранее употребляемое название *R. leguminosarum* sv. *viciae*

Сравнительный анализ геномов симбиотических и свободноживущих ризобий демонстрирует существенное увеличение размера генома у симбионтов: в среднем до 6,81 Мб против 4,47 Мб у свободноживущих форм (Pini *et al.*, 2011). Как уже было указано выше, геномная организация быстрорастущих ризобий характеризуется мультипартитностью, включающей основной хромосомный компонент и множественные плазмидные компоненты (часть акцессорного генома). Эта особенность тесно связана со способностью к клеточной колонизации, расширяя метаболический и симбиотический потенциал бактерий (DiCenzo, Finan, 2017).

Гены, необходимых всем ризобиям для индукции формирования клубеньков и азотфиксации, объединяют общим термином «симбиом», хотя точно определить его состав пока не удалось (Black *et al.*, 2012).

У ризобий симбиотические гены классифицируются на *nod*, *noe*, *nol*, *nif* и *fix* в соответствии с их функциями (Li, Li, 2023). Гены *nod* необходимы для синтеза факторов клубенькообразования (Nod-факторов) (Göttfert, 1993) (подробнее см. пункт 1.2.1.). Семейства генов *noe* и *nol* отвечают за модификацию, секрецию и регуляцию Nod-факторов (Spaink *et al.*, 1998). Гены *nif*, которые имеют структурную гомологию с геном *nif Klebsiella pneumoniae*, выполняют консервативную функцию контроля биосинтеза нитрогеназы и/или симбиотических регуляторов (Arnold *et al.*, 1988). Фиксация азота посредством нитрогеназы требует анаэробной или микроаэробной среды, и семейство генов *fix* участвует в регуляции и метаболизме кислорода, транспорте электронов (Fischer, 1994). Все эти гены обычно расположены на симбиотических плаزمидах в пределах высоко мобильных симбиотических островов (Black *et al.*, 2012) (Рисунок 3). Однако существуют исключения, например, *Sinorhizobium fredii* NGR234, в котором опероны *nif* и *nod* расположены на плазмиде, а гены *fix* — на хромосоме (Schmeisser *et al.*, 2009).

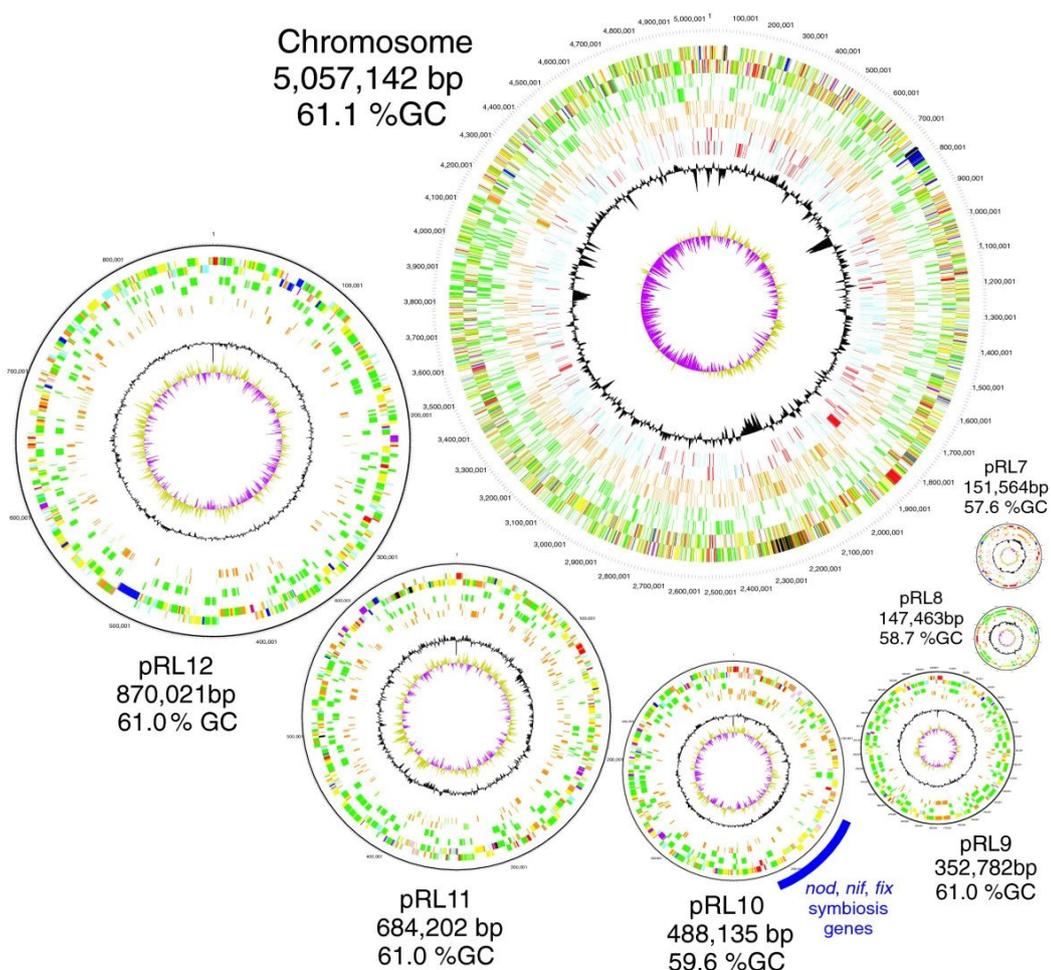


Рисунок 3 — Хромосома и шесть плазмид штамма *Rhizobium johnstonii* 3841

Плазмиды показаны в одном относительном масштабе, а хромосома — в одной четвертой этого масштаба. Кольца от самого внешнего к самому внутреннему обозначают гены в прямой и обратной ориентации: все гены, гены мембранных белков (ярко-зеленые), гены консервативных и неконсервативных гипотетически предсказанных белков (коричневые — консервативные, бледно-зеленые — неконсервативные), фаги и транспозоны (розовые, показаны только для pRL7); только для хромосомы показаны гены, ответственные за транскрипцию/рестрикцию и ДНК геликазы (красные), и регуляторы транскрипции (синие). Внутренние кольца обозначают отклонения в содержании GC (черные) и перекося состава (оливковый/малиновый) (цит. по Young *et al.*, 2006).

Кроме того, были идентифицированы многочисленные гены, расположенные вне мобильных симбиотических элементов, которые также участвуют в симбиотических взаимодействиях. К их числу относятся гены биосинтеза полисахаридов: экзополисахаридов (ЭПС) (*eps*), липополисахаридов (ЛПС) (*lps*), капсульных полисахаридов (*kps*), предположительно участвующие

в модуляции защитных реакций растения (Wang *et al.*, 2018); шапероны (Bittner *et al.*, 2007); гены, участвующие в подвижности и хемотаксисе (Wheatley *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2023); транспортеры и гены биосинтеза осмопротекторов (Tian *et al.*, 2012). Способность бактерий метаболизировать компоненты, обнаруженные в корневых экссудатах, такие как гомосерин или мимозин (Soedarjo, Borthakur, 1998; Vanderlinde *et al.*, 2014), определенные сахара, такие как эритрит, рамноза, мио-инозитол или аминокислоты (Ledermann *et al.*, 2021), способствуют успешному формированию клубеньков. Все обозначенные генетические детерминанты, вероятно, играют ключевую роль в адаптации ризобий к условиям ризосферы, обеспечивая способность к использованию специфических растительных метаболитов и резистентность к биотическим и абиотическим стрессовым факторам (Doin de Moura *et al.*, 2020).

Указанные выше гены не единственные, многие семейства генов контролируют последующие после первоначального сигнального диалога между растением-хозяином и ризобиями стадии развития клубенька: колонизацию бактериями клеток растения и дифференцировку ризобий в азотфиксирующие бактериоиды. Особую роль играют гены систем секреции белков (Nelson, Sadowsky, 2015). Системы секреции, обнаруженные у *Hyphomicrobiales*, варьируются от типа I до типа VI, в дополнение к Tat-комплексу системы twin-arginine translocation (Black *et al.*, 2012). Примечательно, что различные азотфиксирующие ризобии содержат различные подмножества этих систем (Fauvart, Michiels, 2008; Schmeisser *et al.*, 2009).

Гены основной части генома с основными клеточными функциями также играют существенную роль во время симбиоза. Например, мутация сенсорной гистидинкиназы *chvG* в *R. leguminosarum* отрицательно влияет на метаболизм ризобий, стабильность внешней мембраны и симбиоз с горохом, чечевицей и викой (Vanderlinde, Yost, 2012). Отсутствие гена *pssZ* нарушает биосинтез ЭПС ризобий и приводит к блоку инфицирования хозяина (Lira *et al.*, 2019). Кроме того, продукт гена *ropB*, важный регулятор транскрипции, участвует во взаимодействиях между ризобиями и горохом (Kosolapova *et al.*, 2022).

1.1.4. Горизонтальный перенос генов в эволюции и адаптации к хозяину

Ризобии представляют собой разнообразную полифилетическую группу бактерий (Taulé *et al.*, 2012). Современные данные, полученные с помощью секвенирования транспозонов (Tn-Seq), свидетельствуют о том, что адаптация ризобий к ризосфере растений-хозяев произошла задолго до их специализации к индукции образования клубеньков (Salas *et al.*, 2017). Эволюционная диверсификация этих микроорганизмов, вероятно, осуществлялась посредством независимых горизонтальных переносов генетического материала и дубликаций ключевых генов (Doin de Moura *et al.*, 2020). Бактерии, которые разделяют одну экологическую нишу, часто обмениваются генетическим материалом (Smillie *et al.*, 2011), поэтому вполне вероятно, что ключевые симбиотические функции были переданы в течение длительного эволюционного периода. Существует мнение, что бактериальный акцессорный геном являются «геномным симбионтом» со своей эволюционной историей и будущим, которые отличаются от истории и будущего его хозяев (Remigi *et al.*, 2016).

Ризобии характеризуются открытыми пан-геномами с высокой динамичностью генов (Liu *et al.*, 2023), что подтверждается наличием многочисленных инсерционных последовательностей и транспозаз (Zhao *et al.*, 2018). Горизонтальный перенос у этих микроорганизмов является основным драйвером геномной пластичности и поставщиком ключевых генов для тонкой настройки адаптации к растениям-хозяевам, являясь важным механизмом распространения эффективного генотипа (Rosselli *et al.*, 2021). Хотя, повышенная восприимчивость *Rhizobium* к интеграции новых *sym*-генов, приводит порой к образованию рекомбинантов с резко измененными симбиотическими свойствами. К числу таких рекомбинантов может быть отнесен штамм *R. leguminosarum* sv. *viciae* Norway, который способен инфицировать «чужеродного» хозяина — лядвенец, однако на основном хозяине, индуцирует не фиксирующие азот клубеньки (Liang *et al.*, 2018).

Адаптация ризобий к экологическим нишам, создаваемым растением-хозяином, в значительной степени определяется генами, расположенными на

симбиотических плазмидах. Например, плазида pRL8 *R. johnstonii* 3841 обогащена генами, экспрессируемыми преимущественно в условиях ассоциации с растениями гороха, и кодирует ферменты для утилизации гомосерина, выделяемого корнями в ризосферу (Vanderlinde *et al.*, 2014). Однако присутствие определённых плазмид в геноме ризобий может оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на симбиотическое развитие. Так, утрата крупной плазмиды у представителей рода *Mesorhizobium* может способствовать улучшению азотфиксации и конкурентоспособности в процессе клубенькообразования. В то же время наличие множественных крупных вспомогательных плазмид у *S. meliloti* может приводить к нарушению симбиотических взаимодействий с растением-хозяином (diCenzo *et al.*, 2019). В описанных случаях потеря или инактивация соответствующих генов под очищающим давлением отбора может предоставить ризобиям адаптивные преимущества.

Установлено, что популяции *Rhizobium* и *Sinorhizobium*, обитающие в ризосфере или клубеньках, демонстрируют значительно меньшее генетическое разнообразие симбиотических плазмид по сравнению с их хромосомами или вспомогательными плазмидами (Poole *et al.*, 2018). Происходит это за счет того, что перенос симбиотических плазмид представляет собой рабочий механизм «размножения» эффективных популяций ризобий (diCenzo *et al.*, 2019). Филогенетические сравнения последовательностей симбиотических генов показали, однако, что горизонтальный перенос был более распространен внутри родов, чем между родами (Andrews *et al.*, 2018). Внутривидовой перенос симбиотических плазмид у *R. leguminosarum* способствует повышению конкурентоспособности на начальных этапах формирования клубеньков и, в последующем, эффективности азотфиксации (Brewin, 1991).

Немалую роль может играть и географический фактор, создавая географически специфичный акцессорный компонент ризобий, определяющий скорее приспособленность к конкретным факторам окружающей среды, а не к растению-хозяину (Andronov *et al.*, 2025).

1.1.5. Видовой комплекс *Rhizobium leguminosarum*

В 1984 году в Руководстве Берджи по систематической бактериологии (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) в пределах *R. leguminosarum* было предложено выделять три биовара: *viciae*, *trifolii* и *phaseoli*, для разграничения различных типов специфичности к хозяину (Jordan, 1984). С тех пор произошло описание новых видов в пределах рода *Rhizobium*, а также новых родов для других видов клубеньковых бактерий. Многие штаммы, первоначально описанные как *R. leguminosarum*, были перемещены в новые виды, и очевидно, что три биовара, теперь называемые симбиоварами, не ограничиваются только *R. leguminosarum* (Young *et al.*, 2021). Последние данные свидетельствуют о «двумерном» распространении ключевых симбиотических генов у ризобий: колонизация нового рода происходит редко и требует модификаций генома реципиента, тогда как расширение внутри родов ризобий происходит часто и допускает возникновение новых симбиоваров (Remigi *et al.*, 2016).

R. leguminosarum sv. *viciae* способен эффективно колонизировать растения четырёх родов — *Pisum*, *Vicia*, *Lens* и *Lathyrus*. Этот широкий спектр хозяев частично объясняется наличием в геноме микросимбионта разнообразных плазмид, которые варьируют у различных изолятов (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2018). Однако существуют предположения о наличии предпочтительных генотипов *R. leguminosarum* sv. *viciae* для конкретных хозяев среди множества генотипов, представленных в почве (Jorriñ, Imperial, 2015). Эти предположения были подтверждены с помощью полимеразной цепной реакции и последующего анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов симбиотических и несимбиотических молекулярных маркеров у изолятов, полученных из клубеньков различных растений (Depret *et al.*, 2004). Более того, был обнаружен штамм, способный успешно инокулировать вику, но не горох (Dolgikh *et al.*, 2025).

Геномный анализ оказал значительное влияние на таксономию ризобий (Rajkumari *et al.*, 2022). Особенностью *R. leguminosarum* является дивергенция симбиотически специализированной части генома (образование симбиоваров с

различной хозяйской специфичностью) и его основной части, происходящие одновременно и в значительной степени независимо (Kumar *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2021; Young *et al.*, 2023). Данная таксономическая структура позволяет рассматривать *R. leguminosarum* как видовой комплекс, Rlc (англ. *Rhizobium leguminosarum* complex), возникший в результате «двумерной» эволюции многокомпонентного генома (Проворов, Андронов, 2024). В настоящее время Rlc включает по меньшей мере восемнадцать геновидов (Young *et al.*, 2021). Rlc представляет собой отдельную группу, четко отделенную от других видов рода *Rhizobium*. Анализ последовательностей гена 16S рРНК показывает значительное разнообразие внутри комплекса, но не позволяет различать геновиды; анализ отдельных генов тоже не всегда дает достоверную картину филогенетических отношений. По этой причине был предложен новый подход к определению границ видов ризобий на основе геномных данных (генотаксономия) — совмещение филогении универсальных коровых генов и сравнение значений нуклеотидной идентичности (от англ. Average Nucleotide Identity, ANI) (Li *et al.*, 2024; Martinez-Romero *et al.*, 2024). В результате, десять геновидов Rlc сейчас представляют отдельные «новые» виды: *R. brockwellii*, *R. johnstonii*, *R. beringeri* (Young *et al.*, 2023), *R. indicum* (Rahi *et al.*, 2020), *R. acacia* (Hsouna *et al.*, 2023), *R. laguerreae* (Saïdi *et al.*, 2014), *R. changzhiense* (Zhang *et al.*, 2021), *R. sophorae*, *R. ruizarguesonis*, и собственно *R. leguminosarum sensu stricto* (Young *et al.*, 2021).

Особое внимание исследователей привлекает так называемая F-клада в пределах комплекса Rlc. F-клада является группой из пяти близкородственных геновидов (*R. laguerreae* в широком смысле). Бактерии *R. laguerreae* были выделены из клубеньков *Vicia faba* L. в Перу, Испании и Тунисе (Saïdi *et al.*, 2014). Значения ANI между представителями F-клады выше 95%, а различия между представителями внутри клады меньше, чем между кладой и другими геновидами, что свидетельствует о высокой степени генетического родства и наличии общего предка (Young *et al.*, 2021). Описанная уникальная особенность

клады *R. laguerreae* может представлять интерес при изучении механизмов видообразования у ризобий.

1.2. Установление бобово-ризобиального симбиоза

1.2.1. Влияние Nod-факторов на специфичность симбиоза

Взаимодействие клубеньковых бактерий с растениями семейства *Fabaceae* приводит к формированию уникального органа — симбиотического клубенька, который представляет специализированную экологическую нишу для данных микроорганизмов. Ключевым фактором формирования эффективного симбиоза является взаимный обмен молекулярными сигналами между партнерами (Oldroyd, 2013; Suzaki, Kawaguchi, 2014; Zipfel, Oldroyd, 2017).

На бедных азотом почвах бобовые растения выделяют группу вторичных фенилпропаноидных метаболитов — флавоноидов или изофлавоноидов. Несмотря на их широкий спектр, в процессе формирования клубеньков участвуют лишь специфические подгруппы этих соединений (Liu, Murray, 2016). Последние выполняют функцию хемоаттрактантов для ризобий, причем их эффективная концентрация формируется в непосредственной близости от зоны развития корневых волосков — основного места инфицирования (Liu, Murray, 2016; Dong, Song, 2020).

Индукция формирования симбиотических клубеньков осуществляется специфическими липохитоолигосахаридами, известными как Nod-факторы (Spaink *et al.*, 1998) (Рисунок 4). Эти соединения синтезируются и секретируются ризобиями в ответ на флавоноиды (Fliegmann, Vono, 2015). Структура Nod-факторов характеризуется наличием трёх–пяти остатков N-ацетилглюкозамина с β -1-4 связями, к которым присоединена жирная кислота и разнообразные радикалы в различных положениях углеводного скелета (Spaink *et al.*, 1991). Биосинтез Nod-факторов является уникальным свойством, присущим исключительно ризобиям.

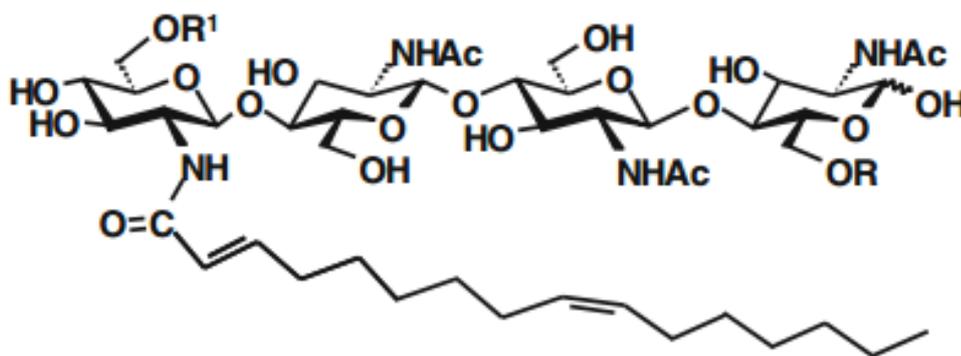


Рисунок 4 — Химическая структура основного Nod-фактора, продуцируемого *Sinorhizobium meliloti*

R — SO_3^- , R^1 — ацетил; жирнокислотный радикал — C16:2Δ2E,9Z (цит. по Fliegmann, Bono, 2015).

Синтез Nod-факторов осуществляется комплексом бактериальных генов: *nodA* (ацил-трансфераза), *nodB* (хитоолигосахариддеацетилаза) и *nodC* (хитоолигосахарид-синтаза) обеспечивают формирование остова Nod-фактора; *nodE*, *nodF* и *nodG* ответственны за синтез жирнокислотного компонента; а множество дополнительных генов (*nod*, *noe*, *nol* — гены «хозяйской специфичности») участвуют в модификации хитоолигосахаридного скелета, его транспорте и секреции (Spaink *et al.*, 1998).

Nod-фактор, синтезированный исключительно белками NodA, NodB и NodC, имел полноценную биологическую активность и вызывал деформации корневых волосков (Spaink *et al.*, 1991). Однако на сегодняшний день не известен ни один штамм ризобий, который производил бы только «минимальный» Nod-фактор (Spaink *et al.*, 1998).

Регуляторный белок NodD (ген *nodD* характеризуется конститутивной экспрессией) функционирует как сенсор растительных сигналов и активатор транскрипции *nod* генов, содержащих *nod*-бокс (Schlaman *et al.*, 1992). Функциональная двойственность NodD определяется структурной связью между сенсорным доменом С-концевого участка и ДНК-связывающим доменом N-концевого участка молекулы. Помимо NodD, в некоторых модельных ризобиях

были идентифицированы дополнительные факторы, регулирующие активность *nod* генов, например, двухкомпонентная регуляторная система NodV-NodW, белки NwsB и NolA у *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Loh, Stacey, 2003), или SyrM, гомолог NodD, у *Sinorhizobium* (Barnett, Long, 2015; Acosta-Jurado *et al.*, 2020).

Растения семейства *Fabaceae*, выделяя специфический спектр флавоноидных соединений, вызывают повышение внутриклеточного содержания Ca^{2+} у совместимых ризобий (Moscatiello *et al.*, 2010). Далее флавоноиды связываются с бактериальными регуляторами транскрипции, активируют их и индуцируют экспрессию генов клубенькообразования. Nod-факторы служат своего рода «визитной карточкой» для растения, сообщая о присутствии потенциально выгодного симбионта рядом. Разнообразие заместителей, в сочетании с длиной и степенью насыщенности N-ацильной группы, широко варьирует между Nod-факторами, продуцируемыми различными видами ризобий, и является важным аспектом в обеспечении специфичности взаимодействий между различными видами ризобий и Бобовых (Wang *et al.*, 2018).

1.2.2. Ключевые этапы сигнального каскада инфекции

Ризобиальные Nod-факторы необходимы и достаточны для индукции программы развития симбиотического клубенька даже в отсутствие бактерий (Truchet *et al.*, 1991). Nod-факторы связываются в плазмалемме корневых волосков с рецептор-подобными киназами, несущими LysM домены (три домена внеклеточного мотива лизина), формирующие между собой гетеромерные комплексы (Geurts *et al.*, 2005; Oldroyd *et al.*, 2011; Mbengue *et al.*, 2020) (Рисунок 5). Так, у лядвенца японского (*Lotus japonicus* L.) рецепторный комплекс состоит из NFR1 (NOD FACTOR RECEPTOR KINASE 1) и NFR5 (NOD FACTOR RECEPTOR KINASE 5), а у люцерны усеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.) — LYK3 (LysM RECEPTOR KINASE 3) и NFP (NOD FACTOR PERCEPTION) (Oldroyd, 2013; Roy *et al.*, 2020). У гороха за распознавание отвечают рецепторные комплексы SYM10/K1 и SYM10/SYM37/SYM2 (Kirienko *et al.*,

2018). Эти рецепторы имеют решающее значение для выбора партнера/определения круга хозяев (Radutoiu *et al.*, 2007). Другим рецептором, участвующим в восприятии Nod-факторов у *L. japonicus*, является SYMRK (SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE), содержащий лейцин-богатые повторы (у *Medicago* — DMI2 (DOES NOT MAKE INFECTIONS 2)) (Oldroyd, 2013; Pan *et al.*, 2018; Mbengue *et al.*, 2020).

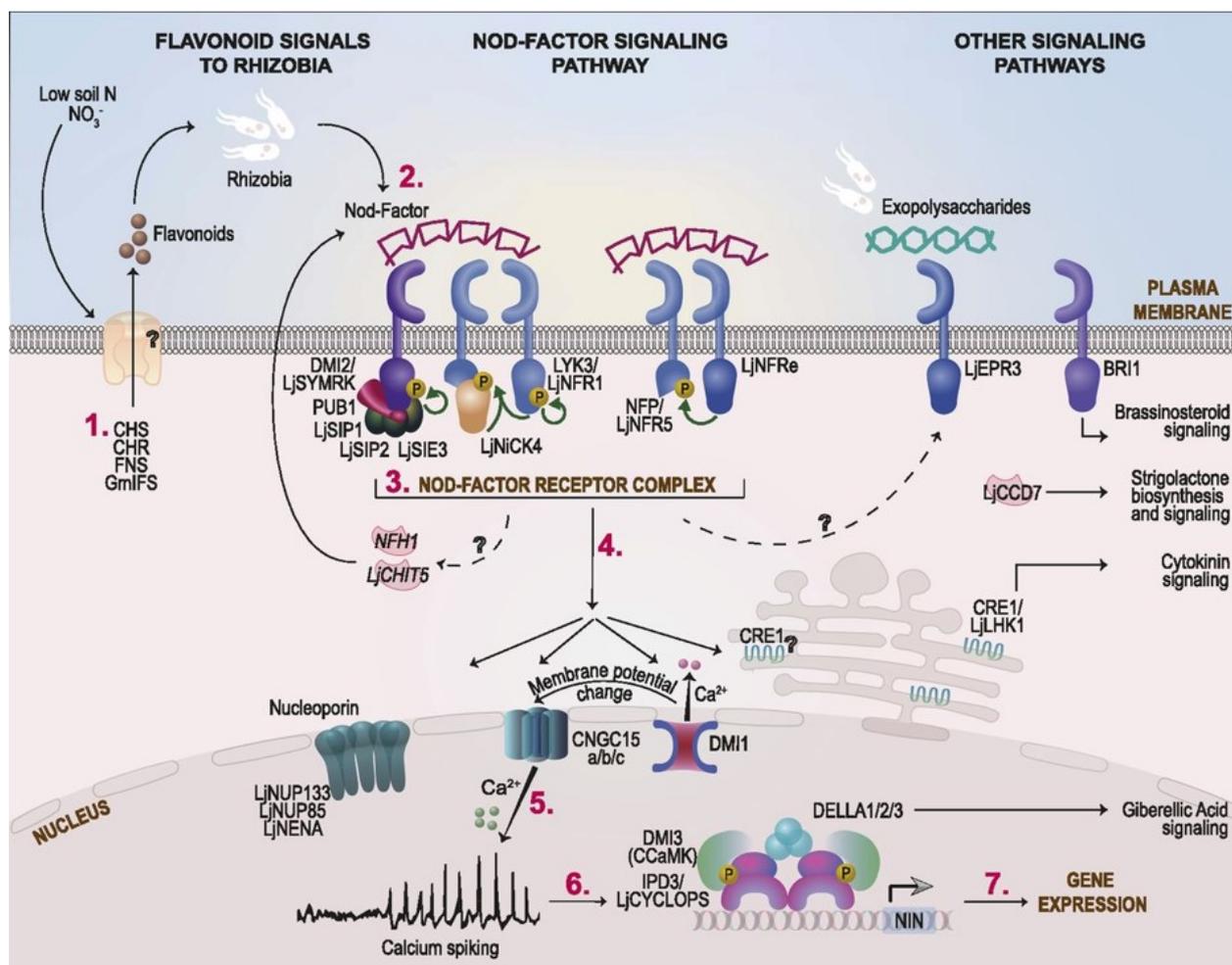


Рисунок 5 — Гены и процессы, участвующие в сигнальном каскаде, активируемом Nod-фактором во время клубенькообразования

Флавоноиды, образующиеся при низком содержании азота в почве (1); запуск выработки бактериальных Nod-факторов (2); восприятие сигналов рецепторами на плазматической мембране эпидермальных клеток корня (3); запуск биохимических и физиологических реакций (4–6); изменения в экспрессии ядерных генов (7). Названия белков указаны для *M. truncatula*, если не уточняется иное (цит. по Roy *et al.*, 2020).

LysM содержащие рецепторные белки распознают также хитин в клеточных стенках грибов и пептидогликан в бактериальных оболочках, что

ведет к активации ассоциированных с патогеном молекулярных паттернов (от англ. Pathogen-Associated Molecular Pattern; PAMP) и запуску иммунных реакций (Oldroyd, 2013). Для успешного развития симбиоза ризобии должны модулировать иммунный ответ. Ризобияльные ЛПС подавляют PAMP, а ризобияльный флагеллин не вызывает иммунного ответа, в отличие от большинства других бактериальных флагеллинов (Poole *et al.*, 2018). Защитные рецепторные киназные комплексы распознают микробные молекулы на поверхности растительных клеток, следовательно, иммунная система ограничивает количество штаммов ризобий с которыми может ассоциироваться бобовое растение (Tóth, Stacey, 2015; Cao *et al.*, 2017).

Ниже рецепторов находится сигнальный путь, который разделяет несколько компонентов с сигнальным путем арбускулярной микоризы, это «общий симбиотический путь» (Oldroyd *et al.*, 2011; Oldroyd, 2013; Geurts *et al.*, 2016). Общие симбиотические сигнальные компоненты включают индуцируемую Nod-фактором E3 убиквитинлигазу, белки ранней сигнальной трансдукции SIP (SYMRK INTERACTING PROTEINS), а также «рецептор входа» LYK3 и симбиотическую рецептор-подобную киназу DMI2 у *Medicago* (Mbengue *et al.*, 2010; Vernié *et al.*, 2016) (Рисунок 5). Гетеротримерные G-белки, регулирующие рост и развитие, могут играть важную роль в реакции растений на восприятие Nod-фактора на ранних стадиях развития симбиоза (Bovin *et al.*, 2022).

Активация сигнального пути симбиоза приводит к образованию активных форм кислорода и притоку кальция через плазматическую мембрану, что наблюдается также при запуске защитных реакций (Иванова, Цыганов, 2014). НАДФН-оксидаза RВОН и еще не выявленный вторичный мессенджер участвуют в передаче сигналов от LysM рецепторов (Zipfel, Oldroyd, 2017). Некоторый сигнал (предположительно мевалонат, образующийся при работе фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктаза) перемещается в ядро. В восприятии сигнала в ядре участвуют катионные калиевые каналы DMI1 (DOES NOT MAKE INFECTIONS 1) у *M. truncatula* или CASTOR и POLLUX у *L.*

japonicus, расположенные в ядерной оболочке, кальциевые каналы CNGC15 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNELS 15) и кальциевая АТФаза MCA8, а также нуклеопорины NUP85 (NUCLEOPORIN85) и NUP133 (NUCLEOPORIN133) (Zipfel, Oldroyd, 2017; Roy *et al.*, 2020) (Рисунок 5). В результате происходит отток ионов калия в ядерную оболочку, реполяризация ядерной мембраны, активация осцилляций ионов кальция. Изменения концентрации Ca^{2+} в ядре активируют кальций-кальмодулинзависимую протеинкиназу CCaMK, которая, являясь распределителем сигналов, запускает транскрипцию генов, участвующих в формировании и развитии клубенька (Oldroyd *et al.*, 2011; Zipfel, Oldroyd, 2017).

CCaMK может связывать кальций непосредственно через домен спираль–петля–спираль или косвенно через домен, связывающий кальмодулин. В отсутствие кальция CCaMK остается автоингибированной. Связывание кальция ведет к автофосфорилированию CCaMK (Miller *et al.*, 2013).

Основными субстратами для CCaMK являются транскрипционные факторы CYCLOPS у *L. japonicus* или IPD3 (INTERACTING PROTEIN OF DMI3) у *Medicago* (Messinese *et al.*, 2007). Фосфорилирование этих факторов достаточно для образования клубенька (Singh *et al.*, 2014), однако известно, что CYCLOPS является компонентом гораздо более обширной регуляторной системы и связан с белками DELLA (Fonouni-Farde *et al.*, 2016). Белки DELLA играют огромную роль в развитии растений, их участие в симбиозе обеспечивает контроль этого процесса растительными гормонами гибберелинами, поддерживая ризобиальную инфекцию в эпидерме, а также регулируя количество и плотность закладки клубеньков (Jin *et al.*, 2016). Помимо этого, CYCLOPS может входить в состав комплекса с содержащими GRAS-домен факторами транскрипции NSP1 (NODULATION SIGNALING PATHWAY 1) и NSP2 (NODULATION SIGNALING PATHWAY 2), необходимыми для экспрессии генов, чувствительных к Nod-факторам (Hirsch *et al.*, 2009).

Индукцированный транскрипционный каскад ведет к органогенезу клубеньков и/или ризобиальной инфекции, которая включает дополнительные

факторы транскрипции (Mbengue *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Транскрипционные факторы NIN (NODULE INCEPTION) и NF-YA1 вовлечены в установление связи между симбиотической передачей сигналов, производством и локализацией максимума ауксина, необходимого для деления клеток и инициации клубеньков (Lin *et al.*, 2020).

1.2.3. Инфекционный процесс и органогенез клубенька

Бобово-ризобийный симбиоз характеризуется длительной эволюционной историей, в ходе которой произошло значительное усложнение взаимодействий между симбионтами. Предполагается, что первоначальная форма симбиоза, более простая, при которой ризобии проникали в корни через повреждения эпидермального слоя, наблюдаемая у некоторых представителей семейства *Fabaceae*, таких как арахис культурный (*Arachis hypogaea* L.) и водное бобовое растение *Neptunia*, эволюционировала в более специализированную форму взаимодействия (Rivas *et al.*, 2002; Ibáñez *et al.*, 2016). Эта форма характеризуется регулируемой колонизацией корней растения ризобиями посредством инфекционных нитей с образованием клубеньков (Brewin, 1991).

Процесс бактериальной инфекции инициируется адгезией ризобий к поверхности корневых волосков растения. На начальном этапе адгезия является слабой, обратимой и неспецифической (Gage, 2004). Слабое, зависящее от Ca^{2+} связывание, опосредованно адгезионным белком ризобий RapA1 (Mongiardini *et al.*, 2008). Синтез дополнительных белков прикрепления, RapA2 и RapC, связывающих экзополисахариды капсулы, дополнительно усиливает прикрепление к корням (Abdian *et al.*, 2013; Frederix *et al.*, 2014). Затем следует этап плотного связывания, опосредованный синтезом бактериями целлюлозных фибрилл (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Синтез этих фибрилл необходим для образования биопленок на кончиках корневых волосков (Gage, 2004; Fujishige *et al.*, 2008; Rinaudi, Giordano, 2010). Рост численности бактериальных клеток в составе биопленки способствует усилению слабых сигналов, что приводит к повышению инфекционного потенциала бактерий при взаимодействии с

растением (Catoira *et al.*, 2001). Лектины растения-хозяина также играют роль в адгезии ризобий, связываясь одновременно с клеточной стенкой растения и углеводными остатками на поверхности совместимых бактерий (Laus *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008).

Под действием Nod-факторов происходит реорганизация цитоскелета растения (Su *et al.*, 2020), сопровождающаяся деформацией и характерным скручиванием корневых волосков по форме напоминающем «ручку зонтика» или «посох пастуха» (Brewin, 1991). В результате этого процесса формируется инфекционный карман — камера. Бактерии, захваченные в этот карман, продолжают процесс деления, формируя микроколонию (Sahlman, Fåhræus, 1963). Начало инвазии связано с локализованной деградацией клеточной стенки корневого волоска при участии бактериальных и растительных ферментов, разрушающих полисахариды клеточной стенки, а также с синтезом множества белков, в том числе раннего нодулина ENOD11 (Early NODulin) (Guan *et al.*, 2013; Fournier *et al.*, 2015; Sogawa *et al.*, 2019; Suzaki *et al.*, 2019). Дальнейшее проникновение ризобий в корневые волоски осуществляется через специализированную трубчатую структуру растительного происхождения — инфекционную нить (Brewin, 1991).

Инфекционные нити представляют собой уникальные инвазивные растительные структуры, способные пересекать границы клеток (Рисунок 6). Они окружены клеточной стенкой и содержат матрикс, состоящий из арабиногалактанпротеинов-экстензинов (АГБ-Э), целлюлаз, пектинов, пролин-богатых белков и компонентов бактериального происхождения (Brewin, 2004; Цыганова, Цыганов, 2019; Tsyganova *et al.*, 2021). В инициации и полярном росте инфекционных нитей участвует как актиновый (Peleg-Grossman *et al.*, 2007), так и тубулиновый цитоскелет (Perrine-Walker *et al.*, 2014). Белки мембранного транспорта способствуют развитию инфекционной нити, поскольку плазматическая мембрана растения инвагинирует и расширяется внутрь (Roy *et al.*, 2020). Ризобии внутри инфекционной нити располагаются в апопласте и продолжают быть отделены от растительных клеток, так как стенка

инфекционной нити является продолжением стенки клетки-хозяина (Gage, 2004; Fournier *et al.*, 2008).

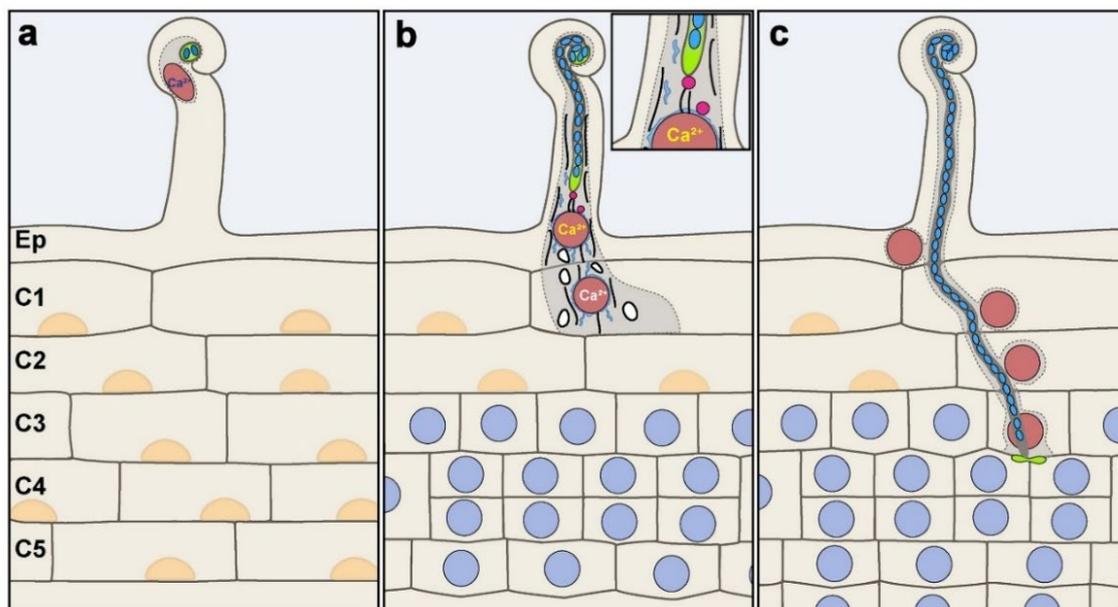


Рисунок 6 — Клеточные реакции растений, лежащие в основе роста полярной инфекционной нити

Показаны последовательные стадии: формирование инфекционной камеры, инициация инфекционной нити в корневых волосках и её продвижение через кору корня (цит. по de Carvalho-Niebel *et al.*, 2024).

Сигнальный путь, активируемый Nod-факторами, также инициирует реактивацию клеточных делений в перицикле и наружной (в случае детерминированных клубеньков, см. пункт 1.2.4.) или внутренней (в случае недетерминированных клубеньков) коре корня (Timmers *et al.*, 1999). Транскрипционный фактор NIN является главным регулятором множества генов и процессов, которые оказывают положительное влияние на органогенез клубеньков (Liu *et al.*, 2019). Недавно было показано, что важную роль в индукции клеточных делений играют транскрипционные факторы SHR (SHORT-ROOT) и SCR (SCARECROW), поддерживающие деление и дифференцировку клеток (Dong *et al.*, 2020). Так, в результате делений клеток формируется примордий клубенька (Timmers *et al.*, 1999).

При достижении инфекционной нитью примордия клубенька происходит высвобождение бактерий в местах истончения клеточной стенки, известных как инфекционные капли. С морфологической точки зрения этот процесс

напоминает эндоцитоз (Brewin *et al.*, 1990; Brewin, 1998), хотя анализ вовлеченных молекулярных компонентов свидетельствует о его сходстве с экзоцитозом (Ivanov *et al.*, 2010). В процессе перехода внутрь клетки хозяина ризобии утрачивают капсулу из поверхностных полисахаридов (Spaink *et al.*, 1998). Бактерии остаются окружёнными плазматической мембраной растительной клетки (симбиосомной мембраной), которая регулирует обмен метаболитами между микросимбионтами и цитоплазмой (Coba de la Peña *et al.*, 2018). Симбиосомная мембрана не связана с клеточной стенкой растения, но тесно контактирует с поверхностью бактериальных клеток.

Бактерии дифференцируются в специфические формы, известные как бактериоиды, которые увеличиваются в размерах и изменяют свою морфологию (Brewin, 1991; Maróti, Kondorosi, 2014). Превращение в бактериоиды сопровождается большими изменениями в транскриптоме и протеоме: гены азотфиксации индуцируются, а большинство генов, необходимых для роста, включая те, которые кодируют рибосомальные белки и участвуют в репликации ДНК и биосинтезе аминокислот — репрессируются (Becker *et al.*, 2004; Pessi *et al.*, 2007; Karunakaran *et al.*, 2009) (Рисунок 7).

Развитие бактериоидов после проникновения бактерий в клетки клубенька представляет собой многостадийный процесс, каждая стадия которого контролируется специфическими генами растения (Vasse *et al.*, 1990; Tsyganov *et al.*, 2003). Они индуцируют набухание бактериальных клеток, амплификацию генома и повышают проницаемость клеточной мембраны (Mergaert *et al.*, 2006). Процесс дифференцировки бактерий представляет собой регулируемый механизм адаптации к симбиосомной среде, которая может расцениваться для бактерий как стрессовая (Spaink *et al.*, 1998).

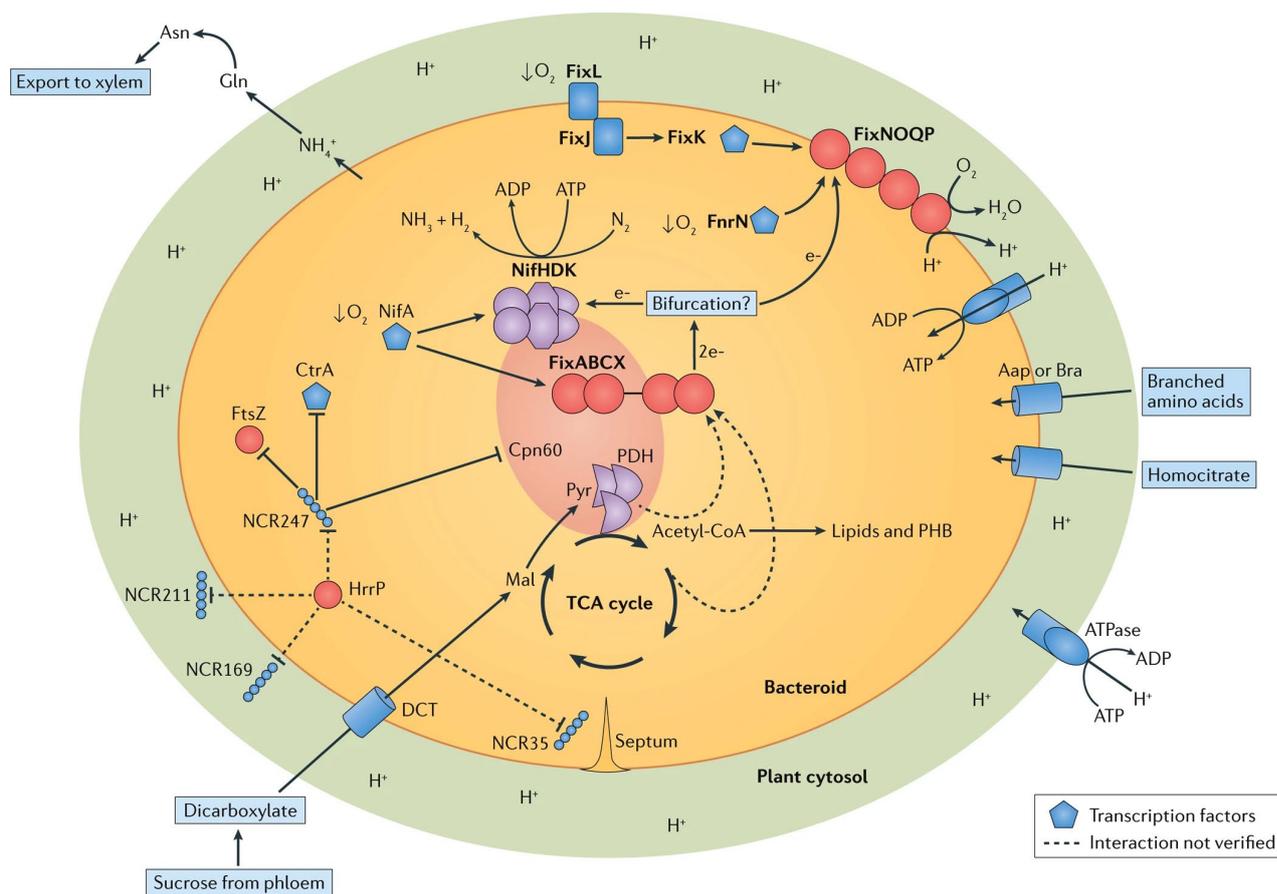


Рисунок 7 — Обмен питательными веществами и регуляция развития бактериодов

Aap, пермеаза аминокислот; Bra, пермеаза разветвленных аминокислот; CtrA, регулятор ответа клеточного цикла; DCT, транспортер дикарбоксилата; FixJ, транскрипционный регуляторный белок; FixK, белок регуляции азотфиксации; FixL, сенсорный белок; FtsZ, белок деления клеток; Mal, малат; Pyr, пируват (цит. по Poole *et al.*, 2018).

У Бобовых, принадлежащих кладе IRLC (сокр. англ. Inverted Repeat-Lacking Clade) (Wojciechowski *et al.*, 2000), дифференцировка бактерий в бактериоды носит необратимый характер благодаря участию специфичных для клубенька цистеин-богатых NCR-пептидов (от англ. Nodule Cysteine-Rich Peptides) (Haag *et al.*, 2013; Stonoha-Arther, Wang, 2018). Предполагается, что вызываемая NCR-пептидами терминальная дифференцировка бактериодов служит для ограничения чрезмерного размножения ризобий в клетках макросимбионта (Kereszt *et al.*, 2011; Chomicki *et al.*, 2020). Развитие клубеньков может происходить и без пептидов NCR (Ishihara *et al.*, 2011).

В терминальной дифференцировке бактериоидов белок VacA играет важную роль, вероятно, участвуя в изменении состава симбиосомной мембраны и обеспечивая слияние секреторных везикул с симбиосомами (Kereszt *et al.*, 2011; Haag *et al.*, 2013).

Высвобождение ризобий в клетки клубеньков сопровождается значительными перестройками цитоскелета (Kitaeva *et al.*, 2016; Kitaeva *et al.*, 2021; Kitaeva *et al.*, 2022; Hlaváčková *et al.*, 2023). Тонкая сеть F-актина и эндоплазматических микротрубочек окружает растущие симбиосомы (Zhang *et al.*, 2024). Эндоплазматические микротрубочки организуют пространственное расположение симбиосом, в то время как порядок расположения кортикальных определяют тип роста инфицированной клетки: изотропный или анизотропный (Kitaeva *et al.*, 2016; Kitaeva *et al.*, 2022). Изменения кортикального цитоскелета направлены на увеличение объема инфицированных клеток для размещения значительного количества симбиосом (Kitaeva *et al.*, 2022). Объем такой клетки может превышать объем диплоидной меристематической в 80 раз, а число симбиосом достигать 50 тысяч (Maróti, Kondorosi, 2014).

1.2.4. Типы онтогенеза клубенька

Ткани клубеньков состоят из внешней коры, эндодермы, сосудистых пучков и внутренней коры, которые покрывают центральную, в основном инфицированную область. В процессе развития симбиоза число зараженных клеток хозяина постоянно увеличивается. Это происходит двумя путями, вследствие чего клубеньки делят на детерминированные и недетерминированные (Рисунок 8). В недетерминированных клубеньках меристема функционирует на протяжении длительного времени, и бактерии в результате продолжающегося роста инфекционных нитей колонизируют новые клетки хозяина (Xiao *et al.*, 2014). В результате недетерминированные клубеньки приобретают характерную вытянутую форму.

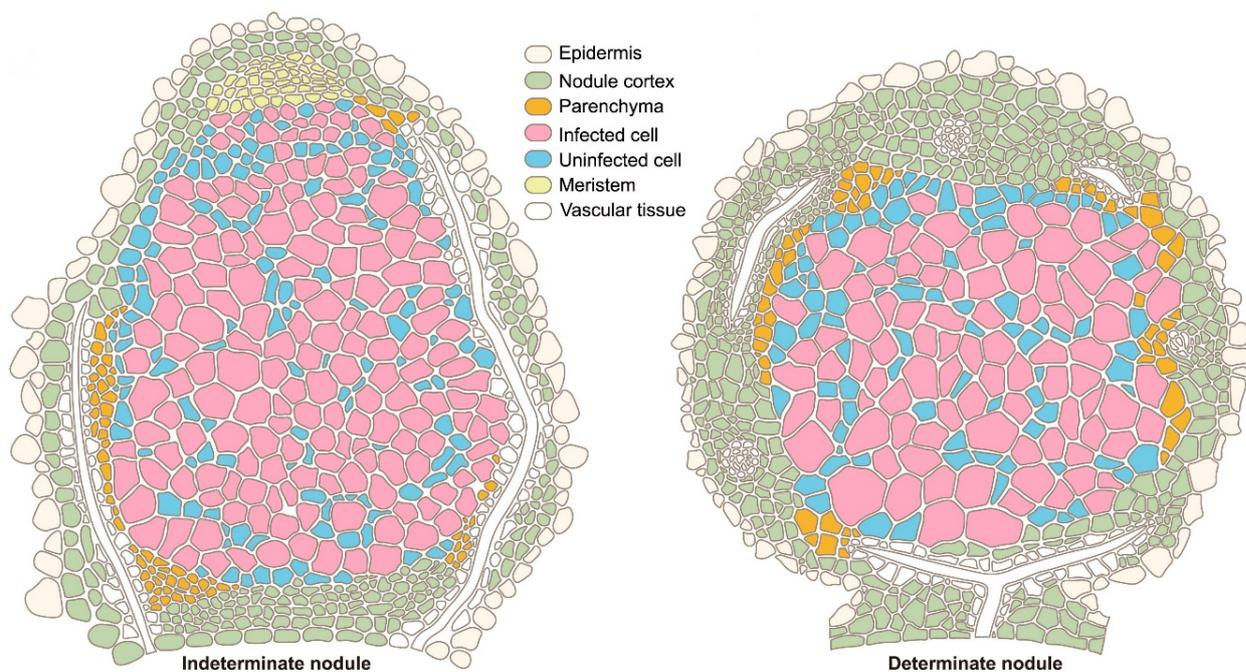


Рисунок 8 — Разновидности симбиотических клубеньков

Недетерминированные клубеньки (слева) имеют цилиндрическую форму и содержат различные зоны; детерминированные клубеньки (справа) имеют сферическую форму, и все инфицированные клетки находятся на одинаковой стадии развития (цит. по Zhang *et al.*, 2024).

Постоянная активность меристемы, которая дает начало новым клеткам клубенька, впоследствии колонизируемым ризобиями, приводит к образованию ткани клубенька, которая активно фиксирует азот (Xiao *et al.*, 2014). Такой процесс приводит к градиенту стадий развития (Vasse *et al.*, 1990). За меристемой (зона I) следует зона инфекции (зона II), в которой клетки дифференцируются и увеличиваются в размерах. В этой зоне происходит контакт с инфекционными нитями, образуются инфекционные капли, бактерии высвобождаются и начинают колонизировать клетки хозяина, при этом инициируется их дифференцировка в бактериоиды. Переходная, или интерзона (зона II–III), представлена одним–тремя слоями клеток, заполненных амилопластами, в клетках начинается активный синтез леггемоглобина (Singh, Varma, 2017). Зона азотфиксации (зона III) является самой обширной, она заполнена крупными дифференцированными клетками, содержащими большое количество симбиосом. Бактериоиды этой зоны значительно отличаются по размерам от бактерий, цитоплазма в них просветлена, и они часто имеют плеоморфную

форму. Бактероиды окружены симбиосомной мембраной индивидуально и, в отличие от детерминированных клубеньков, никогда не собраны в группы. По мере функционирования клубенька в базальной области формируется зона старения (зона IV). В этой зоне происходит дегенерация симбиотических структур, бактериоиды теряют свою гетерогенность цитоплазмы и постепенно лизируются (Serova *et al.*, 2017; El Msehli *et al.*, 2019).

Medicago sativa L., *M. truncatula*, *P. sativum*, виды родов *Vicia* и *Trifolium* — эти объекты исторически использовались в качестве моделей для изучения формирования и развития недетерминированных клубеньков. *M. truncatula* — модельное бобовое растение, способствовавшее развитию исследований, сосредоточенных на генетике и клеточной биологии симбиоза, поскольку она диплоидна, хорошо трансформируется, имеет небольшой геном и может легко скрещиваться для формирования генетически однородных линий (Garmier *et al.*, 2017).

В детерминированных клубеньках меристематическая активность временна и индуцируется только в наружной коре, а бактерии распространяются путем деления уже инфицированных клеток, в следствие чего клубенек имеет правильную шарообразную форму (Brewin, 1991). Такие клубеньки характерны, например, для *Arachis hypogaea*, *Glycine max* (L.) Merr., *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

1.3. Симбиотическая совместимость

1.3.1. Определение термина

Впервые термин «симбиотическая совместимость» (от англ. symbiotic compatibility) появляется в работе Х. Уилкинсона с соавторами (Wilkinson *et al.*, 1996). В этой работе на примере бобово-ризобияльного симбиоза *Amphicarphaea bracteata* (L.) Fernald с бактериями рода *Bradyrhizobium* рассматривается роль генотипа и местообитания на совместимость взаимодействия партнеров в контексте коэволюции. Отрицая точку зрения о том, что коэволюция происходит быстрыми темпами в каждой локальной популяции, авторы подчеркивают вклад

конкретных генотипов (Wilkinson *et al.*, 1996). Дальнейшее развитие концепции симбиотической совместимости привело к широкому использованию этого термина в работах, посвященных изучению влияния генетических факторов одного или обоих организмов на эффективность симбиоза.

Симбиотическая совместимость, как качественное свойство системы, отражает способность конкретных генотипов макро- и микросимбионта взаимодействовать друг с другом. Симбиотическая совместимость представляет собой комплексный феномен, определяющий характер взаимодействия между партнерами. Данное свойство симбиотической системы зависит от: генетических особенностей обоих партнёров (Fagorzi *et al.*, 2021; Watanabe *et al.*, 2025); способности к молекулярному распознаванию (Oldroyd, 2013; Zipfel, Oldroyd, 2017); возможности формирования симбиотического интерфейса (Tsyganova *et al.*, 2021); эффективности установленного взаимодействия (Basile, Lepek, 2021).

Совместимость симбиотического взаимодействия определяется на самых разных уровнях, так совместимость может быть видо/сорто- или штаммоспецифичной. В случае бобово-ризобиального симбиоза, одним из первых описанных примеров была неспособность формировать клубеньки природным вариантом гороха *sym2* обладающим штаммоспецифичностью (Lie, 1984). Большинство дикорастущих линий гороха из Афганистана устойчивы к клубенькообразованию европейскими и североамериканскими штаммами *Rhizobium* как раз в следствие наличия рецессивного генетического локуса *PsSym2^A*, в отличие от европейских сортов гороха, несущих аллель *PsSym2^E* (Sulima *et al.*, 2019). Однако штаммы *R. leguminosarum* sv. *viciae* из почв Ближнего Востока, которые продуцируют O-ацетилированные на восстанавливающем конце Nod-факторы, такие как, например, турецкий штамм *R. leguminosarum* ТОМ индуцирует клубеньки на растениях линии 'Афганистан' (Firmin *et al.*, 1993).

Виды Бобовых сильно различаются по своей специфичности к ризобиальным симбионтам. Генотип растения определял конкурентоспособность и эффективность азотфиксации у *R. leguminosarum*

(Kaziūnienė *et al.*, 2025). Генотип ризобий также влияет на совместимость партнеров в симбиозе (Zhao *et al.*, 2018). Специфичность к хозяину для ризобий проявляется на уровне трибы Fabaeae, на уровне родов и местных видов (Andrews, Andrews, 2017). Симбиотические фенотипы, такие как рост растений или количество клубеньков, различаются в зависимости от комбинаций штамм ризобий – генотип растения (взаимодействие генотип-на-генотип (ген-на-ген)). Показано, транскрипционный ответ ризобий на корневые экссудаты зависит от генотипов обоих партнеров (Fagorzi *et al.*, 2021).

S. fredii NGR234 — штамм ризобий с самым широким кругом хозяев из когда-либо описанных (Saldaña *et al.*, 2003). В отличие от большинства известных штаммов *S. fredii*, NGR234 не способен индуцировать клубеньки на сое *G. max*. Исследования, проведенные в Испании, Швейцарии и Китае, показали, что NGR234 индуцировал азотфиксирующие клубеньки по крайней мере с 6 различными образцами дикой сои (*Glycine soja* Siebold & Zucc.) из Китая вне зависимости от условий культивирования. Предполагается, что образцы *G. soja* могут иметь различные генетические локусы *Rj(rj)*, что определяет совместимость во взаимодействии с *S. fredii* (Indrasumunar *et al.*, 2010; Temprano-Vera *et al.*, 2018).

Последним, но не менее важным фактором, влияющим на совместимость, служит окружающая среда (Mendoza-Suárez *et al.*, 2021). Свойства почвы: температура, pH, влажность, доступность питательных веществ и состав нативной ризобиальной и общей почвенной микробиоты влияют на эффективность симбиоза и конкуренцию клубенькообразования (Mendoza-Suárez *et al.*, 2021; Watanabe *et al.*, 2025).

Понимание механизмов, лежащих в основе симбиотической совместимости, важно для селекции эффективных штаммов ризобий и создания продуктивных симбиотических систем.

1.3.2. «Бактерии-мошенники» и санкции со стороны растений

Процесс клубенькообразования контролируется в первую очередь растением (Sachs *et al.*, 2018). Бобовые извлекают выгоду из симбиоза, но этот энергозатратный процесс необходимо регулировать (Sachs *et al.*, 2018). Растения выработали механизмы, допускающие или предотвращающие проникновение совместимых и несовместимых бактерий соответственно, однако до образования клубеньков Бобовые имеют мало возможностей для оценки ризобияльных симбионтов на предмет их потенциала азотфиксации (Basile, Lereq, 2021).

Некоторые ризобии развили способность продуцировать смеси Nod-факторов, которые позволяют им колонизировать различные Бобовые, в которых они фиксируют азот плохо или совсем не фиксируют (Sachs *et al.*, 2018). Таким образом появляются «бактерии-мошенники» («читеры», от англ. cheater). Под «читерами» в контексте бобово-ризобияльного симбиоза обычно подразумеваются штаммы ризобий, которые получают выгоду, но не обеспечивают адекватной азотфиксации в обмен.

После того, как развитие клубеньков началось, Бобовые демонстрируют способность выборочно «наказывать» неэффективные ризобии. Эксперименты показали, что клубеньки с азотфиксирующими ризобиями обычно растут (и ризобии внутри них быстро размножаются), тогда как клубеньки с неэффективными или менее эффективными ризобиями, как правило, остаются маленькими (ризобии внутри них имеют сниженную приспособленность) (Sachs *et al.*, 2010; Oono *et al.*, 2011; Regus *et al.*, 2017). Эта способность растений-хозяев нацеливаться на неэффективные и малоэффективные ризобии и снижать их приспособленность по сравнению с полезными генотипами называется «санкциями» (Kiers *et al.*, 2003).

У растений есть ряд механизмов, по средствам которых они накладывают санкции на «бактерий-мошенников» (Рисунок 9). К ним относятся: компарментализация, предпочтительное распределение ресурсов, регуляция по средствам фитогормонов, избирательное старение клубеньков, активация защитных реакций (Porter *et al.*, 2024). Индуцированное старение клубеньков

запускается, если они испытывают действие стрессовых факторов (Serova, Tsyganov, 2014) и наблюдается в неэффективных клубеньках (Serova *et al.*, 2018). Одним из первых морфологических изменений служит разрушение мембраны симбиосомы, которое высвобождает бактериоиды в цитоплазму клеток растения и подвергает ризобии воздействию враждебной среды клетки-хозяина (Van de Velde *et al.*, 2006). Активирующиеся защитные реакции обычно направлены на элиминацию неэффективных симбионтов (Bourcy *et al.*, 2013).

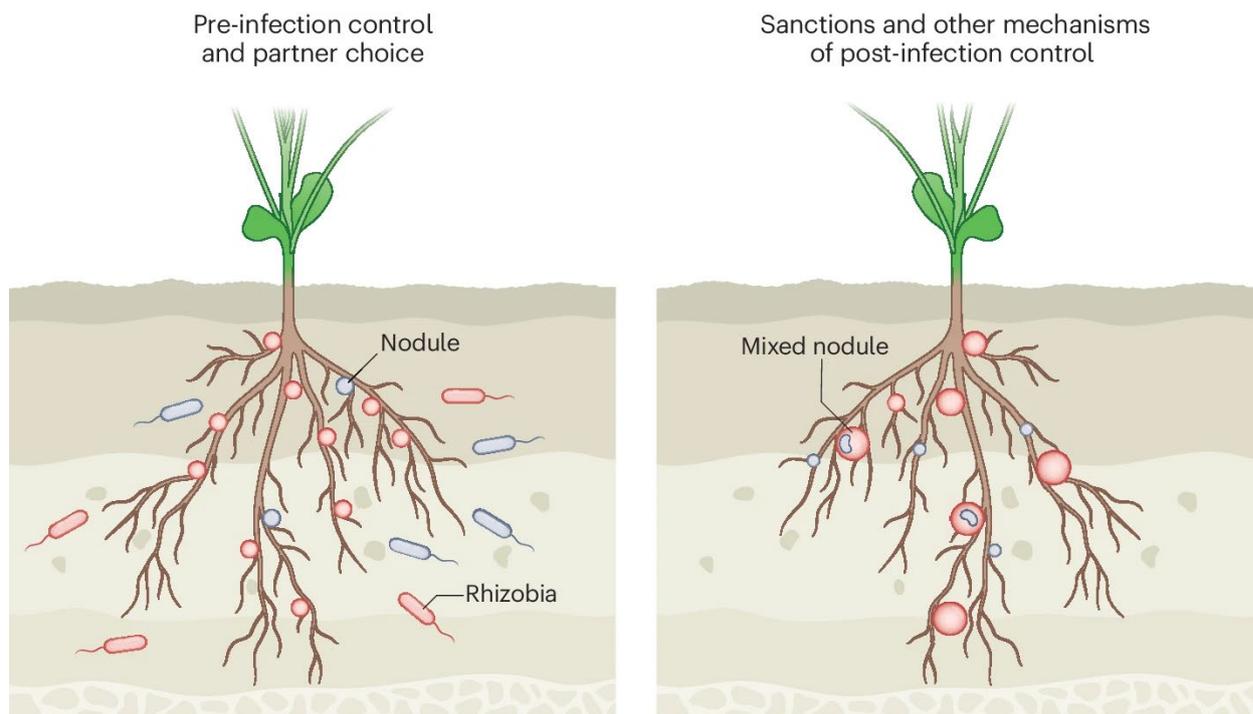


Рисунок 9 — Бобовые обнаруживают и реагируют на ризобии различной степени полезности посредством двух основных механизмов

Слева: преинфекционный контроль и выбор партнера; растения отбирают полезные ризобии (красные клетки; красные клубеньки показывают клетки с полезными ризобиями) и исключают менее полезные (синие клетки; синие клубеньки показывают клетки с менее полезными ризобиями). Справа: санкции и другие постинфекционные механизмы (цит. по Porter *et al.*, 2024).

Ассоциация Бобовых и ризобий имеет много черт антагонистической «гонки вооружений», при которой хозяева развивают разнообразные механизмы контроля, а ризобии — механизмы его обхода. Ризобии демонстрируют эволюционное преимущество перед хозяевами, имея большую численность популяции и более высокие скорости размножения (Porter, Simms, 2014). В контексте эволюции и приспособленности, наличие «бактерий-мошенников» и

санкций растений является важным аспектом, формирующим динамику мутуализма (Gano-Cohen *et al.*, 2019). Санкции могут способствовать отбору ризобий, которые являются более эффективными фиксаторами азота, таким образом, влияя на их эволюционные траектории и приводя к появлению наиболее симбиотически совместимых партнеров.

1.4. Заключение к обзору литературы

Традиционная модель интенсивного земледелия, базирующаяся на широком применении минеральных удобрений, сталкивается с рядом существенных ограничений. В условиях развития агропромышленного комплекса наблюдается тенденция к переоценке классических методов интенсификации сельскохозяйственной деятельности (Busby *et al.*, 2017). Это обуславливает необходимость поиска альтернативных стратегий обеспечения растений азотом, среди которых бобово-ризобиальный симбиоз занимает особое место.

Бобово-ризобиальный симбиоз представляет собой сложную многоуровневую систему взаимодействий, где каждый компонент играет важную роль. Генотипическая совместимость партнеров определяет успех как начального этапа взаимодействия, включая способность к распознаванию, колонизации и формированию клубеньков (Ivanova *et al.*, 2015; Serova *et al.*, 2018), так и последующих этапов, связанных непосредственно с фиксацией атмосферного азота и обменом веществами между партнерами (Sagan *et al.*, 1993; Suganuma *et al.*, 1993; Накоуама *et al.*, 2012). При этом различные виды Бобовых проявляют разную степень специфичности к своим симбионтам, что влияет на успешность симбиоза (Andrews, Andrews, 2017).

Экологические факторы также выступают значимым компонентом, определяя эффективность взаимодействия партнеров. Абиотические и биотические факторы оказывают существенное влияние на формирование и функционирование бобово-ризобиального симбиоза. В частности, высокие концентрации NaCl негативно влияют на формирование клубеньков (Nitawaki *et*

al., 2021; Nitawaki *et al.*, 2024), неблагоприятные температурные условия замедляют процесс колонизации (Zahran, 1999), снижают азотфиксирующую активность симбиоза, провоцируют старение симбиотического клубенька (Kitaeva *et al.*, 2023; Serova *et al.*, 2023), повышенная кислотность или щелочность почвы оказывают отрицательное воздействие на формирование симбиоза (Munns, 1986; Zahran, 1999). Кроме этого, ризосферные микроорганизмы формируют микробное сообщество в прикорневой зоне, которое способно регулировать формирование симбиоза (Poole *et al.*, 2018).

Бобово-ризобиальный симбиоз представляет собой динамичную систему, где генетические и экологические факторы тесно переплетаются, формируя сложную сеть взаимодействий (Mendoza-Suárez *et al.*, 2021). Симбиотическая совместимость, характеризующая действие всех этих факторов, выступает ключевым звеном, связывающим их с непосредственным результатом — эффективным или неэффективным симбиозом.

Практическая значимость исследований симбиотической совместимости заключается в возможности использования полученных данных для селекции эффективных штаммов ризобий, создания устойчивых симбиотических систем, разработки биоудобрений нового поколения, повышения продуктивности бобовых культур. Особую актуальность приобретает изучение новых штаммов ризобий, таких как *R. laguerreae*, которые демонстрируют высокую эффективность в симбиозе с бобовыми культурами и могут служить перспективными кандидатами для создания инокулятов (Flores-Félix *et al.*, 2020).

Изучение симбиотической совместимости является фундаментальной научной задачей, решение которой имеет важное прикладное значение для совершенствования агротехнологий и обеспечения продовольственной безопасности в рамках концепции устойчивого развития.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал и бактериальные штаммы

В настоящем исследовании были использованы семена гороха посевного (*Pisum sativum* L.) коммерческих сортов Frisson, Rondo и лабораторной линии SGE (Kosterin, Rozov, 1993).

Штаммы *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026 (Afonin *et al.*, 2017), *Rhizobium johnstonii* 3841 (Young *et al.*, 2023) (получены из Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ), г. Санкт-Петербург, Россия), и *Rhizobium laguerreae* AMPS04, AMPS05, AMPS17, AMPS22, AMPS23, AMPS34 (Flores-Félix *et al.*, 2020) (получены из коллекции Университета Саламанки, г. Саламанка, Испания) использовались для инокуляции. Штаммы *Rhizobium laguerreae* AMPS были выделены из клубеньков гороха в Альдеа-де-Сан-Мигель (провинция Вальядолид) в Испании и идентифицированы с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) и анализа последовательностей генов 16S рРНК, *recA* и *atpD*.

Для приготовления инокулюма бактерии выращивались на твердой среде с триптоном и дрожжевым экстрактом TY (Beringer, 1974) при температуре 28°C без антибиотиков или с добавлением стрептомицина 600 мкг/л (для штаммов *R. ruizarguesonis* RCAM1026 и *R. johnstonii* 3841).

2.2. Секвенирование и сборка геномов

Для выделения ДНК каждый штамм выращивали на твердой среде TY и инкубировали в течение 72 ч при 28°C. ДНК выделяли с помощью набора для очистки геномной ДНК Monarch Genomic DNA Purification Kit T3010L (New England Biolabs, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Секвенирование по технологии Oxford Nanopore Technologies (ONT) было проведено на базе ресурсного центра «Геномные технологии, протеомика и

клеточная биология» ВНИИСХМ. Для подготовки библиотек в соответствии с инструкциями производителя использовали протокол с нативным ДНК штрихкодированием 1D (SQK-LSK109 с EXP-NBD104 и EXP-NBD114) (Oxford Nanopore, Великобритания). Секвенирование проводили на устройстве MinION (Oxford Nanopore) с ячейкой R.9.4.1. Распознавание азотистых оснований, и демультимплексирование выполнялись с использованием программы Guppy верс. 5.0.1. Контроль качества первичных прочтений осуществлялся с помощью NanoPlot (De Coster *et al.*, 2018) верс. 1.41.0.

Геномы были собраны *de novo* с помощью Flye (Kolmogorov *et al.*, 2019) верс. 2.9.1 на основе первичных прочтений с опцией (*--nano-raw*). Дальнейшая коррекция сборки была выполнена с использованием medaka (Wright, Wykes, 2017) верс. 1.7.2. Для оценки статистики сборки использовался инструмент оценки сборки генома QUAST (Gurevich *et al.*, 2013) верс. 5.2.0. Полнота генома была установлена с помощью BUSCO (Manni *et al.*, 2021a; Manni *et al.*, 2021b) верс. 5.5.0. со следующими параметрами: (*--mode 'geno' --lineage_dataset 'rhizobium-agrobacterium_group_odb10'*). Параметры по умолчанию использовались для всего перечисленного программного обеспечения, если не указано иное.

Все последовательности были помещены в GenBank и аннотированы с использованием конвейера аннотирования прокариотических геномов NCBI PGAP (Tatusova *et al.*, 2016) верс. 6.6.

2.3. Вычисление идентичности нуклеотидных последовательностей и реконструкция филогении по данным полных геномов

Полногеномные сборки штаммов *R. laguerreae* AMPS04 (GCA_036964765.1), AMPS05 (GCA_036964845.1), AMPS17 (GCA_036964825.1), AMPS22 (GCA_036964745.1), AMPS23 (GCA_036964785.1), AMPS34 (GCA_036967165.1) (Kirichuk *et al.*, 2024a), а также репрезентативные геномы каждого генотипа Rlc, предложенные П. Янгом и соавторами (Young *et al.*, 2021) были отобраны для анализа. Кроме того, к

анализу был также добавлен штамм *Rhizobium acaciae* 1AS11T (GCF_025941625.1) (Hsouna *et al.*, 2023). Фрагменты каждой сборки генома были разделены на хромосомные и нехромосомные (принадлежащие плазмидам) последовательности (контиги, от англ. contiguous) с использованием метода, реализованного П. Янгом и соавторами (Young *et al.*, 2021).

Сходство геномов определяли по средней идентичности нуклеотидов (ANI) и средней идентичности нуклеотидов ортологов (OrthoANI) (Lee *et al.*, 2016) для хромосомных и нехромосомных последовательностей отдельно. Для расчета значений ANI и OrthoANI использовался инструмент OAT (Lee *et al.*, 2016) верс. 0.93.1 от CJ Bioscience. Кроме того, структуры филогенетических деревьев были проанализированы с использованием онлайн-инструментов NDtree (Joensen *et al.*, 2014; Leekitcharoenphon *et al.*, 2014) верс. 1.2 и REALPHY (Bertels *et al.*, 2014) верс. 1.13.

2.4. Выращивание растений в контролируемых условиях

Семена растений гороха стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 15 мин при комнатной температуре, промывали стерильной водой 10 раз и проращивали в чашках Петри на смоченной водой стерильной фильтровальной бумаге при температуре 28°C. Затем проростки инокулировали 1 мл водной суспензии одного из анализируемых штаммов ризобий (10^7 – 10^8 клеток на проросток). Для предотвращения перекрестного заражения исследуемые растения выращивали в стерильных контейнерах TP5000 с фильтрами (SacO2, Бельгия), заполненных стерильным песком, или в горшках со стерильным вермикулитом. Субстрат увлажняли питательным раствором FP (Fåhraeus, 1957) без добавления азота состава:

- макроэлементы ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 4,8 г/л; KH_2PO_4 — 1,6 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,4 г/л) — 50 мл/л;
- микроэлементы (H_3BO_3 — 0,692 г/л; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,04 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,188 г/л; $\text{Mg}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,048 г/л) — 5 мл/л;

- NaFeEDTA (3,67 г/л) — 5 мл/л;
- CaCl₂·2H₂O (19,992 г/л) — 5 мл/л.

Растения выращивались в вегетационной камере MLR-352H (Sanyo Electric Co., Япония), в контролируемых условиях: цикл день/ночь — 16/8 ч; температура — 21°C; влажность — 75%; освещенность — 280 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹). Клубеньки собирали на 21-й день после инокуляции (дпи).

2.5. Моделирование природных условий

Для исследования влияния факторов окружающей среды на симбиотическую совместимость в системе *R. laguerreae* – горох посевной, семена стерилизовали, проращивали и инокулировали способом, аналогичным описанному ранее (см. пункт 2.4.). Растения выращивали в стерильном песке, увлажненном питательным раствором FP (Fåhræus, 1957) без азота, в вегетационном домике на территории ВНИИСХМ (г. Санкт-Петербург) летом 2022 года в условиях динамически изменяющегося температурного режима. В соответствии с данными архива www.world-weather.ru, средняя дневная температура воздуха в Пушкинском районе Санкт-Петербурга в июне 2022 года составляла 21°C, а ночная — 12°C. Клубеньки были собраны на 21-й дпи.

2.6. Просвечивающая электронная микроскопия[†]

Для электронной микроскопии клубеньки, выращенные в контролируемых условиях, фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США) в 0,1 М фосфатном буфере PBS (pH 7,2). Для лучшего проникновения фиксатора с одной стороны клубенька делался скользящий надрез. Для обеспечения надлежащей фиксации воздух откачивался из тканей в течение 7 мин при давлении –0,9 бар с помощью вакуумного насоса VacuuBrand ME 1C (Vacuubrand, Германия) 5 раз. После 16 ч фиксации при комнатной температуре образцы пост-фиксировали в 2% растворе тетроксидом осмия и помещали в

[†] Данные исследования проведены совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ д.б.н. А.В. Цыгановой

Eponate 12 (Ted Pella Inc., США). С помощью алмазного ножа (Diatome, Швейцария) на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия) были вырезаны ультратонкие срезы толщиной 90–100 нм и собраны на медные сеточки, покрытые формваром. Срезы окрашивали 2% водным раствором уранилацетата с последующим добавлением цитрата свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Ткани клубеньков исследовали и фотографировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL-1400 (JEOL Corporation, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

2.7. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Для лазерной сканирующей конфокальной микроскопии клубеньки фиксировали в растворе фиксатора (3% формальдегида, 0,25% глутарового альдегида, 0,1% Tween-20, 0,1% Triton X-100) в 1/4 буфера MTSB (50 мМ PIPES, 5 мМ MgSO₄·7H₂O и 5 мМ EGTA, pH 6,9) (Kitaeva *et al.*, 2016). Для обеспечения надлежащей фиксации воздух откачивался из тканей в течение 7 мин при давлении –0,9 бар с помощью вакуумного насоса VacuuBrand ME 1C (Vacuubrand) 5 раз. Затем срезы толщиной 50 мкм получали на микротоме с вибрирующим лезвием HM 650V (Thermo Fisher Scientific, США). Для идентификации ядер и бактерий срезы окрашивали йодидом пропидия 0,5 мкг/мл в течение 7 мин. После промывки срезы помещали на предметные стекла и выдерживали в заливочном растворе ProLong™ Gold Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific). Образцы анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss, Германия) с использованием PI-фильтра (возбуждение 530–585 нм; эмиссия 615 нм) и программного обеспечения ZEN 2009 (Carl Zeiss).

2.8. Иммуноцитохимический анализ

Для проведения иммуноцитохимических исследований клубеньки после сбора были перенесены в 2,5% раствор глутарового альдегида (Sigma-Aldrich) в 0,1 М PBS (pH 7,2). Для лучшего проникновения фиксатора с одной стороны

клубенька делался скользящий надрез. Для обеспечения надлежащей фиксации воздух откачивался из тканей в течение 7 мин при давлении $-0,9$ бар с помощью вакуумного насоса VacuuBrand ME 1C (Vacuubrand) 5 раз. После 16 ч фиксации при комнатной температуре клубеньки были проведены по серии спиртов возрастающей концентрации (30 мин в 50% этаноле при -20°C , по 30 мин в 70%, 90% и 98% этаноле при -35°C), далее пропитаны по 1 ч при -20°C в трех смесях акриловой смолы London Resin White (Sigma-Aldrich) и этанола в соотношении 1:1, 2:1 и 3:1 соответственно, затем в чистой смоле в течение 20 ч при -20°C . Полимеризация проводилась с использованием катализатора бензоинметилэфира (Polysciences Europe, Германия) в автоматической станции для криозамещения воды и полимеризации блоков с использованием УФ излучения Leica EM AFS2 (Leica Microsystems) при -20°C в течение 24 ч и в дальнейшем в течение 16 ч при комнатной температуре.

Для иммунофлуоресцентной микроскопии полутонкие срезы (1 мкм), полученные на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems), были помещены на стекла. После блокирования в блокирующем буфере (5% бычий сывороточный альбумин (BSA), 0,1% желатин кожи рыб, 1% нормальная козья сыворотка в T/Ca/S буфере (20 мМ Tris-HCl, 0,5 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl, pH 8,0)) (Haas *et al.*, 2020) в течение 30 мин, срезы были несколько раз промыты в 3% растворе BSA в T/Ca/S и проинкубированы с первичными антителами (Таблица 1) в течение 1 ч при 37°C . После промывания в 3% растворе BSA срезы инкубировались со вторичными козьими антителами к соответствующему гамма-глобулину IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) в разведении 1:300 в 3% растворе BSA в T/Ca/S в течение 1 ч при 37°C . Срезы промывали в T/Ca/S 3 раза по 10 мин и помещали в заливочную среду ProLong™ Gold Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific). Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss) с использованием FITC-фильтров (возбуждение 465–495 нм; эмиссия 515–555 нм) и фотографировали с помощью цифровой камеры AxioCam 506 (Carl Zeiss).

Таблица 1 — Первичные антитела, используемые в работе

Антитело	Разведение	Антиген	Животное	Ссылка
JIM5	1:25	Частично метил-этерифицированный гомогалактуронан (ГГ) α -MeGalA ₍₂₎ -(1→4)- α -GalA ₍₃₎ -(1→4)- α -MeGalA	Крыса	VandenBosch <i>et al.</i> (1989); Knox <i>et al.</i> (1990)
JIM7	1:25	Высоко метил-этерифицированный ГГ α -GalA-(1→4)- α -MeGalA ₍₄₎ -(1→4)- α -GalA	Крыса	Knox <i>et al.</i> (1990)
LM19	1:5	Де-этерифицированный ГГ α -GalA-(1→4) ₍₄₎	Крыса	Verhertbruggen <i>et al.</i> (2009)
LM20	1:5	Высоко метил-этерифицированный ГГ α -MeGalA-(1→4) ₍₄₎	Крыса	Verhertbruggen <i>et al.</i> (2009)
2F4	1:10	Димерная ассоциация пектиновых цепей через ионы Ca ²⁺	Крыса	Liners <i>et al.</i> (1989); Liners <i>et al.</i> (1992)
CCRC-M35	1:10	Рамногалактуронан I (остов)	Мышь	Pattathil <i>et al.</i> (2010)
LM5	1:25	Рамногалактуронан I (линейный 1,4- β -D-галактан)	Крыса	Jones <i>et al.</i> (1997)
LM6-M	1:5	Рамногалактуронан I (линейный 1,5- α -L-арабинан)	Крыса	Cornuault <i>et al.</i> (2017)
CCRC-M1	1:10	Фукозилированный ксилогликан	Мышь	Puhlmann <i>et al.</i> (1994)
LM2	1:10	Арабиногалактановый белок	Крыса	Smallwood <i>et al.</i> (1996); Yates <i>et al.</i> (1996)
MAC265	1:10	Гликопротеины матрикса инфекционной нити	Крыса	VandenBosch <i>et al.</i> (1989)
MAC300	1:1	Липополисахарид специфичный для свободноживущего штамма <i>R. johnstonii</i> 3841	Крыса	Kannenberg <i>et al.</i> (1992)
MAC301	1:1	Клубенек-специфичный липополисахарид штамма <i>R. johnstonii</i> 3841	Крыса	Kannenberg <i>et al.</i> (1992)
JIM32	1:1	Липополисахариды штамма <i>R. johnstonii</i> 3841	Крыса	Lucas <i>et al.</i> (1996)

Специфичность иммунофлуоресцентной метки проверяли с помощью нескольких отрицательных контролей. Отрицательные контроли обрабатывали либо неспецифичным вторичным антителом, либо специфичным вторичным антителом с обработкой сывороткой без первичного антитела.

2.9. Гистохимическое выявление суберина и каллозы

Локализацию отложений суберина и каллозы проводили аналогично тому, как описано ранее для клубеньков гороха (Ivanova *et al.*, 2015). Для выявления отложений суберина полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали 0,5% толуидиновым синим в TBS буфере (pH 7,4) в течение 45 мин, промывали 3 раза по 10 мин в TBS, затем окрашивали 0,1% нейтральным красным в 0,1 М K_2HPO_4 (pH 6,5) в течение 1 мин (Lulai, Morgan, 1992), промывали 3 раза дистиллированной водой в течение 10 мин, а затем наносили заключающую среду для защиты от выцветания ProLong™ Gold Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific).

Для выявления отложений каллозы срезы окрашивали раствором 0,1% анилинового синего в фосфатном буфере (pH 8,0) в течение 60 мин (Currier, Strugger, 1956), 3 раза промывали в течение 10 мин в фосфатном буфере, и также заключали в ProLong™ Gold Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific).

Изображения были получены с помощью микроскопа Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss) с использованием фильтра DAPI (возбуждение 365нм; эмиссия 445нм/50нм).

2.10. Фенотипический анализ и оценка содержания питательных веществ

Параметры роста растений анализировали для сорта Rondo; для каждого варианта инокуляции было собрано по 15 растений. Растения выращивали в стерильном вермикулите, увлажненном питательным раствором FP (Fåhræus, 1957) без добавления азота, в камере для выращивания в контролируемых условиях, как уже было описано выше (см. пункт 2.4.). Анализ проводился на 42-й дни.

Для измерения веса семядоли удаляли, отделяли побеги и сушили в сушильном шкафу Memmert UF160 (Mettler GmbH, Германия) при температуре 55°C. После измерения веса, высушенные побеги измельчали в порошок. Общее содержание азота в образцах определяли с помощью

автоматической дистилляционной установки Kjeltec 8200 (FOSS Analytical, Дания).

2.11. Статистический анализ

Анализ данных проводился с использованием пользовательских скриптов на языках программирования Python и R. Для фенотипического анализа и определения общего содержания азота статистически значимые различия оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (критерий Краскела-Уоллиса) и определяли с помощью теста Даннетта T3 (Dunnett, 1980) с использованием библиотеки языка R PMCMRplus (Pohlert, 2024) верс. 1.9.10.

2.12. Транскриптомный анализ клубеньков[‡]

Для транскриптомного анализа растения сорта Rondo проращивали и инокулировали как описанно ранее (см. пункт 2.4.). Для секвенирования РНК из клубеньков, инокулированных AMPS04 и AMPS05, последние отделяли от корней на льду и замораживали в жидком азоте. Клубеньки растирали с помощью ступки с пестиком в жидком азоте до состояния порошка. Тотальную РНК выделяли с использованием набора HiPure Plant RNA Mini Kit (Magen, Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Очистку выделенной РНК и обработку ДНКазой проводили с помощью RNA Clean and Concentrator – 5 (Zymo Research, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию извлеченной РНК измеряли с помощью Qubit 4.0 (Invitrogen, США). Подготовка библиотек и секвенирование РНК осуществлялись компанией CeGaT GmbH (Германия) с использованием набора TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero (Illumina, США) на приборе NovaSeq X Plus (Illumina).

Демультимплексирование результатов секвенирования было выполнено с помощью Illumina bcl2fastq верс. 2.20. Адаптеры обрезали с помощью Skewer (Jiang *et al.*, 2014) верс. 0.2.2. Качество было проанализировано с помощью

[‡] Данное исследование проведено совместно с научным сотрудником лаборатории молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ к.б.н. П.Г. Кусакиным

FastQC (Andrews, 2010) верс. 0.11.5-cegat. Прочтения были сопоставлены с эталонным геномом *P. sativum* CAAS Psat ZW6 1.0 (GCF_024323335.1) с использованием программного обеспечения STAR (Dobin *et al.*, 2012) верс. 2.7.11a и количественно оценены с помощью featureCounts (Liao *et al.*, 2014) верс. 2.0.6. Для анализа дифференциальной экспрессии генов использовали DESeq2 (Love *et al.*, 2014) верс. 1.42.1 с тестом Вальда (p -значение $\leq 0,05$; модуль \log_2 кратности изменений ($|\log_2 \text{fold change}| > 2$). Для отображение графической сводки функциональной информации полученные данные анализировали по средствам запросов к интегрированной базе данных DAVID (Dennis *et al.*, 2003). Кластеры функциональной аннотации выделяли, используя параметры: совпадение терминов (Similarity Term Overlap) = 3; порог сходства (Similarity Threshold) = 1; остальные параметры были установлены по умолчанию.

Для определения дифференциально экспрессируемых генов, кодирующих активные в отношении углеводов ферменты с внеклеточной локализацией, программное обеспечение dbCAN3 (Zheng *et al.*, 2023) верс. 4.1.4 использовалось в анализе белковых последовательностей эталонной сборки *P. sativum* для получения аннотаций в соответствии с базой данных CAZY (GHs, гликозидгидролазы; GTs, гликозилтрансферазы; PLs, полисахарид лиазы; CEs, эстеразы углеводов; AAs, вспомогательные активности) (Cantarel *et al.*, 2008; Drula *et al.*, 2022) вместе с DeepLoc 2.0 (Thumuluri *et al.*, 2022) для прогнозирования локализации. Список дифференциально экспрессируемых генов был отфильтрован, чтобы включить только записи с аннотацией CAZY (предоставленной несколькими инструментами в dbCAN3) и внеклеточной локализацией. Классификация возможных гликопротеинов, богатых гидроксипролином (HRGP), в эталонном геноме гороха была получена с использованием SignalP 6.0 (Teufel *et al.*, 2022), пакета ragp R (Dragićević *et al.*, 2019) верс. 0.3.5.9, конвейера МААВ (Johnson *et al.*, 2017) и сервера NetGPI (Gíslason *et al.*, 2021) верс. 1.1. Последовательности, содержащие менее 3 прогнозируемых гидроксипролинов, были отфильтрованы и исключены из анализа.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ филогенетических связей между штаммами *Rhizobium laguerreae*

Хорошо известно, что среди совместимых штаммов ризобий, даже принадлежащих к одному и тому же комплексу видов, некоторые более успешны в индукции клубеньков, чем другие (Batstone *et al.*, 2017; Voivin *et al.*, 2020; Voivin *et al.*, 2021). Это предпочтение в ассоциации с хозяином зависит как от генотипа растения, так и бактерий (Voivin *et al.*, 2021; Fagorzi *et al.*, 2021).

В результате проведенного секвенирования третьего поколения с использованием технологии ONT для каждого штамма были получены «сырые» прочтения (Таблица 2). Восстановление последовательности ДНК происходило путем *de novo* сборки, в результате чего для каждого штамма было сформировано от 5 до 8 контигов, а полнота сборок составила от 93,5% до 97% (Таблица 2). Полученные полногеномные сборки были помещены в NCBI GenBank с кодом доступа биопроекта [PRJNA1079530](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1079530) (Kirichek *et al.*, 2024a). Внутренний анализ качества NCBI показал, что штаммы AMPS04, AMPS17 и AMPS23 прошли проверку таксономии, а штаммы AMPS05, AMPS22 и AMPS34 получили отметку «неокончательный» (от англ. inconclusive), так как сходство с ближайшим типовым штаммом составило менее 96% ANI.

Согласно Genome Taxonomy Database (GTDB) штаммы AMPS04, AMPS17, AMPS23, AMPS05 и AMPS34 получили таксономический статус *Rhizobium laguerreae*, а штамм AMPS22 — *Rhizobium leguminosarum* *Q*.

Таблица 2 — Характеристика геномных сборок штаммов *Rhizobium laguerreae*

Штамм	AMPS04	AMPS05	AMPS17	AMPS22	AMPS23	AMPS34
N₅₀ для прочтений (п.о.)	7 668	9 494	8 538	16 124	6 804	15 205
Кол-во «сырых» прочтений	69 285	35 261	51 539	61 292	87 548	52 250
Покрытие	49x	29x	40x	65x	55x	60x
Кол-во контигов	5	8	5	6	6	6
Общая длина (п.о.)	7 008 475	7 522 422	6 854 799	7 335 478	7 260 096	7 371 118
N₅₀ для сборки (п.о.)	4 933 869	4 944 891	4 861 011	4 855 452	4 883 801	4 869 780
GC (%)	60,79	60,75	60,86	60,87	60,71	60,75
Число генов	6 847	7 314	6 758	7 112	7 131	7 151
Число РНК генов	60	61	60	60	61	61
Полнота сборки (%)	97	94,1	96,2	95,8	97,5	93,5
Код доступа NCBI	GCA_036_964765.1	GCA_036_964845.1	GCA_036_964825.1	GCA_036_964745.1	GCA_036_964785.1	GCA_036_967165.1

Чтобы поместить анализируемые штаммы *R. laguerreae* AMPS в контекст глобального разнообразия ризобий в пределах Rlc, с использованием инструментов NDtree и REALPHY были созданы филогенетические деревья для последовательностей хромосом (Рисунок 10). Структура топологии дерева NDtree, построенная путем сопоставления последовательностей с геномом эталонного штамма *R. leguminosarum* USDA 2370^T (GCF_002008365.1), почти полностью согласуется со структурой, предсказанной при использовании REALPHY, запущенного с использованием алгоритма PhyML (Guindon *et al.*, 2010). Общая топология дерева была сохранена, за исключением незначительной разницы в расположении *Rhizobium* sp. JKLM12A2 (GCF_005862305.2). На обоих деревьях четко прослеживалась ветвь, представляющая кладу *R. laguerreae* (F-клада) (Young *et al.*, 2021), которая включала все проанализированные штаммы AMPS (Рисунок 10).

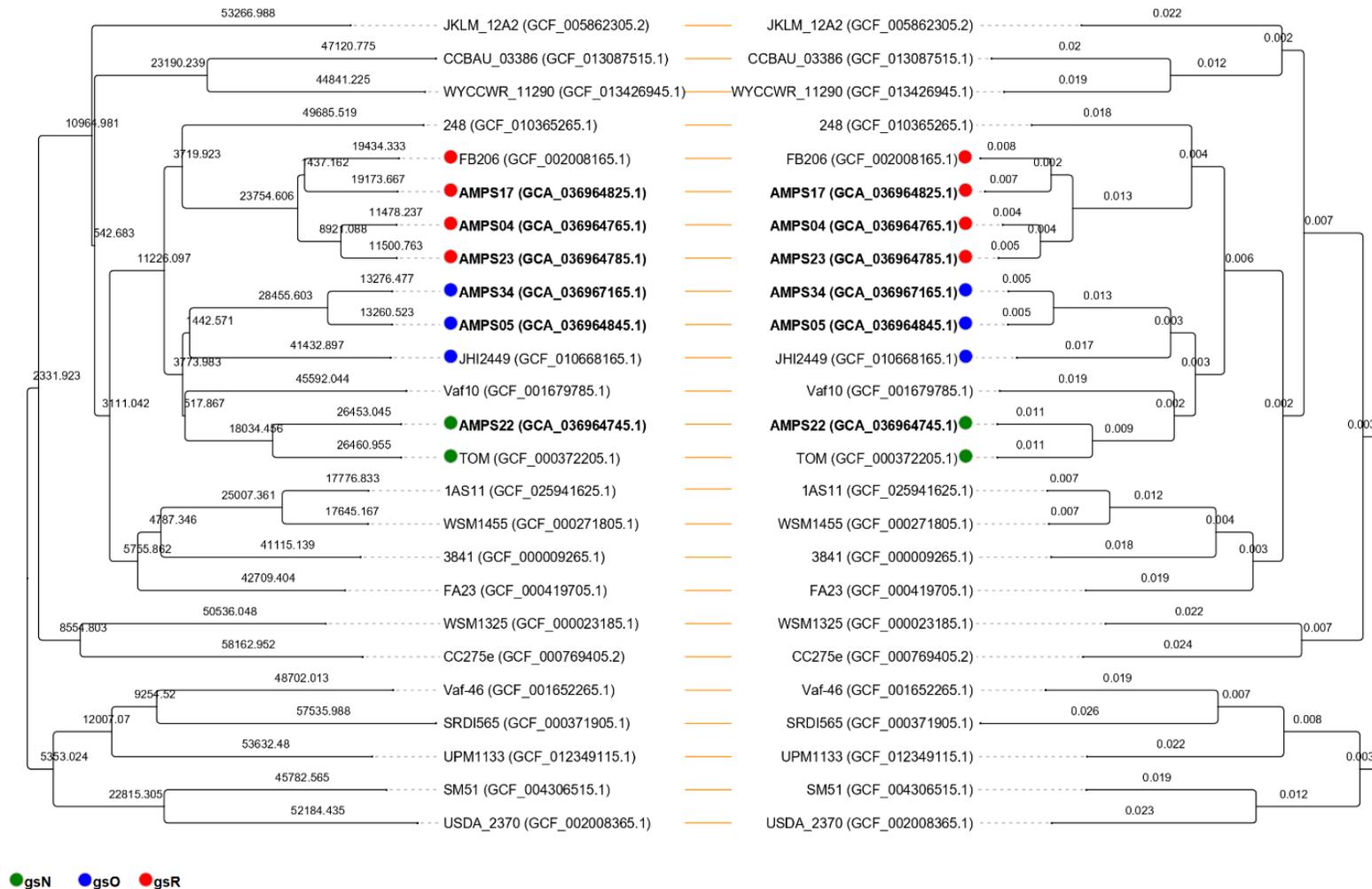


Рисунок 10 — Основанные на данных полногеномного секвенирования филогенетические деревья для хромосомных последовательностей штаммов *Rhizobium laguerreae* AMPS и представителей Rlc

Слева: дерево NDtree, значения над ветвями — нуклеотидные различия, вычисленные с помощью процедуры ND; справа: дерево REALPHY, значения над ветвями — количество нуклеотидных замен на каждый нуклеотид (Kirichek *et al.*, 2026).

Поскольку OrthoANI обеспечивает надежное и быстрое средство вычисления средней нуклеотидной идентичности для использования в таксономии (Lee *et al.*, 2016), этот инструмент был применен для анализа взаимосвязи между изучаемыми штаммами *R. laguerreae* и другими представителями Rlc (Рисунок 11). При сравнении значений ANI и OrthoANI для хромосомных последовательностей было установлено, что наиболее близкими к эталонному геному *R. laguerreae* FB206^T (GCF_002008165.1) (Saïdi *et al.*, 2014) были штаммы AMPS17, AMPS04 и AMPS23 (идентичность превышает 98%). Эти штаммы относятся к геновиду R и только они могут рассматриваться как *Rhizobium laguerreae sensu stricto*. Было показано, что штамм AMPS22 относится к геновиду N с идентичностью 97,34% ANI по отношению к эталонному представителю *R. leguminosarum* sv. *viciae* TOM (GCF_000372205.1) и демонстрируя 95,3% ANI с *R. laguerreae* FB206^T (GCF_002008165.1). Кроме того, наиболее близким родственным штаммом для AMPS05 и AMPS34 был *R. laguerreae* JHI2449 (GCF_010668165.1) из геновида O со значениями ANI 95,88% и значениями OrthoANI 96,19% и 96,09%, соответственно. По отношению к *R. laguerreae* FB206^T (GCF_002008165.1) данные штаммы имеют ~95,4% ANI.

Нехромосомные последовательности более однородны между анализируемыми штаммами AMPS и имеют наибольшее сходство с нехромосомными последовательностями представителя геновида R (от 95,64% до 98% идентичности с эталонными), за исключением штамма AMPS22. Нехромосомные последовательности штамма AMPS22, как и хромосомные, определяют его как представителя геновида N (Рисунок 11).

Разнообразие *R. laguerreae* обширно. Представители *R. laguerreae* распределены по нескольким геновидам в рамках Rlc, и обоснованность применения этого названия ко всем членам F-клады в настоящее время все еще обсуждается (Young *et al.*, 2021). Установленный П. Янгом и соавторами (Young *et al.*, 2021) порог ANI в 96% для разграничения представителей разных геновидов Rlc позволил разделить штаммы AMPS17, AMPS04, AMPS23 и AMPS22, отнести их к геновидам R и N, соответственно. В свою очередь, этот

порог неприменим для штаммов AMPS05 и AMPS34. Как хромосомные, так и нехромосомные контиги этих штаммов имеют значения ANI ниже 96% к референсным геномам. Оценка значений OrthoANI позволяет отнести эти два штамма к геновиду *O.*

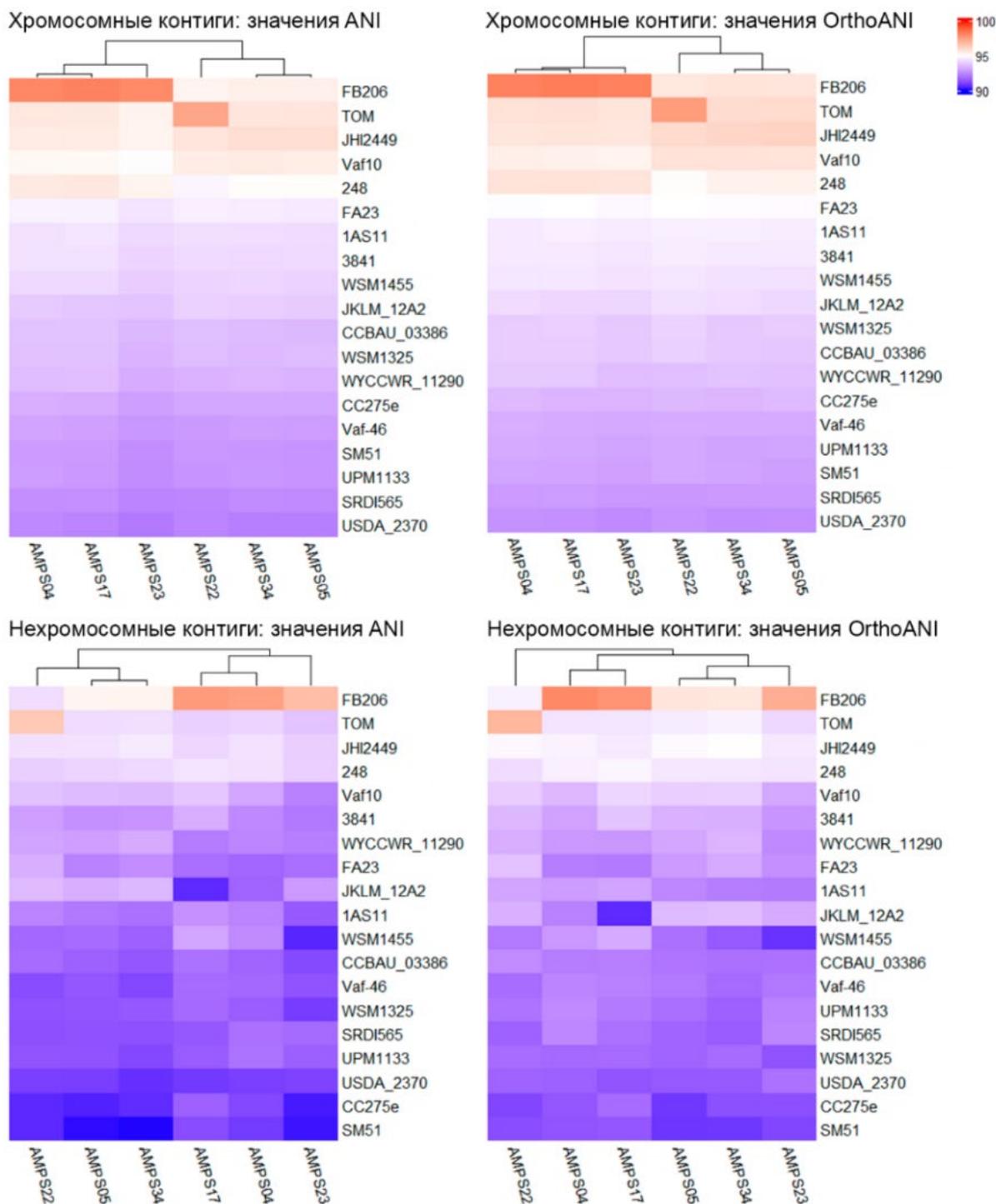


Рисунок 11 — Тепловая карта значений ANI и OrthoANI для хромосомных и нехромосомных последовательностей штаммов *Rhizobium laguerreae* AMPS и других представителей Rlc

Таким образом, видится целесообразным применять название *R. laguerreae* только к представителям геновида R (типовой штамм *R. laguerreae* FB206^T), а для штаммов прочих геновидов F-клады, во избежание путаницы, определить новые видовые названия и дать детальную характеристику.

3.2. Влияние генотипа хозяина

3.2.1. Фенотипы клубеньков и рост растений после инокуляции

Растения сорта Rondo, инокулированные предположительно эффективными штаммами *R. laguerreae* AMPS, показали признаки азотного голодания в некоторых вариантах инокуляции, при выращивании без добавления доступного азота (Kirichek *et al.*, 2026). Например, растения, инокулированные штаммом AMPS05, накапливали больше биомассы и содержали больше азота в побегах. И наоборот, общее содержание азота в побегах растений, инокулированных штаммами AMPS04 и AMPS23, существенно не отличалось от такового в контрольной группе без ризобияльной инокуляции. Содержание азота в побегах растений, инокулированных AMPS34, AMPS22 и AMPS17, статистически не отличалось от содержания азота в образцах, инокулированных штаммом *R. johnstonii* 3841, что указывает, по крайней мере, на частичную эффективность таких клубеньков (Рисунок 12).

Помимо сорта Rondo штаммами AMPS были инокулированы растения сорта Frisson и линии SGE. В некоторых комбинациях наблюдались клубеньки с зеленой или коричневой пигментацией и аномальной морфологией, некротические клубеньки, отсутствие клеточной колонизации или нарушения дифференцировки бактерий. Такие фенотипические проявления указывают на протекание в этих клубеньках защитных реакций. Характерные закономерности клубенькообразования и описание морфологии представлены в таблице ниже (Таблица 3).

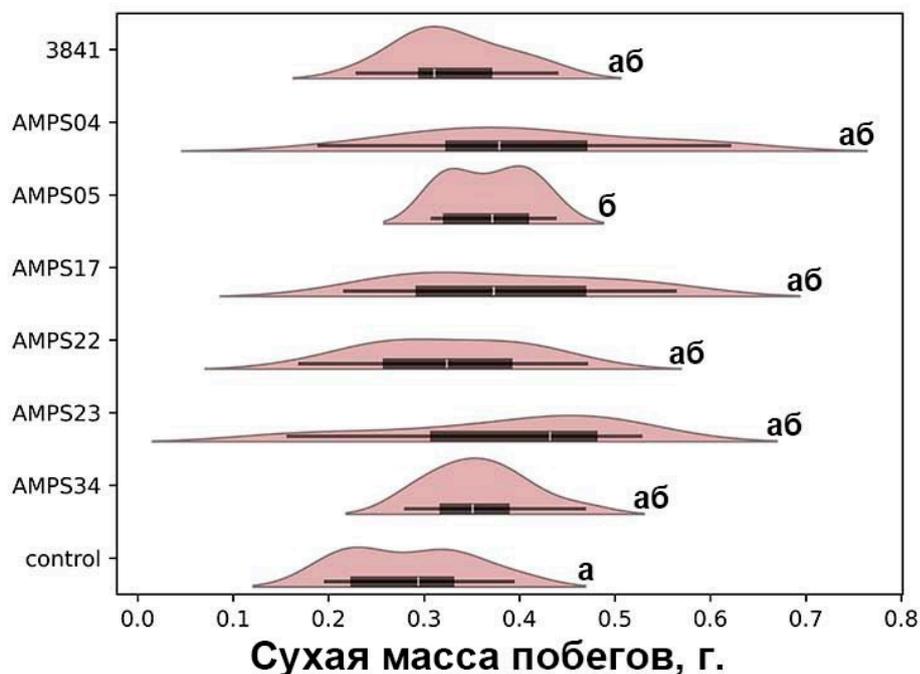
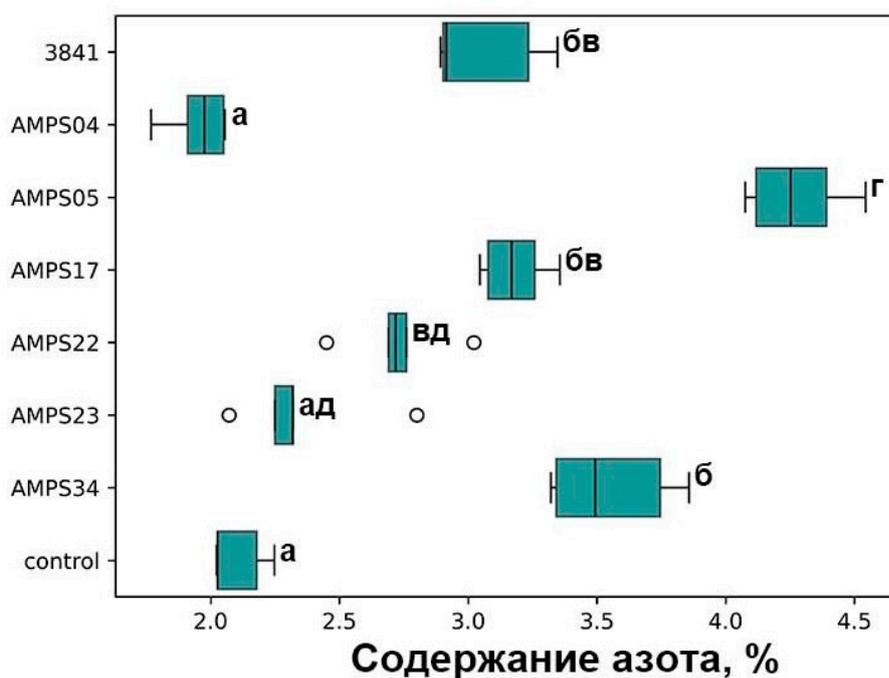
А**Б**

Рисунок 12 — Ростовые параметры растений гороха сорта Rondo

А — график зависимости массы сухих побегов (контрольные растения не инокулировались); Б — график зависимости накопления азота в побегах. Разные буквы возле гистограмм/диаграмм размаха указывают на значимые различия (p -значение $\leq 0,05$) в тесте Даннетта ТЗ.

Таблица 3 — Морфология клубеньков в зависимости от штамма *Rhizobium*, используемого при инокуляции

Генотип растения	Штамм	Фенотип клубеньков	Гистологическая структура
Rondo	<i>R. johnstonii</i> 3841	Удлиненные розовые	Типичная с признаками раннего старения
	<i>R. laguerreae</i> AMPS04	Округлые белые	Аномальная, отсутствие клеточной инфекции или спорадически инфицированные клетки
	<i>R. laguerreae</i> AMPS05	Удлиненные розовые	Типичная для недетерминированного клубенька
	<i>R. laguerreae</i> AMPS17	Слегка удлиненные зеленоватые или розоватые	Типичная с признаками неэффективности
	<i>R. laguerreae</i> AMPS22	Округлые белые и удлиненные розовые	Типичная с признаками неэффективности
	<i>R. laguerreae</i> AMPS23	Округлые белые	Аномальная, отсутствие клеточной инфекции или спорадически инфицированные клетки
	<i>R. laguerreae</i> AMPS34	Удлиненные зеленоватые или розоватые	Типичная с признаками неэффективности
SGE	<i>R. johnstonii</i> 3841	Удлиненные розовые	Типичная для недетерминированного клубенька
	<i>R. laguerreae</i> AMPS04	Округлые белые	Аномальная, «запертые» инфекционные нити
	<i>R. laguerreae</i> AMPS05	Удлиненные розовые	Типичная для недетерминированного клубенька
	<i>R. laguerreae</i> AMPS17	Округлые белые	Аномальная, «запертые» инфекционные нити
	<i>R. laguerreae</i> AMPS22	Округлые белые	Аномальная, отсутствие клеточной инфекции или спорадически инфицированные клетки
	<i>R. laguerreae</i> AMPS23	Округлые белые	Аномальная, дегенерация симбиотических структур
	<i>R. laguerreae</i> AMPS34	Слегка удлиненные белые	Типичная с признаками неэффективности
Frisson	<i>R. johnstonii</i> 3841	Удлиненные розовые	Типичная для недетерминированного клубенька
	<i>R. laguerreae</i> AMPS04	Округлые белые	Аномальная, отсутствие клеточной инфекции или спорадически инфицированные клетки
	<i>R. laguerreae</i> AMPS05	Удлиненные розовые	Типичная для недетерминированного клубенька
	<i>R. laguerreae</i> AMPS17	Слегка удлиненные белые или бледно-розоватые	Аномальная, увеличенная зона II, зона III сведена к единичным клеткам.
	<i>R. laguerreae</i> AMPS22	Округлые белые	Аномальная, отсутствие клеточной инфекции или спорадически инфицированные клетки
	<i>R. laguerreae</i> AMPS23	Округлые белые	Аномальная, отсутствие клеточной инфекции или спорадически инфицированные клетки
	<i>R. laguerreae</i> AMPS34	Округлые белые	Аномальная, отсутствие клеточной инфекции или спорадически инфицированные клетки

3.2.1.1. Инокуляция *Rhizobium johnstonii* 3841 (геновид В)

Анализ различных генотипов растений гороха, инокулированных штаммом *R. johnstonii* 3841, показал образование крупных розовых недетерминированных клубеньков (Рисунок 13А, Приложение А Рисунок 1А, Е) с тремя гистологическими зонами (Vasse *et al.*, 1990): зона I (меристема), зона II (зона инфекции) и зона III (зона азотфиксации) (Рисунок 13Б, Приложение А Рисунок 1Б, Ж). Выявленная структура типична для недетерминированных клубеньков *Fabaceae*. Кроме того, в клубеньках, образовавшихся на растениях сорта Rondo, также наблюдалась зона старения (зона IV) в дистальной части (Рисунок 13Б).

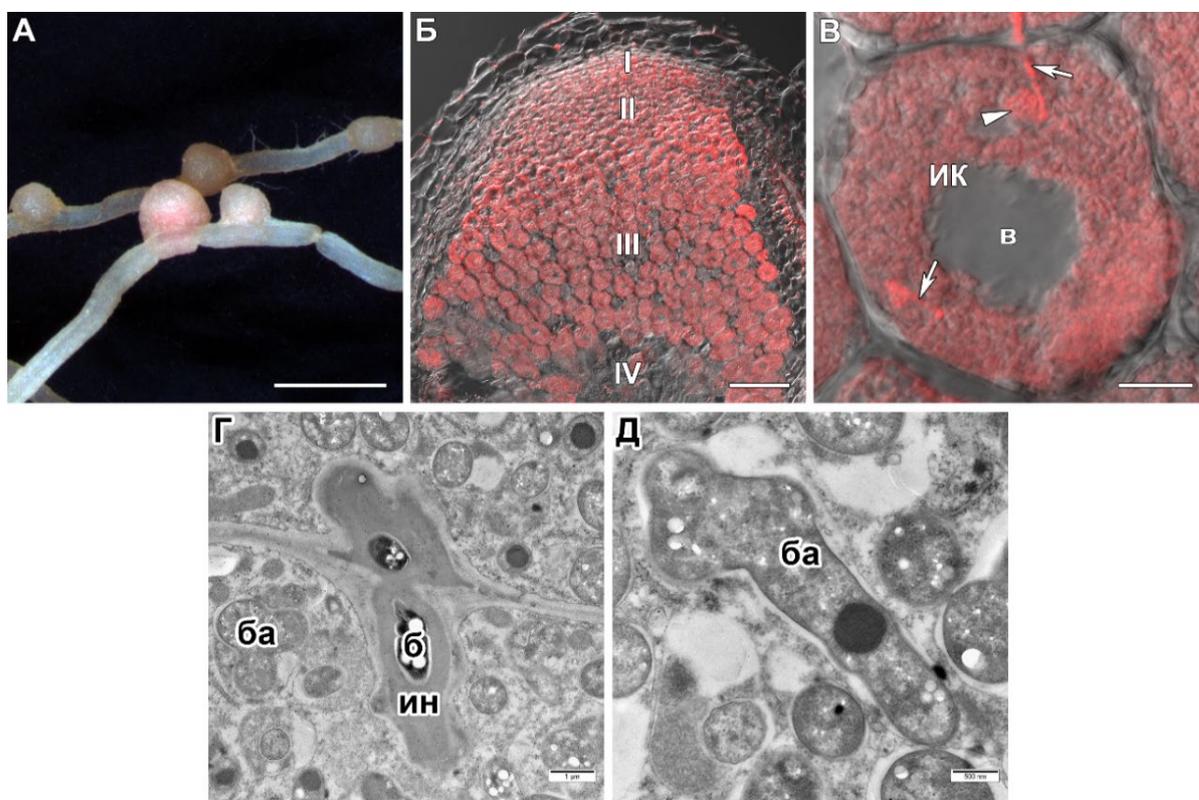


Рисунок 13 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных *Rhizobium johnstonii* 3841

А — общий вид корней. Б, В — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации, IV — зона старения. ИК — инфицированная клетка; стрелки указывают на инфекционные нити, наконечник стрелки — на инфекционную каплю. Г, Д — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; ба — бактериод; б — бактерия. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В — 10 мкм, Г, Д — масштаб указан под каждой линейкой.

Инфекционные нити в клубеньках имели типичную структуру с матриксом средней электронной плотности и стенкой, напоминающей клеточную стенку. Бактерии внутри инфекционных нитей имели палочковидную форму, матрикс повышенной электронной плотности с электронно-прозрачными каплями полигидроксibuтирата (Рисунок 13Г, Приложение А Рисунок 1Г, И). Зрелые инфицированные клетки были заполнены дифференцированными плеоморфными бактериоидами по отдельности окруженными симбиосомными мембранами (Рисунок 13В, Г, Приложение А Рисунок 1В, Г, З, И). У бактериоидов наблюдался матрикс средней электронной плотности с выраженными включениями с более высокой электронной плотностью (Рисунок 13Д, Приложение А Рисунок 1Д, К).

3.2.1.2. Инокуляция *Rhizobium laguerreae* AMPS22 (геновид N)

Штамм *R. laguerreae* AMPS22 индуцировал на растениях сорта Rondo клубеньки двух типов: округлые белые и удлиненные розоватые (Рисунок 14А). Редкие розоватые клубеньки, вероятно, характеризовались низким уровнем фиксации азота, о чем свидетельствуют признаки азотного голодания, такие как слабый рост растений, бледные и пожелтевшие листья. Проведённый анализ белых клубеньков выявил присутствие скопления инфицированных клеток, которые в некоторых случаях образовывали зону, подобную зоне азотфиксации (Рисунок 14Б, В).

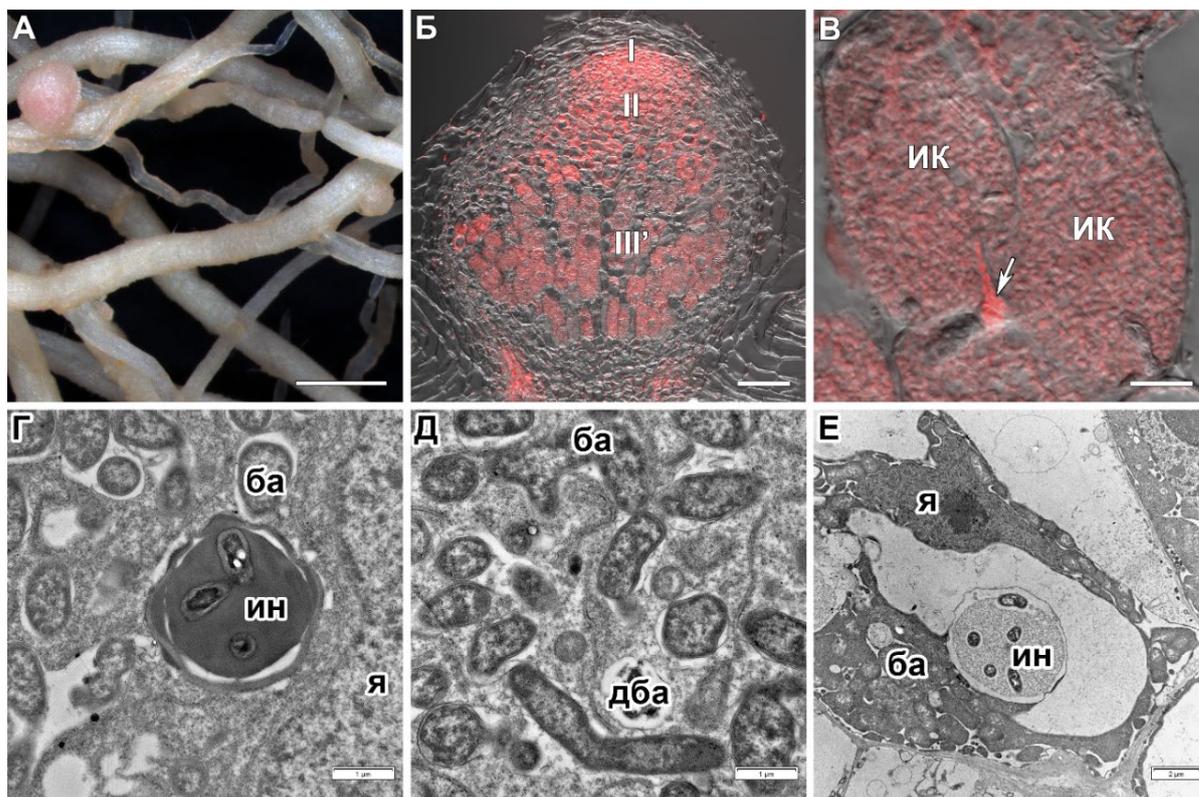


Рисунок 14 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных *Rhizobium laguerreae* AMPS22

А — общий вид корней. Б, В — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III' — зона, соответствующая зоне азотфиксации. ИК — инфицированная клетка; стрелка указывает на инфекционную нить. Г–Е — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; ба — бактериод; я — ядро; дба — дегенерирующий бактериод. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В — 10 мкм, Г–Е — масштаб указан под каждой линейкой.

Ультраструктурный анализ белых клубеньков показал, что инфекционные нити были окружены неровной фибриллярной стенкой и заполнены плотным матриксом (Рисунок 14Г), а каждая симбиосома содержала один дифференцированный плеоморфный бактериод (Рисунок 14Д). Однако по сравнению с клубеньками, индуцированными штаммом *R. johnstonii* 3841, бактериоды демонстрировали гетерогенный матрикс с различной электронной плотностью (Рисунок 14Д). Среди инфицированных клеток часто обнаруживались клетки с очень плотной цитоплазмой (Рисунок 14Е). Если такие клетки содержали инфекционные нити, наблюдалось их набухание с просветлением гранулярного матрикса (Рисунок 14Е).

На растениях линий SGE и сорта Frisson наблюдали формирование округлых белых клубеньков (Приложение А Рисунок 2А, Ж). В таких клубеньках были представлены только зоны I и II (Приложение А Рисунок 2Б, З). Несмотря на образование инфекционных нитей и капель в клубеньках обоих генотипов (Приложение А Рисунок 2В, И), выход бактерий происходил очень редко (Приложение А Рисунок 2И).

Электронно-микроскопическое исследование показало, что в клубеньках линии SGE и сорта Frisson стенки инфекционных нитей были сильно утолщенными, фибриллярными с повышенной электронной плотностью и часто образовывали различные выросты (Приложение А Рисунок 2Г, К). В клубеньках линии SGE выход ризобий из инфекционных нитей было редким, малодифференцированные бактериоиды собирались в мультибактероидные симбиосомы, в которых они быстро дегенерировали (Приложение А Рисунок 2Д). Иногда в цитоплазме обнаруживались липидные капли (Приложение А Рисунок 2Е). Симбиосомы с плеоморфными бактериоидами были сформированы в некоторых клубеньках у сорта Frisson (Приложение А Рисунок 2Л). В зоне инфекции эндоплазматический ретикулум инфицированных клеток с ювенильными бактериоидами часто подвергался вакуолизации (Приложение А Рисунок 2М).

3.2.1.3. Инокуляция *Rhizobium laguerreae* AMPS05 (геновид О)

Штамм *R. laguerreae* AMPS05 индуцировал на всех растениях крупные розовые клубеньки, подобные тем, что были описаны при инокуляции *R. johnstonii* 3841 (Рисунок 15А, Приложение А Рисунок 3А, Ж). Эти клубеньки имели морфологию, типичную для недетерминированных клубеньков, а все зоны выглядели нормальными (Рисунок 15Б, В, Приложение А Рисунок 3Б, В, З, И).

Ультраструктура клубеньков сорта Rondo, индуцированных штаммом *R. laguerreae* AMPS05, была типичной для недетерминированных клубеньков (Рисунок 15Г, Д). Однако, несмотря на отсутствие выраженной зоны старения, в

инфицированных клетках были обнаружены отдельные деградировавшие бактериоды (Рисунок 15Е).

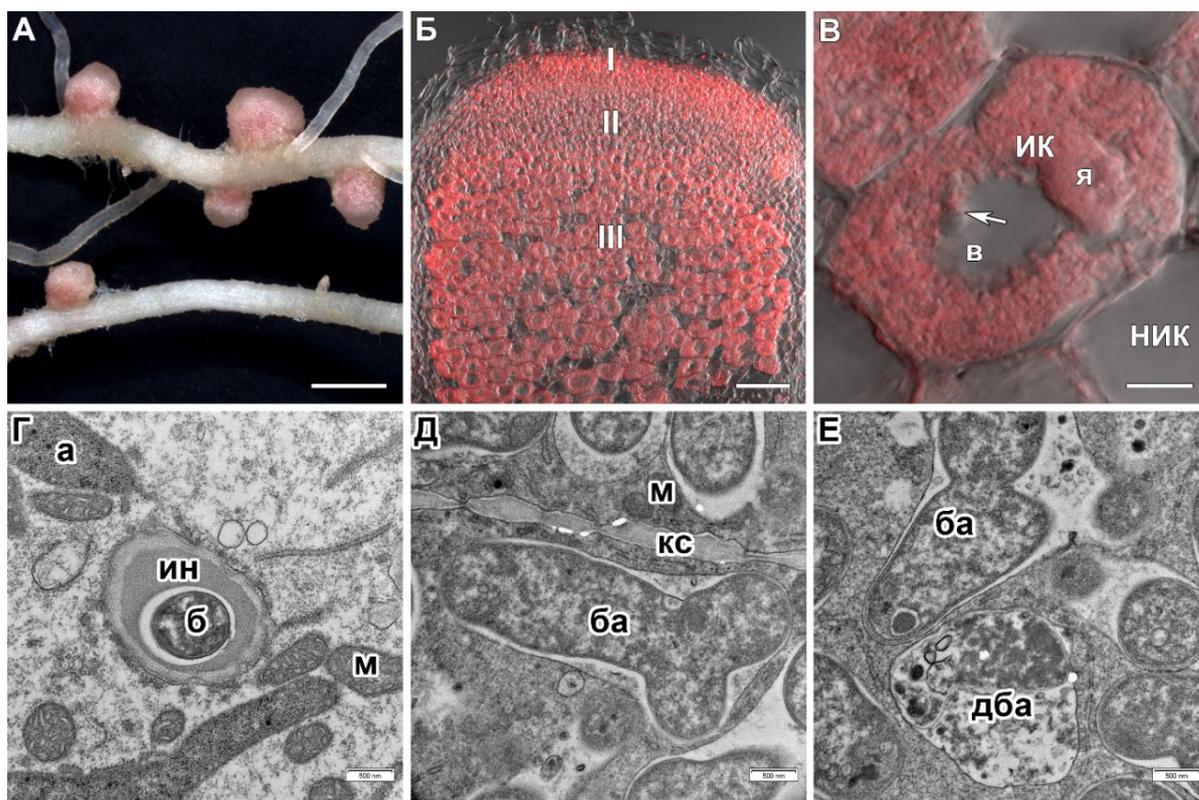


Рисунок 15 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных *Rhizobium laguerreae* AMPS05

А — общий вид корней. Б, В — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации. ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелка указывает на инфекционную нить. Г–Е — просвечивающая электронная микроскопия. а — амилопласт; б — бактерия; м — митохондрия; ин — инфекционная нить; ба — бактериод; кс — клеточная стенка; дба — дегенерирующий бактериод. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В — 10 мкм, Г–Е — масштаб указан под каждой линейкой.

Хотя на гистологическом уровне клубеньки линии SGE, индуцированные штаммом *R. laguerreae* AMPS05, выглядели типичными, на ультраструктурном уровне обращало на себя внимание присутствие дегенерировавших бактериодов в инфицированных клетках (Приложение А Рисунок 3Д). Другой аномальной особенностью таких клубеньков было обилие пероксисом в инфицированных клетках (Приложение А Рисунок 3Е). Однако инфекционные нити не отличались

от тех, которые образовывались в случае *R. johnstonii* 3841 (Приложение А Рисунок 3Г).

В клубеньках сорта Frisson с помощью электронно-микроскопического анализа было обнаружено утолщение стенок инфекционных нитей (Приложение А Рисунок 3К). Среди симбиосом, содержащих один плеоморфный бактериоид (Приложение А Рисунок 3Л), были также и мультибактероидные симбиосомы, содержащие до 6–8 слабо дифференцированных бактериоидов (Приложение А Рисунок 3М).

3.2.1.4. Инокуляция *Rhizobium laguerreae* AMPS34 (геновид О)

Гистологическая структура клубеньков, образовавшихся при инокуляции *R. laguerreae* AMPS34, варьировала в зависимости от генотипа растения. Слегка удлиненные зеленоватые или розоватые клубеньки, образовавшиеся на сорте Rondo, содержали три нормальные гистологические зоны, хотя отдельные неинфицированные клетки в зоне азотфиксации были плотно заполнены зернами крахмала (Рисунок 16А–В). Инфицированные клетки были заполнены симбиосомами с одним бактериоидом, но их плотность была низкой, и некоторые клетки содержали только отдельные симбиосомы (Рисунок 16В). В симбиосомах бактериоиды проявляли признаки дегенерации. Их матрикс имел неоднородную плотность, неправильный контур и просветы вдоль внутренних мембран (Рисунок 16Д). В то время как большинство инфекционных нитей имели типичную для гороха структуру (Рисунок 16Г), встречались инфекционные нити с утолщенными стенками, содержащими электронно-плотные гранулы в стенках и клеточный детрит в матриксе (Рисунок 16Е).

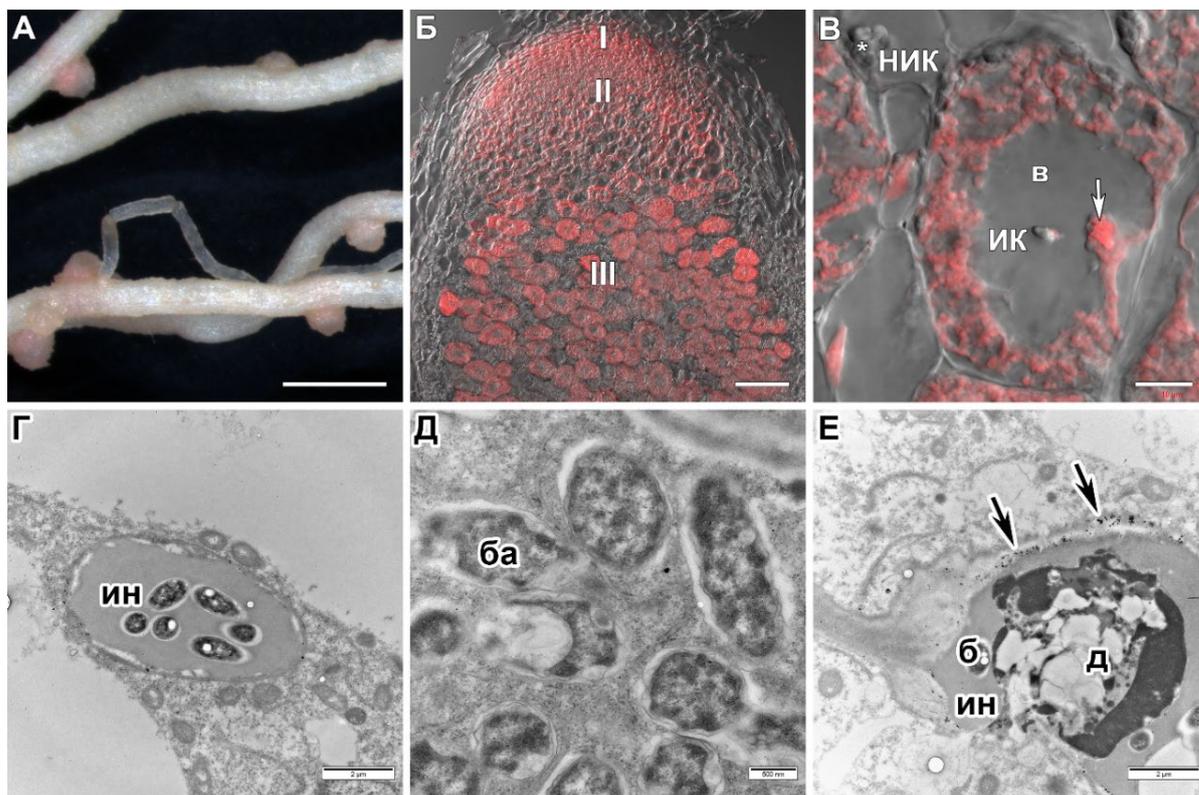


Рисунок 16 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных *Rhizobium laguerreae* AMPS34

А — общий вид корней. Б, В — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации. ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; в — вакуоль; стрелка указывает на инфекционную нить; белая звездочка (*) — гранулы крахмала. Г–Е — просвечивающая электронная микроскопия. б — бактерия; ин — инфекционная нить; ба — бактериод; д — детрит; черная стрелка — гранула. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В — 10 мкм, Г–Е — масштаб указан под каждой линейкой.

На линии SGE этот штамм индуцировал слегка удлиненные белые клубеньки (Приложение А Рисунок 4А). Гистологический анализ выявил образование трех уменьшенных в размерах гистологических зон, которые в некоторых клубеньках были еще менее выражены (Приложение А Рисунок 4Б). В зоне, соответствующей зоне азотфиксации, многие неинфицированные клетки были плотно заполнены крахмальными зернами (Приложение А Рисунок 4Б). На уровне световой микроскопии отмечалось, что бактериоды в инфицированных клетках имели необычную округлую форму (Приложение А Рисунок 4В). Согласно данным электронной микроскопии, бактериоды имели неправильную форму, неправильный контур и неравномерную плотность матрикса

(Приложение А Рисунок 4Д). Кроме того, в цитоплазме инфицированных клеток многочисленные пероксисомы соседствовали с симбиосомами (Приложение А Рисунок 4Е). Инфекционные нити часто образовывали выросты различной формы (Приложение А Рисунок 4Г).

Наконец, в белых клубеньках сорта Frisson (Приложение А Рисунок 4Ж), бактерии высвобождались из инфекционных капель, однако истинная зона азотфиксации не формировалась (Приложение А Рисунок 4З, И). Просвечивающая электронная микроскопия показала, что в таких клубеньках инфекционные нити имели типичную структуру (Приложение А Рисунок 4К). Инфицированные клетки встречались нечасто. В этих клетках симбиосомы содержали слабо дифференцированные бактериоиды небольшого размера, палочковидной формы и с плотным матриксом (Приложение А Рисунок 4Л). Как в инфицированных, так и в неинфицированных клетках были обнаружены скопления амилопластов и митохондрий (Приложение А Рисунок 4М).

3.2.1.5. Инокуляция *Rhizobium laguerreae* AMPS04 (геновид R)

Штамм *R. laguerreae* AMPS04 индуцировал многочисленные белые клубеньки на всех тестируемых генотипах растений (Рисунок 17А, Приложение А Рисунок 5А, Е). В таких клубеньках зона инфекции была расширена (Рисунок 17Б, Приложение А Рисунок 5Б, Ж). Ткани клубенька содержали колонизированные клетки, заполненные растущими инфекционными нитями и каплями (Рисунок 17В, Приложение А Рисунок 5В, З). В некоторых клетках происходил выход бактерий в цитоплазму хозяина, но бактериоиды подвергались преждевременной дегенерации. На ультраструктурном уровне наблюдалось утолщение стенок инфекционных нитей с образованием различных выростов (Рисунок 17Г). В инфицированных клетках были обнаружены как одноклеточные (Рисунок 17Е), так и мультиклеточные симбиосомы (Рисунок 17Д). Однако бактериоиды имели слабо дифференцированную палочковидную форму с каплями полигидроксипропаната в матриксе (Рисунок

17Е). В инфицированных клетках были обнаружены крупные мультивезикулярные тельца (Рисунок 17Е).

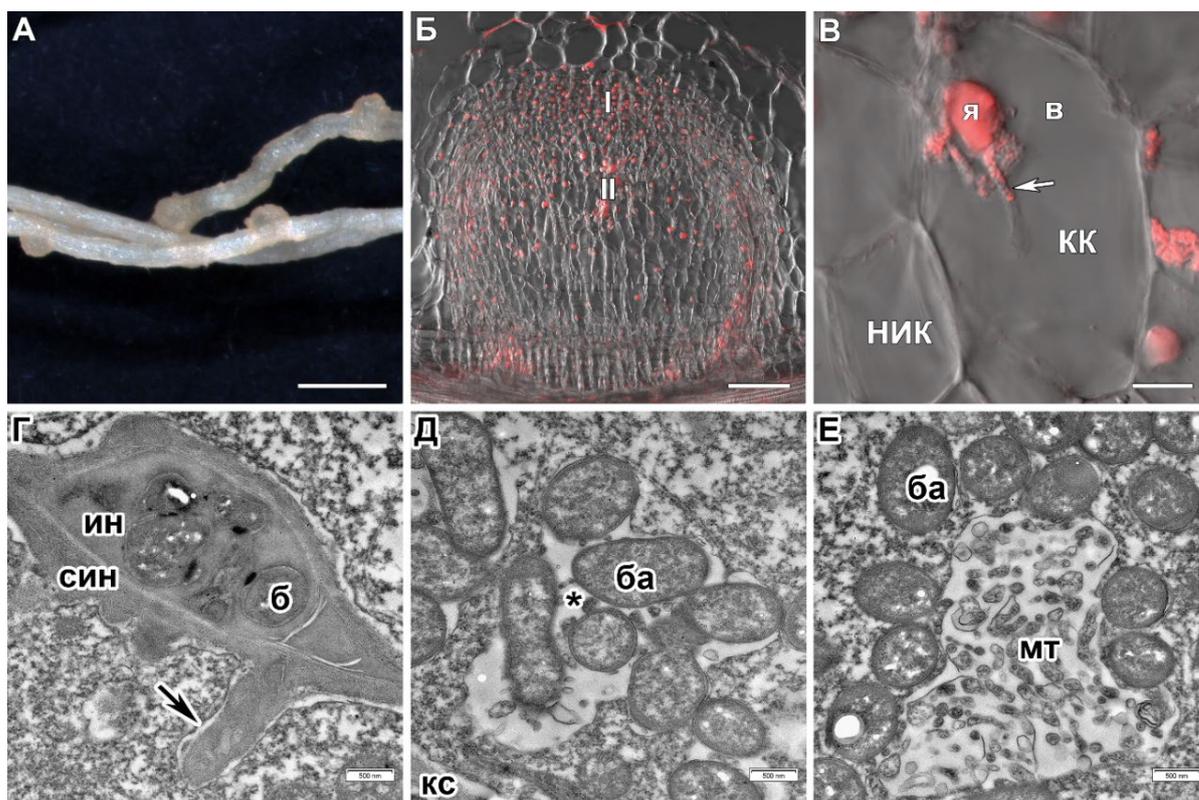


Рисунок 17 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных *Rhizobium laguerreae* AMPS04

А — общий вид корней. Б, В — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции. КК — колонизируемая клетка; НИК — неинфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелка указывает на инфекционную нить. Г–Е — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; син — стенка инфекционной нити; б — бактерия; черная стрелка — вырост стенки инфекционной нити; ба — бактериод; кс — клеточная стенка; черная звездочка (*) — мультибактероидная симбиосома; мт — мультивезикулярное тельце. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В — 10 мкм, Г–Е — масштаб указан под каждой линейкой.

Линия SGE не показала способность координации инфекции клеток клубеньков при электронно-микроскопическом анализе. В клубеньках были обнаружены только инфекционные нити без выхода бактерий (Приложение А Рисунок 5Г). Обращает на себя внимание присутствие липидных капель в цитоплазме неинфицированных клеток (Приложение А Рисунок 5Д). Инфицированные клетки, напротив, были обнаружены в клубеньках сорта

Frisson. Они были заполнены симбиосомами, содержащими только недифференцированные мелкие бактериоды палочковидной формы (Приложение А Рисунок 5К). Инфекционные нити имели утолщенные стенки, которые часто образовывали выросты в цитоплазму (Приложение А Рисунок 5И). Кроме того, часто наблюдались увеличенные инфекционные нити, а также инфекционные капли с сильно набухшим матриксом, который приобретал зернистую структуру (Приложение А 5Л).

3.2.1.6. Инокуляция *Rhizobium laguerreae* AMPS17 (геновид R)

В случае штамма AMPS17 гистологическая структура клубенька также варьировала в зависимости от генотипа растения, но во всех случаях была аномальной. На сорте Rondo образовались розоватые клубеньки (Рисунок 18А), и их структура была аналогична клубенькам дикого типа, индуцированным штаммом *R. johnstonii* 3841, за исключением интенсивного накопления крахмала (Рисунок 18Б). Неожиданно в зоне III было обнаружено большое количество неинфицированных клеток, в то время как инфицированные клетки были сильно вакуолизированы (Рисунок 16В).

Ультраструктурный анализ показал, что инфекционные нити в клубеньках Rondo имели электронно-плотные стенки с часто наблюдаемыми выростами (Рисунок 18Г). Несмотря на наличие выраженной зоны азотфиксации, инфицированные клетки содержали слабо дифференцированные бактериоды в симбиосомах (Рисунок 18Д). Помимо этого, инфицированные клетки были не только вакуолизированы, но и содержали крупные мультивезикулярные тельца (Рисунок 18Е).

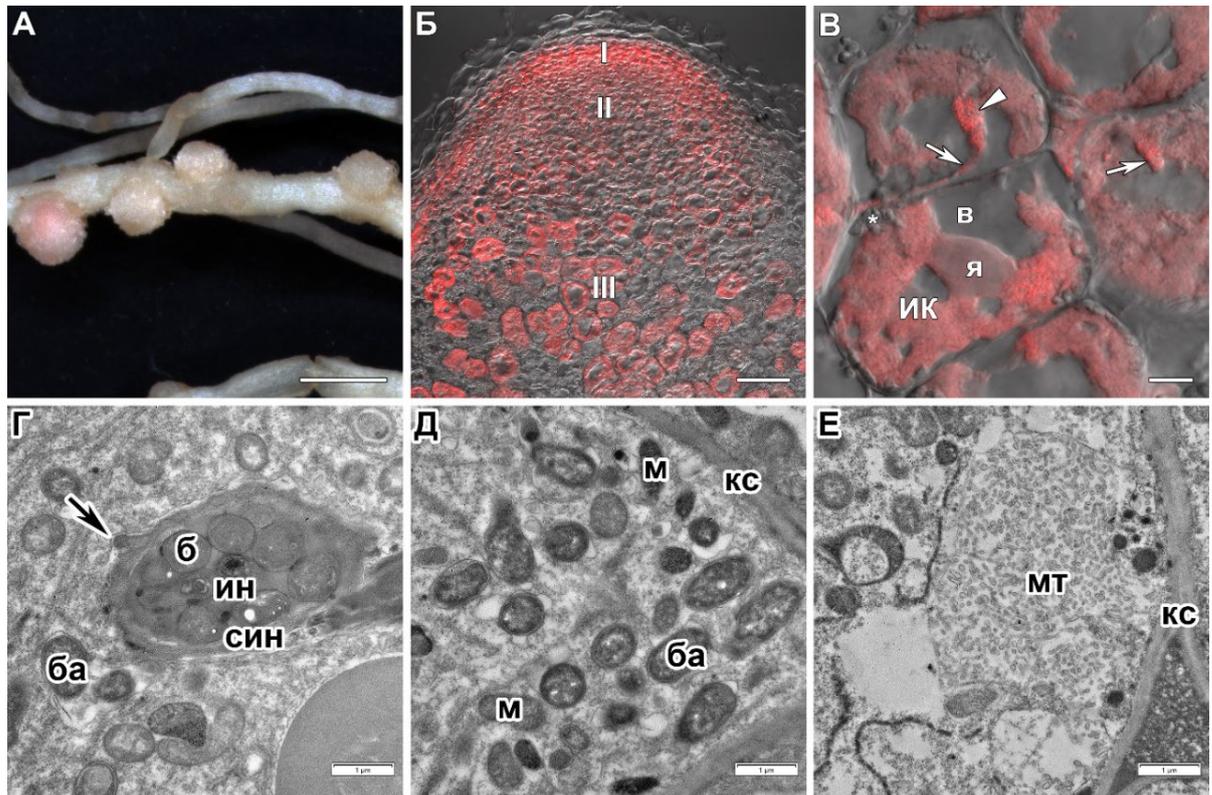


Рисунок 18 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных *Rhizobium laguerreae* AMPS17

А — общий вид корней. Б, В — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации. ИК — инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелки указывают на инфекционные нити, наконечник стрелки — на инфекционную каплю; белая звездочка (*) — гранулы крахмала. Г–Е — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; син — стенка инфекционной нити; б — бактерия; ба — бактериод; черная стрелка — вырост стенки инфекционной нити; кс — клеточная стенка; м — митохондрия; мт — мультивезикулярное тельце. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В — 10 мкм, Г–Е — масштаб указан под каждой линейкой.

В мелких белых клубеньках, образованных на линии SGE (Приложение А Рисунок 6А), клетки были заполнены гранулами крахмала, а зона инфекции была слегка увеличена (Приложение А Рисунок 6Б). Обширная клеточная дегенерация, приводящая к образованию зоны старения, наблюдалась в дистальной части клубенька, где располагались только отдельные инфицированные клетки (Приложение А Рисунок 6В). На ультраструктурном уровне в центральной части клубенька не было обнаружено выхода бактерий или каких-либо инфицированных клеток. Инфекционные нити характеризовались

наличием утолщенной стенки, содержащей электронно-плотные включения (Приложение А Рисунок 6Г). В вакуолях неинфицированных клеток вблизи тонопласта были обнаружены белковые агрегаты различных размеров и миелиновые тельца (Приложение А Рисунок 6Д).

Несмотря на то, что на сорте Frisson после инокуляции AMPS17 наблюдалось образование как белых, так и слегка удлинённых бледно-розовых клубеньков (Приложение А Рисунок 6Е), гистологический анализ показал значительные нарушения в их структуре (Приложение А Рисунок 6Ж). Наблюдалось формирование обширной зоны инфекции; в свою очередь, зона, соответствующая зоне азотфиксации, была сведена к единичным инфицированным клеткам (Приложение А Рисунок 6Ж, 3). Ультраструктурная организация таких клубеньков показала наличие инфекционных нитей с типичной структурой (Приложение А Рисунок 6И). Инфицированные клетки были заполнены как одноклеточными, так и мультисимбиотическими симбиосомами, содержащими бактериоиды с неравномерной плотностью матрикса и признаками дегенерации (Приложение А Рисунок 6К). Особенностью таких клубеньков стало скопление амилопластов и митохондрий вблизи мест выхода бактерий из инфекционных капель (Приложение А Рисунок 6Л).

3.2.1.7. Инокуляция *Rhizobium laguerreae* AMPS23 (геновид R)

Наконец, клубеньки, индуцированные штаммом *R. laguerreae* AMPS23, были белыми и неэффективными на всех изученных растениях (Рисунок 19А, Приложение А Рисунок 7А, Ж). На сортах Rondo и Frisson, не наблюдалось развитие правильной морфологии клубенька, формирование зон было нарушено (Рисунок 19Б, Приложение А Рисунок 73). В некоторых клетках отмечался выход бактерий из инфекционных капель в цитоплазму хозяина; остальные клетки были колонизированными, занимали большую часть объема клубеньков и содержали множество инфекционных нитей (Рисунок 19В, Приложение А Рисунок 7И). Электронно-микроскопический анализ клубеньков сорта Rondo показал, что инфекционные нити были окружены утолщенной стенкой (Рисунок

19Г). Бактерии попадали из инфекционных капель в цитоплазму растительных клеток, но бактериоды быстро разрушались (Рисунок 19Д). Кроме того, обнаруживались клетки, содержащие гипертрофированные инфекционные капли и клеточный детрит (Рисунок 19Е). В клубеньках гороха сорта Frisson также наблюдалось утолщение стенок инфекционных нитей (Приложение А Рисунок 7К), клеточных стенок (Приложение А Рисунок 7М). После выхода бактерий из инфекционных капель бактериоды оставались недифференцированными (Приложение А Рисунок 7Л).

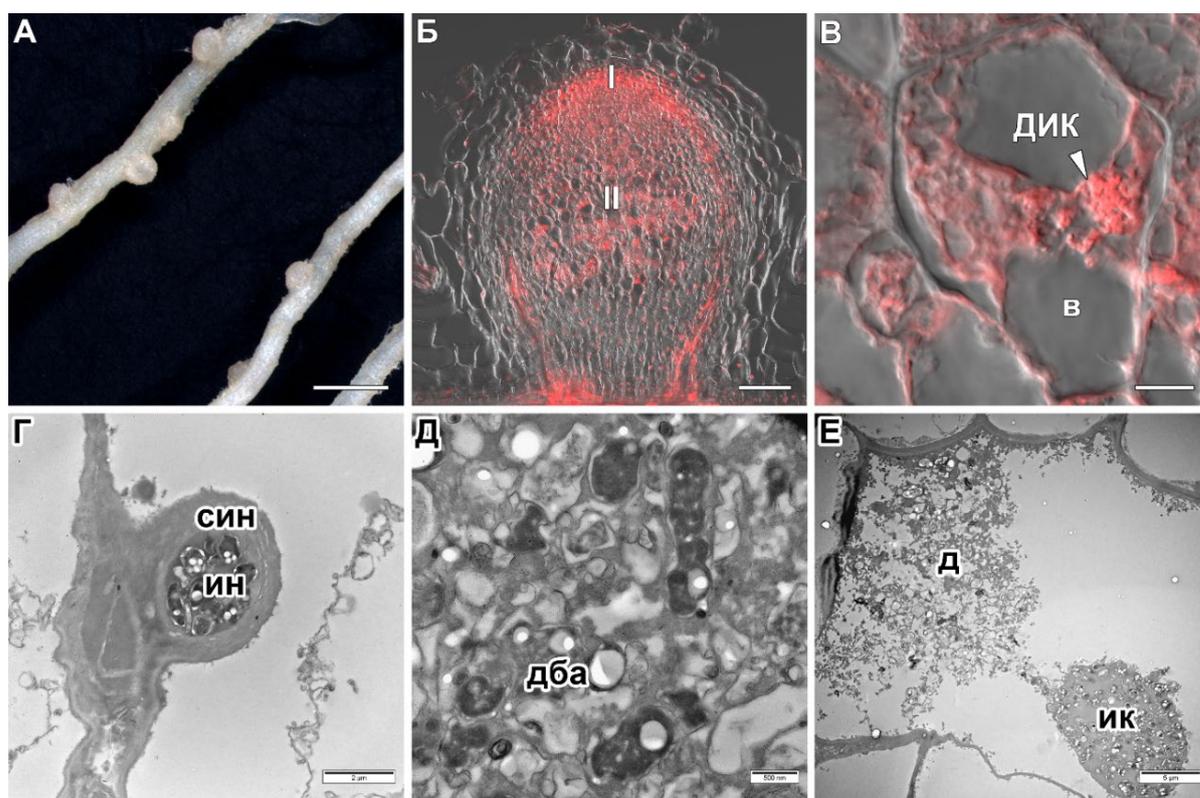


Рисунок 19 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных *Rhizobium laguerreae* AMPS23

А — общий вид корней. Б, В — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции. ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка; в — вакуоль; наконечник стрелки указывает на инфекционную каплю. Г–Е — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; син — стенка инфекционной нити; дба — дегенерирующий бактериод; д — детрит; ик — инфекционная капля. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В — 10 мкм, Г–Е — масштаб указан под каждой линейкой.

В случае растений лабораторной линии SGE, клубеньки были заполнены гранулами крахмала, а инфицированные клетки были сильно вакуолизированы

(Приложение А Рисунок 7В). Более того, в дистальной части клубенька периодически наблюдалось разрушение инфицированных клеток, что могло указывать на раннее старение (Приложение А Рисунок 7Б, В). При изучении ультраструктурной организации было показано, что инфекционные нити в клубеньках линии SGE имели типичную структуру без аномалий (Приложение А Рисунок 7Г). Происходил выход бактерий и их последующая дифференцировка, но с быстрой дегенерацией (Приложение А Рисунок 7Д). Наблюдалось появление множественных пероксисом, их слияние с симбиосомами и образование мультивезикулярных телец (Приложение А Рисунок 7Е).

3.2.2. Симбиотическая отзывчивость изученных генотипов гороха

Горох сорта Rondo можно рассматривать как наименее чувствительный к варианту инокуляции генотип. После инокуляции четырьмя из шести штаммов *R. laguerreae* наблюдалось формирование правильной гистологической зональности клубеньков (Рисунки 14Б, 15Б, 16Б, 18Б). Более того, высвобождение бактерий из инфекционных капель происходило в клубеньках, индуцированных всеми штаммами (Рисунки 14В, 15В, 16В, 17Д, 18В, 19В). Важно отметить, что высвобожденные бактерии AMPS34 лишь частично заполнили пространство внутри клеток клубенька, а оставшееся пространство было занято клеточной вакуолью (Рисунок 16В), точно так, как это было описано для мутанта *R. leguminosarum* с изменениями в структуре макромолекул ЛПС (Perotto *et al.*, 1994). Плеоморфные бактериоиды наблюдались только при инокуляции штаммами AMPS05 и AMPS22 (Рисунки 14Д, 15Д). В случае клубеньков, индуцированных штаммом AMPS05, наблюдалась их редкая дегенерация (Рисунок 15Е). Дегенерация бактериоидов была особенно сильной при инокуляции штаммом AMPS23 (Рисунок 19Д). В то же время, когда растения были инокулированы штаммами AMPS04, AMPS17 и AMPS34, бактериоиды оставались слабо дифференцированными (Рисунки 16Д, 17Д, Е, 18Д), а в случае AMPS04 образовывались мультибактериоидные симбиосомы (Рисунок 17Д).

Быструю дегенерацию бактериоидов можно рассматривать как проявление преждевременного старения клубеньков, что является общим признаком неэффективного симбиоза, как это было показано для нескольких симбиотических мутантов гороха (Kneen *et al.*, 1990; Novák *et al.*, 1995; Morzhina *et al.*, 2000; Serova *et al.*, 2018) и ризобияльных мутантов (Santos *et al.*, 2000; Bourassa *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2020). О дегенерации симбиотических структур клубеньков гороха сообщалось также для линии Sprint-2 в сочетании с неэффективным штаммом *R. leguminosarum* sv. *viciae* CIAM1064 (Borisov *et al.*, 1992). Ранее у некоторых неэффективных мутантов гороха было описано образование недифференцированных бактериоидов в инфицированных клетках клубенька (Morzhina *et al.*, 2000). Кроме того, потеря О-антигена ЛПС у *Paraburkholderia phymatum* также привела к образованию клубеньков *Mimosa pudica* L. с плохо выраженными гистологическими зонами, отсутствию симбиосом и признакам дегенерации инфицированных клеток (Welmlage *et al.*). Нарушения в дифференцировке бактериоидов также могут быть вызваны проблемами с синтезом или транспортом клубенек специфичных цистеин-богатых пептидов растений (Alunni, Gourion, 2016).

Несмотря на то, что сорт Rondo оказался наиболее успешным в формировании симбиоза со штаммами *R. laguerreae*, при инокуляции некоторыми штаммами наблюдалась не только индукция раннего старения клубеньков, но и активация защитных реакций. Типичные инфекционные нити наблюдались только при инокуляции штаммами AMPS05 и AMPS34 (Рисунки 15Г, 16Г). При инокуляции другими штаммами *R. laguerreae* наблюдались различные нарушения: электронно-плотный матрикс (AMPS22) (Рисунок 14Г), электронно-плотные стенки инфекционных нитей (AMPS17) (Рисунок 18Г) и утолщенные стенки инфекционных нитей (AMPS04, AMPS23) (Рисунки 17Г, 19Г). Ранее было показано, что обработка фунгицидами (Gorshkov *et al.*, 2020; Gorshkov *et al.*, 2023), а также мутации в гене гороха *Sym33* (Tsyganov *et al.*, 1998), кодирующем ключевой транскрипционный фактор CYCLOPS/IPD3 (Tsyganov, Tsyganova, 2020), приводили к утолщению стенок инфекционных нитей. Более

того, клубеньки, индуцированные AMPS34, продемонстрировали дегенерацию бактерий в некоторых инфекционных нитях (Рисунок 16Е). Ранее такое проявление защитных реакций было обнаружено в клубеньках мутанта SGEFix⁻⁵ (*sym33-2*) (Tsyganova *et al.*, 2019b). В клетках клубенька после инокуляции штаммами AMPS04 и AMPS17 наблюдалось образование мультивезикулярных телец, которые являются цитологическими маркерами защитных реакций (Freidit Frey, Robatzek, 2009; Cui *et al.*, 2016; Ekanayake *et al.*, 2019) (Рисунки 17Е, 18Е). Для гороха ранее наблюдалось образование мультивезикулярных телец при обработке фунгицидами и гербицидами (Gorshkov *et al.*, 2020; Gorshkov *et al.*, 2023, 2024a). Наконец, как признаки коагуляционного некроза инфицированных клеток, вызванные окислительным стрессом, так и колликвационного некроза, реакции на бактериальную инфекцию, наблюдались в клетках клубеньков, индуцированных AMPS22 и AMPS23, соответственно (Рисунки 14Е, 19Е).

При анализе гистологической организации клубеньков установлено, что сорт Frisson занимает промежуточное положение с точки зрения симбиотической отзывчивости на инокуляцию *R. laguerreae*. Три штамма (AMPS05, AMPS17 и AMPS22) были способны индуцировать клубеньки, в которых дифференцировались бактериоиды (Приложение А Рисунки 2Л, 3Л, 6К), хотя в клубеньках, индуцированных штаммом AMPS17, наблюдалась их преждевременная дегенерация. В клубеньках, индуцированных другими штаммами, бактериоиды были слабо дифференцированы или оставались недифференцированными (Приложение А Рисунки 4Л, 5К, 7Л).

Образование клубеньков на Frisson также сопровождалась индукцией защитных реакций. Типичные инфекционные нити наблюдали только в клубеньках, индуцированных штаммами AMPS17 и AMPS34 (Приложение А Рисунки 4К, 6И), в то время как в клубеньках, индуцированных другими штаммами, стенки инфекционных нитей были утолщены и в некоторых случаях образовывали выросты (Приложение А Рисунки 2К, 3К, 5И, 7К). Часть инфекционных нитей и капель в клубеньках, индуцированных штаммом AMPS17, была гипертрофированы (Приложение А Рисунок 6Л). Гипертрофия

инфекционных капель была описана как характерная черта мутанта гороха *SGEFix⁻¹* (*sym40-1*), ортологичного мутанту *M. truncatula* по гену *EFD*, кодирующему предполагаемый негативный регулятор цитокининового ответа (Tsyganov, Tsyganova, 2020); мутантов *M. truncatula nip* (предполагаемый переносчик нитратов (Veereshlingam *et al.*, 2004)), и у *L. japonicus nip133*, мутанта по гену, кодирующему нуклеопорин (Kanamori *et al.*, 2006), инфекционные капли также были увеличены. Появление сильно увеличенных инфекционных нитей в клубеньках люцерны *M. sativa* было вызвано мутантом *R. meliloti* с дефицитом экзополисахаридов (Niehaus *et al.*, 1993). Кроме того, в клубеньках, индуцированных штаммом AMPS23, утолщались не только стенки инфекционных нитей, но и стенки инфицированных клеток (Приложение А Рисунок 7К–М). Утолщение клеточных стенок наблюдалось ранее у мутантов *Sym33* (Ivanova *et al.*, 2015) и в клубеньках гороха сорта Frisson, обработанных гербицидами и инсектицидами (Gorshkov *et al.*, 2024a; Gorshkov *et al.*, 2024b). Штамм AMPS22 характеризовался индукцией клубеньков, в которых в инфицированных клетках наблюдалась вакуолизация эндоплазматического ретикулума (Приложение А Рисунок 2М). Расширение профилей эндоплазматического ретикулума было описано ранее в клубеньках неэффективных мутантов *SGEFix⁻¹* (*sym40-1*) и *SGEFix⁻³* (*sym26*) (Tsyganova *et al.*, 2019), а также в клубеньках, индуцированных мутантом *R. meliloti* по гену, кодирующему сукцинатдегидрогеназу (Gardiol *et al.*, 1987). Расширение эндоплазматического ретикулума было также описано для клеток клубенька у реликтового бобового растения *Oxytropis popoviana* Peschkova, индуцированного штаммом *Mesorhizobium japonicum* Оро-235 (Safronova *et al.*, 2019). В клетках клубеньков, индуцированных штаммом AMPS05, наблюдалось образование мультибактериальных симбиосом наряду с одноклеточными (Приложение А Рисунок 3Л, М). Образование мультибактериальных симбиосом характерно для различных неэффективных мутантов гороха (Borisov *et al.*, 1992; Morzhina *et al.*, 2000), также оно происходило при воздействии на растения гороха фунгицидами (Gorshkov *et al.*, 2020; Gorshkov *et al.*, 2023) или кадмием (Tsyganova *et al.*, 2019c).

Кроме того, было показано, что несколько бактерий могут быть упакованы в единую симбиосому в клубеньках, индуцированных *R. leguminosarum* с дефектом в ЛПС (Perotto *et al.*, 1994).

При инокуляции штаммами AMPS34 и AMPS17 наблюдалось перемещение амилопластов и митохондрий к местам высвобождения бактерий из инфекционных капель (Приложение А Рисунки 4М, 6Л). В клубеньках гороха в инфицированных клетках амилопласты и митохондрии накапливаются на периферии клеток (Newcomb, 1976). В то же время в молодых инфицированных клетках *Phaseolus vulgaris* L., индуцированных штаммом *R. etli* CE3, наблюдалось объединение митохондрий, амилопластов и эндоплазматического ретикулума в цитоплазме (Cermola *et al.*, 2000).

Лабораторная линия SGE продемонстрировала наибольшую избирательность, активируя защитные реакции против неэффективных партнеров и формируя клубеньки с правильной гистологией только со штаммом AMPS05 (Приложение А Рисунок 3А, Б). Тем не менее, даже в этих клубеньках плеоморфные бактериоиды подверглись преждевременной дегенерации, при этом в инфицированных клетках наблюдалось активное образование пероксисом (Приложение А Рисунок 3Д, Е). Появление пероксисом было также характерно для инфицированных клеток в клубеньках, индуцированных штаммами AMPS23 и AMPS34, в которых бактериоиды подвергались дегенерации (и имели аномальное строение в случае штамма AMPS34) (Приложение А Рисунки 4Д, Е, 7Д). Ранее было описано появление множественных пероксисом у неэффективного мутанта гороха SGEFix⁻-3 (*sym26*), подвергавшегося тепловому стрессу в течение 3 дней (Tsyganova *et al.*, 2023a). В клубеньках этого мутанта происходило слияние пероксисом с симбиосомами, что является одним из наиболее вероятных сценариев разрушения бактериоидов в условиях окислительного стресса. В клубеньках, индуцированных штаммом AMPS22, бактериоиды оставались недифференцированными, образовывали мультибактероидные симбиосомы и подвергались преждевременной дегенерации (Приложение А Рисунок 2Д). В то же время в клетках

накапливались липидные капли (Приложение А Рисунок 2Е) в результате перекисного окисления липидных мембран (Bouchnak *et al.*, 2023; Usukhbayar *et al.*, 2023). Липидные капли также накапливались в клетках клубенька после инокуляции AMPS04 (Приложение А Рисунок 5Д). Наблюдаемое появление пероксисом, а также липидных капель ясно указывали на наличие окислительного стресса в таких клубеньках. За исключением штаммов AMPS05 и AMPS23, при инокуляции оставшимися штаммами *R. laguerreae*, инфекционные нити характеризовались различными аномалиями, такими как утолщение стенок и/или образование выростов, гипертрофией (Приложение А Рисунки 2Г, 6Г). В то же время, не наблюдалось выхода бактерий из инфекционных нитей в клубеньках, индуцированных штаммом AMPS04, или выход был редким в случае AMPS17 (Приложение А Рисунки 5В, 6В). Образование «запертых» инфекционных нитей и отсутствие выхода бактерий было показано у симбиотических мутантов гороха по гену *Sym33* (Tsyganov *et al.*, 1998; Voroshilova *et al.*, 2001; Tsyganova *et al.*, 2019a) и мутантов *M. truncatula* по ортологичному гену *IPD3* (Ovchinnikova *et al.*, 2011). Кроме того, в клубеньках мутанта *L. japonicus alb1* выход бактерий из инфекционных капель в белых клубеньках также отсутствовал (Imaizumi-Anraku *et al.*, 1997). Показано, что мутант *R. tropico*, дефектный в биосинтезе глутатиона, формировал пигментированные коричневатозеленые клубеньки на *P. vulgaris*, полностью лишённые бактериоидов (Muglia *et al.*, 2008).

Как можно видеть, инокуляция растений гороха линии SGE большинством штаммов *R. laguerreae* приводит к образованию неэффективных клубеньков, в которых активируются сильные защитные реакции.

3.3. Влияние генотипа микросимбионта

Хотя все проанализированные штаммы были отнесены к F-кладе и могут рассматриваться как *R. laguerreae* в широком смысле, их симбиотическая совместимость в отношении гороха различна. Многие ассоциации, образованные разными генотипами гороха с различными штаммами, оказались

неэффективными (Kirichek *et al.*, 2026). Как упомянуто выше, детальный анализ показал, что клубеньки, образовавшиеся в таких взаимодействиях, проявляют как индуцированное старение, так и защитные реакции. Ранее было показано, что оба эти процесса могут происходить в клубеньках одновременно, хотя степень преобладания одного над другим зависит от типа нарушения симбиоза (Berrabah *et al.*, 2024). В целом, дегенерацию симбиотических структур можно рассматривать как введение санкций со стороны растения-хозяина, при которых ассоциации с неэффективными партнерами abortируются (Sachs *et al.*, 2010; Regus *et al.*, 2017; Westhoek *et al.*, 2017).

Анализ структуры пан-генома представителей, отнесенных к *R. laguerreae*, показал, что в пределах данной группы выделяется минимум 6 вероятных популяционных кластеров, при этом метаболические особенности штаммов из отдельных кластеров различны (Kirichek *et al.*, 2025). Подробное изучение *in silico* моделей метаболизма и аннотации геномов штаммов AMPS04, AMPS17, AMPS22 и AMPS23 выявило, что данные штаммы, вероятно, не способны осуществлять один из важных для симбиотического взаимодействия биохимических путей — биосинтез УДФ-N-ацетил- α -D-фукозамина (идентификатор BioСус: PWY-7333), вовлеченного в модификацию O-специфического антигена ЛПС, участвующего во взаимодействии с растениями (Lerouge, Vanderleyden, 2002). Кроме того, штаммы AMPS04, AMPS17 и AMPS23, по-видимому, не способны осуществлять биосинтез УДФ-N-ацетил- α -D-хиновозамина (идентификатор BioСус: PWY-7334), также связанного с модификацией O-антигена. В обоих случаях нарушения затрагивают фермент УДФ-N-ацетилглюкозамин-4,6-дегидратазу, который поставляет субстрат для дальнейшего метилирования и переноса сахарных остатков O-цепи ЛПС (Ojeda *et al.*, 2010), и, вероятно, регулирует длину цепи (Forsberg *et al.*, 2000).

Ранее было показано, что ризобии, лишенные специфичных ЛПС, способны индуцировать полноценные инфекционные нити, но выход из них затруднен (de Maagd *et al.*, 1989; Welmillage *et al.*, 2025), или бактерии быстро дегенерируют после выхода (Priefer, 1989; Niehaus *et al.*, 1998). Схожие аномалии

показаны в данной работе для AMPS04 — отсутствие выхода бактерий (Приложение А Рисунок 5В); AMPS17 — отсутствие выхода бактерий, признаки дегенерации (Приложение А Рисунок 6В); AMPS23 — преждевременная дегенерация симбиотических структур (Рисунок 19В, Д, Е, Приложение А Рисунок 7Д). Также в клубеньках, индуцированных ризобияльными ЛПС-мутантами обнаруживались мультибактероидные симбиосомы (Perotto *et al.*, 1994; Kannenberg *et al.*, 1998), подобные тем, что были описаны в этой работе для AMPS04 (Рисунок 17Д), AMPS05 (Приложение А Рисунок 3М), AMPS17 (Приложение А Рисунок 6К) и AMPS22 (Приложение А Рисунок 2Д). Одним из ответов на инфекцию бактериями, мутантными по синтезу ЛПС, является активация защитных реакций растения-хозяина (Perotto *et al.*, 1994). В данной работе описано, что инокуляция некоторыми анализируемыми штаммами вызвала заметную защитную реакцию в клубеньках сорта Frisson и линии SGE (см. пункт 3.2.2.).

Таким образом, предсказаны отличия между анализируемыми штаммами в структуре ЛПС, являющегося частью симбиотической поверхности взаимодействия (интерфейса) — сложной и динамической структуры, формируемой сахарами и белками на поверхности бактериальной клетки и растительной клеточной стенкой. Симбиотический интерфейс необходим для взаимодействия, координации развития и обмена питательными веществами между партнерами в симбиозе. В ходе работы были проанализированы различные компоненты симбиотической поверхности взаимодействия и оценены процессы ее ремоделирования в клубеньках, образованных на растениях сорта Rondo после инокуляции штаммами AMPS.

3.3.1. Симбиотический интерфейс: гомогалактуронан

Первичные клеточные стенки окружают активно растущие растительные клетки и состоят из целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина и структурных гликопротеинов, а также содержат широкий спектр белков, которые могут изменять структуру клеточной стенки или реагировать на внутренние и внешние

сигналы (Keegstra, 2010; Liu *et al.*, 2015). Когда ризобии проникают в растительные клетки, происходит сложная перестройка как их поверхностных структур (клеточной стенки и экзополисахаридной капсулы), так и компонентов апопласта растений (клеточной стенки и внеклеточного матрикса), приводящая к формированию симбиотической поверхности взаимодействия. При формировании и функционировании симбиотического интерфейса в клубеньках Бобовых значимые функции выполняют все обозначенные компоненты, однако наиболее изученными на сегодняшний день остаются пектины (Цыганова, Цыганов, 2019; Su, 2023).

Гомогалактуронан (ГГ) является основным типом пектина в первичных клеточных стенках и срединной пластинке растительных клеток. Выявленная в ходе данного исследования локализация высоко метил-этерифицированного ГГ, обнаруживаемого как антителами JIM7, так и LM20, в клубеньках, образованных при инокуляции всеми штаммами AMPS, была типичной для клубеньков гороха (Tsyganova *et al.*, 2023c). Метка наблюдалась в клеточных стенках, в том числе в стенках инфекционных нитей в зонах инфекции и азотфиксации (Рисунок 20, Приложение А Рисунок 8).

Низко метил-этерифицированный ГГ тоже накапливался характерным для клубеньков гороха образом (Tsyganova *et al.*, 2023c) во всех вариантах. Метка антитела JIM5 присутствовала в клеточных стенках колонизированных, инфицированных и неинфицированных клеток в клубеньках, индуцированных всеми штаммами (Приложение А Рисунок 9А-Г, Е), за исключением AMPS23 (Приложение А Рисунок 9Д). Антитело LM19 не метило клеточные стенки колонизированных клеток в клубеньках, индуцированных штаммами AMPS04 и AMPS23 (Рисунок 21А, Д). В случае инокуляции штаммом AMPS04 метка LM19 была обнаружена в стенках инфицированных клеток, если последние были представлены в клубеньке. Однако в стенках инфекционных нитей всех образцов отмечалось обилие как метки JIM5, так и LM19 (Рисунок 21, Приложение А Рисунок 9).

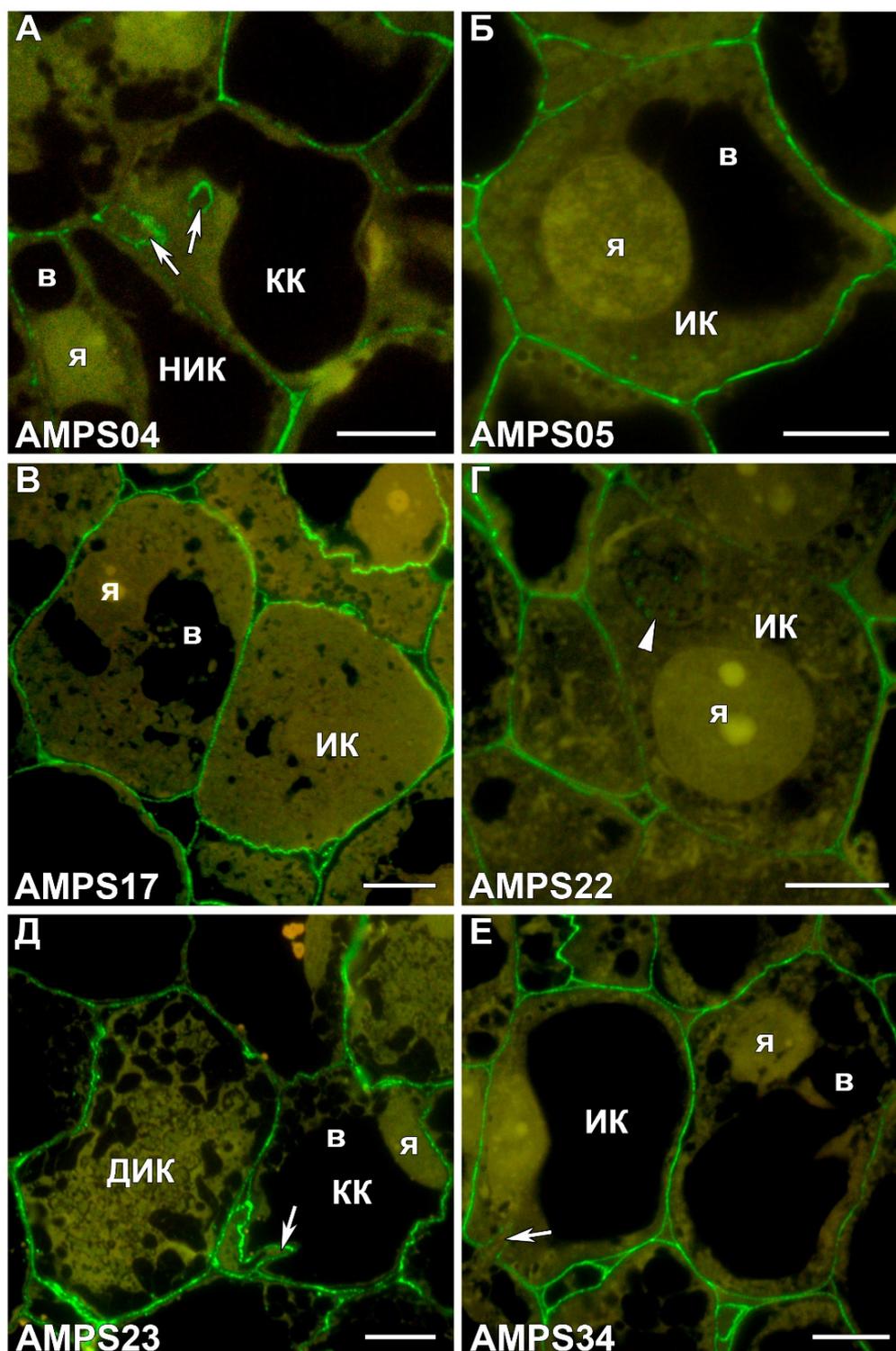


Рисунок 20 — Иммунолокализация эпитопа высоко метил-этерифицированного гомогалактуронана, меченного антителом LM20, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммунолокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити, треугольником — инфекционная капля. Масштабные линейки — 10 мкм.

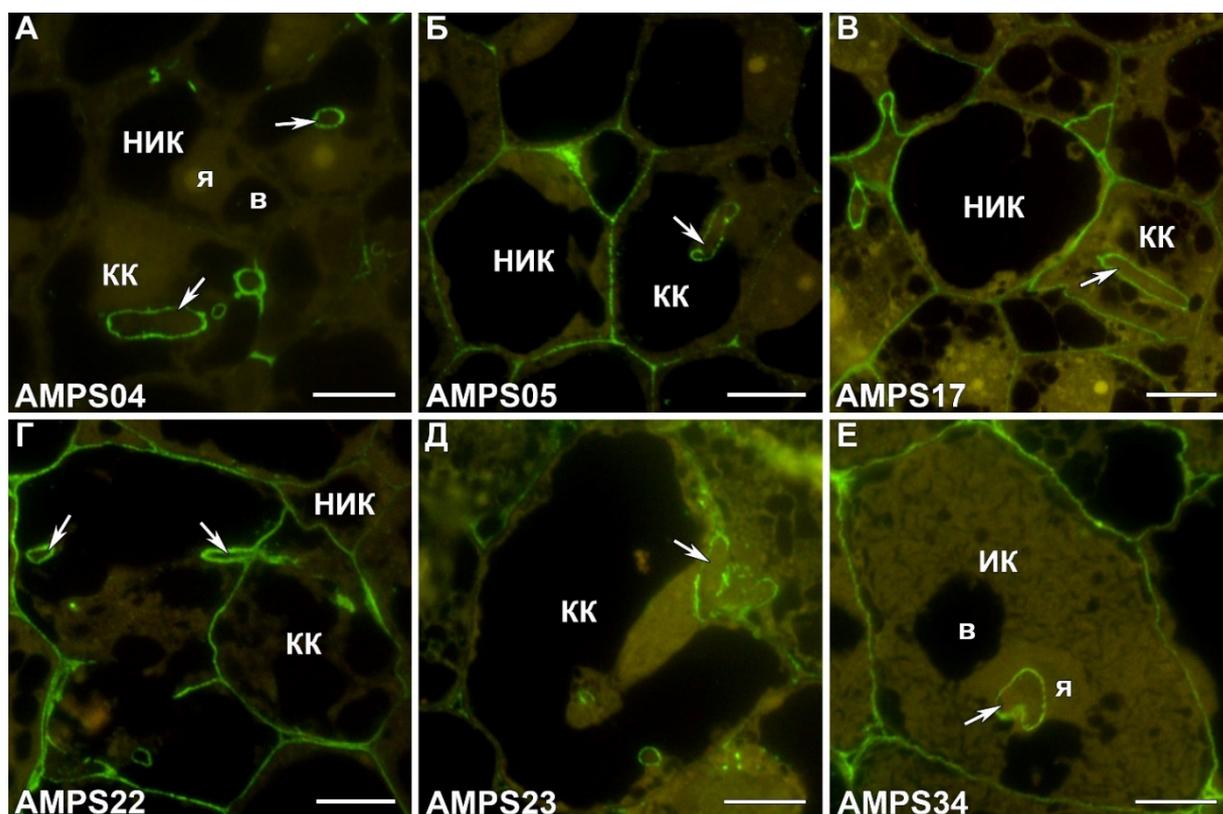


Рисунок 21 — Иммулокализация эпитопа де-этерифицированного гомогалактуронана, меченного антителом LM19, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммулокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити. Масштабные линейки — 10 мкм.

ГГ синтезируются в аппарате Гольджи и транспортируются в виде молекул метил-этерифицированного пектина к плазматической мембране и секретируются в пространство апопласта (Voragen *et al.*, 2009). Локальные модификации ГГ необходимы для внутриклеточного прохождения инфекционной нити, содержащей бактерии (Tsyganova *et al.*, 2021). Согласно полученным в работе данным можно заключить, что этот процесс, вероятно, не зависит от штамма ризобий при формировании эффективного симбиоза, поскольку нет явных различий в локализации де-этерифицированного ГГ, частично метил-этерифицированного ГГ и высоко метил-этерифицированного ГГ в клубеньках при использовании разных штаммов (Рисунки 20, 21, Приложение А Рисунки 8, 9). Специфические особенности модификации пектинов были выявлены только в ответ на неэффективный симбиоз. Так, в

случае инокуляции штаммами *R. laguerreae* AMPS04 или AMPS23, накопление де-этерифицированного ГГ в клеточных стенках колонизируемых клеток не происходило (Рисунок 21А, Д). Во время развития бобово-ризобияльного симбиоза ферменты пектин-эстеразы де-этерифицируют пектины клеточных стенок (Wilmowicz *et al.*, 2022), а ферменты полигалактуроназы или пектат-лиазы регулирует жесткость клеточной стенки, опосредуя деградацию де-этерифицированного пектина (Xie *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2023). Можно предположить, что в описываемых случаях снижение/отсутствие активности пектин-эстераз опосредует отсутствие де-этерифицированных пектинов в клеточных стенках и, как следствие, отсутствие субстрата для других ферментов. В конечном счете, не модифицированные этерифицированные пектины могли препятствовать инфекции, приводя к образованию лишь небольшого количества инфицированных клеток или их полному отсутствию. Это предположение было в дальнейшем подтверждено результатами транскриптомного анализа (см. пункт 3.3.7.), так как был обнаружен факт снижения экспрессии генов полигалактуроназ и ряда пектиновых эстераз в клубеньках, индуцированных штаммом AMPS04.

Ранее было показано, что в клубеньках гороха димерное объединение цепей ГГ посредством ионов Ca^{2+} , распознаваемое антителом 2F4, накапливается главным образом в стенках инфекционных нитей и в местах клеточных контактов (Tsyganova *et al.*, 2023c). Равномерное распределение димера ГГ, сшитого ионами Ca^{2+} , наблюдалось в стенках колонизированных и инфицированных клеток в зонах инфекции и азотфиксации, а также в инфекционных нитях всех проанализированных вариантов в этом исследовании (Приложение А Рисунок 10).

Ранее было показано, что димерная конформация «контейнер для яиц» (от англ. egg-box) де-этерифицированного пектина, сшитого Ca^{2+} , может приводить к локальному уплотнению клеточной стенки, что ограничивает рост ризобий и предотвращает их распространение (Su *et al.*, 2023). Вероятно, что этот процесс не связан со штаммом микросимбионта.

3.3.2. Симбиотический интерфейс: рамногалактуронан I

Рамногалактуронан I (РГ-I) — это разветвленный пектиновый полисахарид, на долю которого приходится 7–14% состава первичных клеточных стенок (Mohnen, 1999). Точная роль РГ-I в формировании симбиотических клубеньков еще до конца не изучена (Цыганова, Цыганов, 2019).

Иммунолокализация рамногалактуронана I с использованием антитела CCRC-M35, которое связывается с основной цепью РГ-I, выявила отсутствие распознавания этого эпитопа в клеточных стенках всех исследованных образцов. Антитело CCRC-M35, требует для связывания по меньшей мере двух неразветвленных дисахаридных повторов, не связывается с разветвленными участками остова РГ и нечувствительно к составу сахаров на невозстанавливаемом конце. Ранее было показано, что эпитоп CCRC-M35 отсутствует в клубеньках *P. sativum* (Tsyganova *et al.*, 2023c), что также было подтверждено и в этом исследовании. Такая локализация, или, скорее, ее отсутствие, может быть объяснена тем фактом, что молекула РГ в растениях гороха сильно разветвлена; она практически не содержит участков необходимой длины для связывания с антителом CCRC-M35.

Флуоресцентная микроскопия линейного эпитопа 1,4-β-D-галактана РГ-I, распознаваемого антителом LM5, показала, что мечение определялась в стенках клеток эндодермы и флоэмы, а также в стенках инфекционных нитей всех изученных вариантов (Рисунок 22). Эпитоп LM5 также присутствовал в местах контакта нескольких неинфицированных и/или колонизированных клеток в клубеньках, индуцированных штаммом AMPS34 (Рисунок 22E).

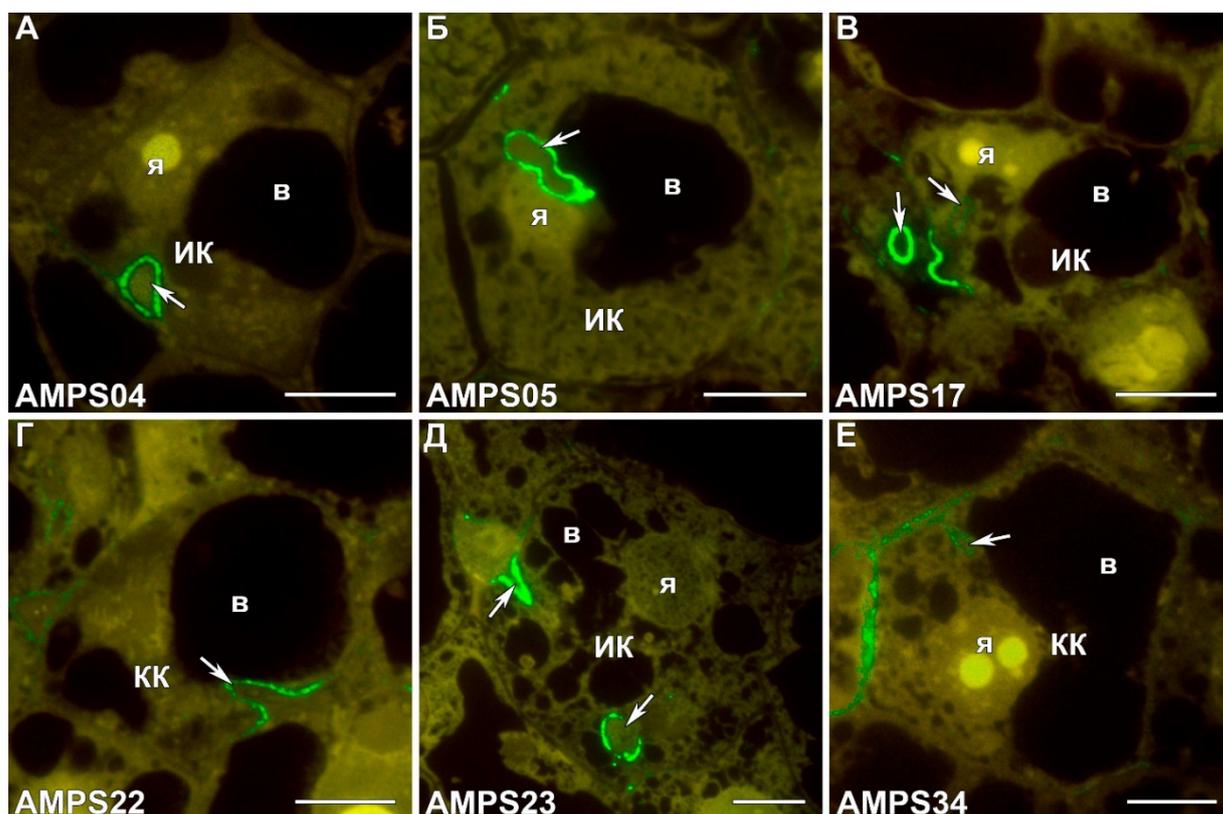


Рисунок 22 — Иммунолокализация эпитопа линейного 1,4-β-D-галактана рамногалактуронана I, меченного антителом LM5, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммунолокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити, треугольником — инфекционная капля. Масштабные линейки — 10 мкм.

Недавно была продемонстрирована некоторая видоспецифичная локализация и распределение эпитопа боковой галактановой цепи РГ-I в клубеньках *P. sativum*, *M. truncatula*, *Lupinus luteus* L., *Galega orientalis* Lam., *Glycine max* и *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (de Faria *et al.*, 2022; Tsyganova *et al.*, 2023b; Tsyganova *et al.*, 2023c). Кроме того, было показано, что этот эпитоп локализован в фиксирующих нитях *Erythrophleum* spp., члена клады Mimosoid (de Faria *et al.*, 2022).

Вокруг симбиосом колонизированных клеток, содержащих ювенильные бактериоиды, в клубеньках, индуцированных штаммами *R. laguerreae* AMPS05, AMPS17, AMPS22 и AMPS34, была обнаружена чрезвычайно слабая метка антитела LM6-М (Приложение А Рисунок 11Б, В, Г, Е). Метка не наблюдалась в клубеньках, где не происходила дифференцировка бактерий (Приложение А

Рисунок 11А, Д). Антитело LM6-M распознает эпитоп 1,5- α -L-арабиановой боковой цепи РГ-I, однако известно, что оно вступает в перекрестную реакцию с эпитопом арабиногалактанового белка (АГБ).

Ранее в клубеньках гороха линии SGE дикого типа присутствие линейного эпитопа арабиановой боковой цепи РГ-I, распознаваемого моноклональным антителом LM6-M, было обнаружено в клеточных стенках инфицированных, неинфицированных и колонизированных клеток, а также в стенках инфекционных нитей (Tsyganova *et al.*, 2023c). Однако в этом исследовании метка антитела LM6-M была обнаружена только в мембранах симбиосом и не была обнаружена в клеточных стенках. Поскольку в этом исследовании использовался сорт Rondo, можно предположить, что распределение эпитопа арабинана в клеточных стенках определяется генотипом растения. Стоит повторить, известно, что антитело к LM6-M вступает в перекрестную реакцию с эпитопом АГБ; LM6-M прочно связывается с димером арабинана и аналогичным образом с арабинанами со степенью полимеризации до 7 (Willats *et al.*, 1998; Pedersen *et al.*, 2012). Представленный анализ продемонстрировал специфические для штамма особенности в распределении эпитопа, меченного LM6-M, в ответ на неэффективный симбиоз. В клубеньках без развития зоны азотфиксации (инокуляция AMPS04 или AMPS23) дифференцировка бактериоидов не происходила, и метка LM6-M не обнаруживалась (Приложение А Рисунок 11А, Д).

3.3.3. Симбиотический интерфейс: гемицеллюлоза

Распределение фукозилированного ксилоглюкана (гемицеллюлозы), меченного антителом CCRC-M1, в клубеньках показало преимущественное накопление в эндодерме и меристеме. Метка также была обнаружена в клеточных стенках, включая стенки инфекционных нитей, в зонах инфекции и азотфиксации во всех вариантах (Приложение А Рисунок 12). Эти данные согласуются с полученными ранее для гороха (Tsyganova *et al.*, 2023c).

Фукозилированный ксилоглюкан — особый тип ксилоглюкана, основной компонент клеточных стенок растений, который играет важную роль в структуре клеточных стенок и, возможно, в росте и дифференцировке клеток. Известно, что недостаток фукозы в клеточных стенках может привести к карликовости и снижению прочности стебля (Freshour *et al.*, 2003).

3.3.4. Симбиотический интерфейс: арабиногалактановые белки

Ранее было показано, что АГБ играют ключевую роль на различных уровнях взаимодействия между корнями и почвенными микробами, как полезными, так и патогенными (Nguema-Ona *et al.*, 2013).

Анализ локализации и распределения АГБ с использованием антитела LM2 выявил маркировку симбиосомных мембран. В ответ на неэффективный симбиоз были обнаружены специфические, в зависимости от штамма ризобий, особенности ремоделирования растительно-микробной поверхности взаимодействия (Рисунок 23). В клубеньках, где не запускалась азотфиксация, не происходила дифференцировка бактериоидов не было обнаружено мембран симбиосом, меченных антителом LM2 (Рисунок 23А, Д). Напротив, когда образование зоны азотфиксации (или зоны, соответствующей зоне азотфиксации) происходило нормально и бактерии дифференцировались в бактериоиды, антитело LM2 начинало маркировать мембраны симбиосом в инфицированных клетках (Рисунок 23Б, Г, Е). В случае инокуляции штаммом *R. laguerreae* AMPS17 возникла промежуточная ситуация (Рисунок 23В), при которой запускалась бактериальная дифференцировка, но бактериоиды быстро дегенерировали. Следует заметить, что локализация метки LM2, была схожа с локализацией метки LM6-М (подробнее см. пункт 3.3.2.), где в отсутствие дифференцировки бактерий в клубеньках, мечение симбиосомных мембран не наблюдалось (Приложение А Рисунок 11).

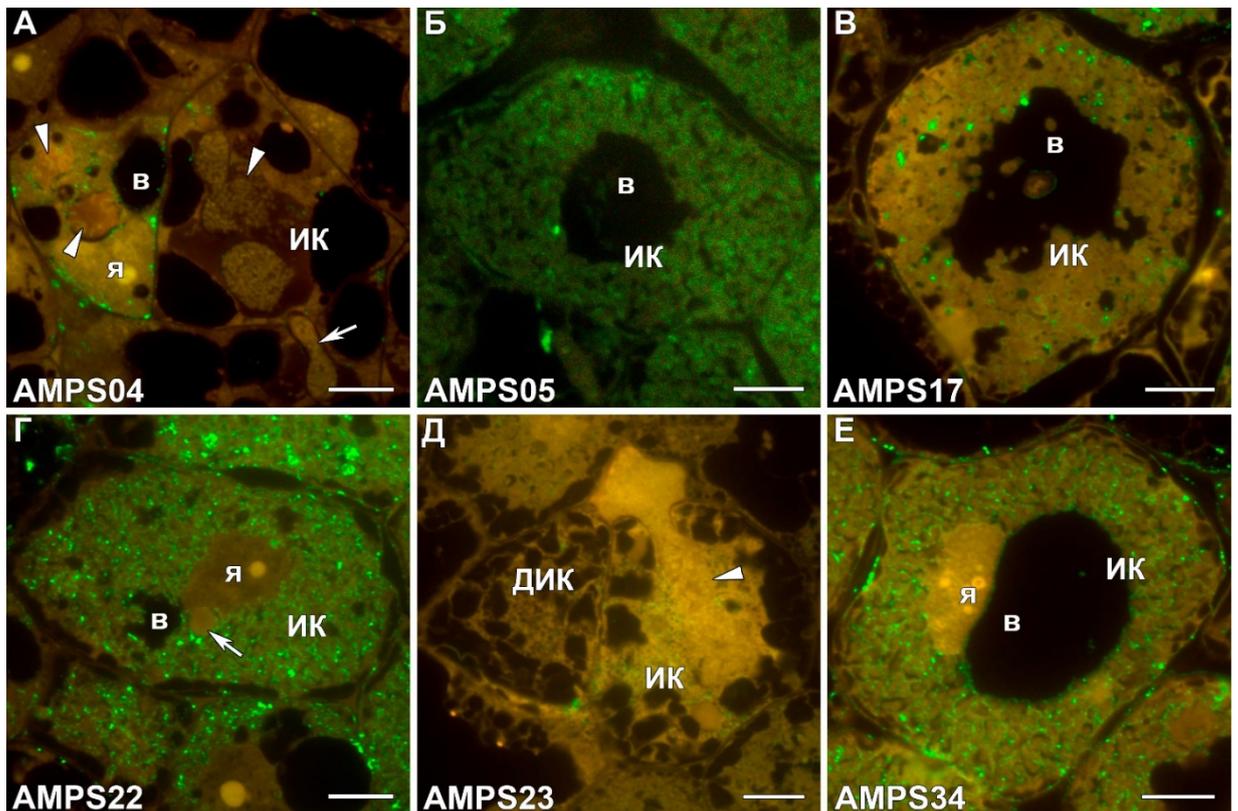


Рисунок 23 — Иммунолокализация эпитопа арабиногалактоанового белка, меченного антителом LM2, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммунолокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. ИК — инфицированная клетка; ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити, треугольниками — инфекционные капли. Масштабные линейки — 10 мкм.

Ранее наблюдалось зависящее от времени распределение эпитопа, реагирующего с антителом LM2 (Tsyganova *et al.*, 2023b). Другими словами, мечение этого эпитопа было обнаружено в недифференцированных симбиосомах *Glycine max* и ювенильных симбиосомах *Galega orientalis*, но практически исчезло в зрелых. Однако, при инокуляции штаммами AMPS было обнаружено одинаковое количество метки как в клубеньках с дифференцированными симбиосомами, так и в клубеньках с недифференцированными симбиосомами, что может свидетельствовать о том, что исчезновение эпитопа, распознаваемого LM2, не требуется для созревания мембран симбиосом в таких клубеньках.

Ранее с помощью моноклонального антитела MAC265 в качестве зонда был идентифицирован растительный гликопротеин-экстенсин, который входит в состав матрикса просвета инфекционных нитей в клубеньках гороха, выделяясь растением в качестве ранней реакции на заражение ризобиями (VandenBosch *et al.*, 1989; Rae *et al.*, 1991). Арабиногалактановые белки-экстенсины (АГБ-Э), которые являются частью матрикса инфекционных нитей, в этом исследовании также распознавались антителом MAC265. Локализация этих белков варьировала в зависимости от штамма бактерий, используемого для инокуляции (Рисунок 24). Ожидаемое расположение метки в матрикса инфекционных нитей было обнаружено в клубеньках, индуцированных штаммами AMPS05, AMPS22 и AMPS23 (Рисунок 24Б, Г, Д). В клубеньках гороха, образованных штаммами *R. laguerreae* AMPS04 и AMPS17, наблюдалось аномальное накопление метки в цитоплазме и вокруг вакуолей колонизированных и инфицированных клеток (Рисунок 24А, В). В клубеньках, индуцированных штаммом AMPS34, метка присутствовала в больших количествах в межклеточном пространстве в зоне азотфиксации (Рисунок 24Е).

Матрикс внутри просвета инфекционных нитей содержит материал, который обычно входит в состав внеклеточного матрикса (Gage, 2004). В ответ на ризобиальную инфекцию может стимулироваться выработка и секреция различных соединений, составляющих этот межклеточный матрикс (Цыганова, 2024). Поскольку АГБ-Э прикрепляются к поверхности бактерий посредством ионного связывания и сами по себе подвержены окислительному сшиванию, они могут быть вовлечены в ограничение распространения микробной инвазии (Lerouge, Vanderleyden, 2002). Аномальная локализация метки АГБ-Э в клубеньках, индуцированных AMPS04 и AMPS17, вероятно вызвана неправильным нацеливанием антигена MAC265, которое может осуществляться в рамках активации защитных реакций и, вероятно, служит для подавления колонизации (Tsyganova *et al.*, 2009).

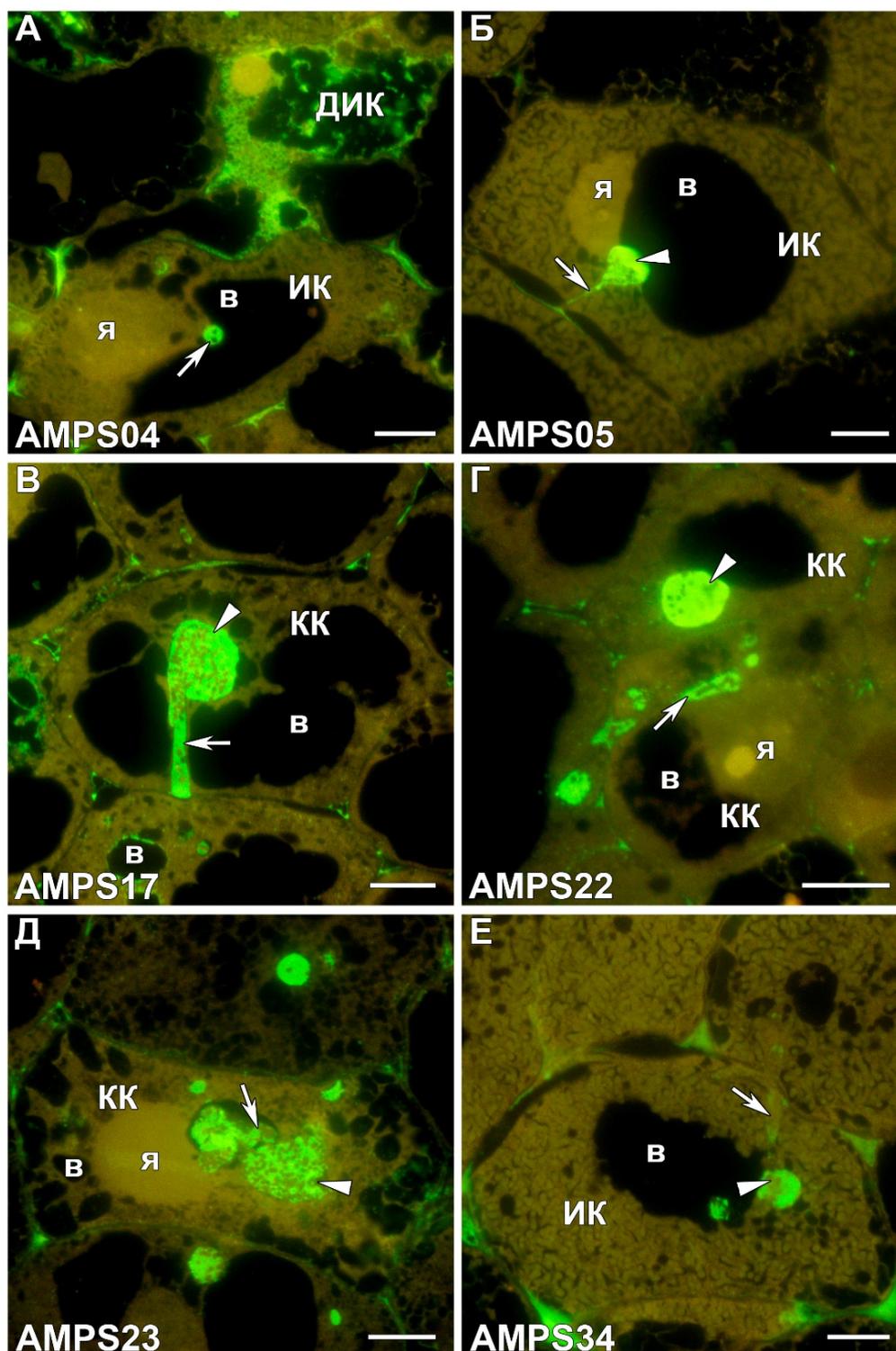


Рисунок 24 — Иммулокализация эпитопа арабиногалактанпротеин-экстенсина, меченного антителом МАС265, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммулокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити, треугольниками — инфекционные капли. Масштабные линейки — 10 мкм.

3.3.5. Симбиотический интерфейс: отложения каллозы и суберина

Как правило, ризобияльная инфекция способствует снижению уровня каллозы в тканях образующихся клубеньков (Gaudioso-Pedraza *et al.*, 2018). Однако в стенках только что инфицированных клеток зоны инфекции и интерзоны в клубеньках, индуцированных штаммом *R. laguerreae* AMPS34, наблюдалось отложение каллозы (Приложение А Рисунок 13Е).

Накопление каллозы в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей ранее наблюдали у мутанта гороха с аномальным развитием инфекционных нитей *RisFixV (sym42)* (Ivanova *et al.*, 2015). Роль отложений каллозы в клеточных стенках может быть связана с поддержанием прямого физического барьера, приводящего к затруднению высвобождения бактерий в растительные клетки (Ivanova *et al.*, 2015), либо с подавлением симпластического транспорта сигнальных факторов через плазмодесмы и нарушением синхронизации программ контроля ризобияльной инфекции и развития клубеньков (Gaudioso-Pedraza *et al.*, 2018). Кроме того, ранее было показано, что нарушения в синтезе различных бактериальных полисахаридов (экзополисахаридов и липополисахаридов) могут вызывать накопление каллозы в стенках клеток коры во время образования псевдоклубеньков, индуцированных мутантами *Sinorhizobium* (Niehaus *et al.*, 1993), а также во время индукции клубеньков мутантами *Rhizobium* (Perotto *et al.*, 1994).

В то же время, ни в одном из проанализированных клубеньков не наблюдалось никаких отклонений в отложении суберина. Суберин был обнаружен только в клеточных стенках эндодермы, как в норме и предполагалось (Hartmann *et al.*, 2002; Venado *et al.*, 2022).

3.3.6. Симбиотический интерфейс: бактериальные липополисахариды

Бактерии внутри инфекционной нити топологически расположены вне клеток растения. Компоненты симбиотического интерфейса, описанные выше, синтезируются растением-хозяином и, как было показано, в значительной степени не зависят от ризобий, колонизирующих корни бобовых растений.

Наблюдаемые различия в первую очередь являются реакцией на установление неэффективного симбиоза и формируются в ответ на конкретного микросимбионта. Модификации бактериальной клеточной поверхности, напротив, находятся под контролем ризобий и играют решающую роль в избегании защитных реакций растения-хозяина (Carlson *et al.*, 2010). Модификации затрагивают внеклеточные, капсульные и липополисахариды, циклические глюканы и липохитоолигосахариды (De Castro *et al.*, 2008; Gibson *et al.*, 2008; Oldroyd, Downie, 2008).

В данном исследовании анализировались антитела на различные эпитопы ризобияльных ЛПС: MAC300 — на конститутивно экспрессирующийся эпитоп ЛПС штамма *R. johnstonii* 3841 (Kannenberg *et al.*, 1992), MAC301 — на экспрессирующийся только в клубеньке эпитоп ЛПС (Kannenberg *et al.*, 1992) и JIM32, который реагирует с широким спектром форм ЛПС штамма 3841 (Lucas *et al.*, 1996). Результаты анализа представлены в Таблице 4, где «+» обозначает сильное свечение метки, «+/-» — слабое, «-» — отсутствие метки.

Таблица 4 — Иммунолокализация бактериальных липополисахаридов

Штамм	MAC300	MAC301	JIM32
<i>R. johnstonii</i> 3841	+	+/-	+
<i>R. ruizarguesonis</i> RCAM1026	-	-	+
<i>R. laguerreae</i> AMPS04	-	-	+
<i>R. laguerreae</i> AMPS05	-	-	+
<i>R. laguerreae</i> AMPS17	-	-	+
<i>R. laguerreae</i> AMPS22	-	-	+
<i>R. laguerreae</i> AMPS23	-	-	+
<i>R. laguerreae</i> AMPS34	-	-	+

В ходе экспериментальной работы только антитело JIM32 показало стабильное мечение всех анализируемых образцов, что подразумевает выявление консервативного эпитопа, общего для видов *R. johnstonii*, *R. ruizarguesonis* и *R. laguerreae*. Ранее демонстрировалась высокая активность этих

антител в отношении ЛПС из разнообразных штаммов *Rhizobium* (Lucas *et al.*, 1996). В свою очередь, антитела MAC300 и MAC301 позволили локализовать эпитопы только в образцах, инокулированных *R. johnstonii* 3841, что говорит о крайне ограниченной возможности применения данных антител в анализе ЛПС ризобий. Проведенный иммуноцитохимический анализ не позволил установить уникальные маркеры, которые бы отличали отдельные штаммы *R. laguerreae*, хотя различная структура ЛПС для этих штаммов все же предполагается (Kirichek *et al.*, 2025). В частности, ожидаемо нарушение функционирования у штаммов AMPS04, AMPS17, AMPS22 и AMPS23 белка WreM (обладающего обеими метил и гликозилтрансферазной активностями (Ojeda *et al.*, 2010) и участвующего в модификации ЛПС), что, как было показано, может определять задержку в образовании клубеньков, способствовать снижению активности нитрогеназы, или вовсе приводить к формированию псевдоклубеньков с abortированной колонизацией (Noel *et al.*, 2004).

Хорошо известно, правильно структурно организованные ЛПС, синтезируемые ризобиями, способствуют симбиозу (Dazzo *et al.*, 1991). Делеция части О-антигена ЛПС, напротив, ингибирует симбиотический фенотип, как показано для *S. fredii*, *B. japonicum*, *R. etli*, *R. phaseoli* и *R. leguminosarum* (Cava *et al.*, 1989; Noh *et al.*, 2015; Di Lorenzo *et al.*, 2020). При этом интенсивность защитного ответа хозяина напрямую коррелирует со степенью модификации ЛПС микросимбионта (Perotto *et al.*, 1994). У ЛПС-мутантов *R. leguminosarum* высвобождение бактерий из инфекционных нитей снижается или полностью блокируется на стадии выхода (de Maagd *et al.*, 1989; Brewin, 1991). Таким образом, данные могут указывать на то, что именно различия в структуре ЛПС анализируемых штаммов ризобий вносят вклад в наблюдаемые симбиотические фенотипы, опосредуют нарушения дифференцировки бактерий в бактериоды, снижение активности нитрогеназы в клубеньках, являются причиной активации защитных реакций в некоторых парах симбионт–хозяин.

3.3.7. Транскриптомный анализ клубеньков

Для анализа дифференциальной экспрессии генов гороха в клубеньке были выбраны максимально контрастные варианты — образцы инокулированные штаммами AMPS04 и AMPS05. Результаты секвенирования РНК представлены в Таблице 5.

Таблица 5 — Результаты выделения и секвенирования РНК из клубеньков

Образец-повторность	AMPS04-1	AMPS04-2	AMPS04-3	AMPS05-1	AMPS05-2	AMPS05-3
Кол-во РНК (мг)	0,425	0,27	0,452	15,648	14,292	4,429
Число целостности РНК	8,2	8,6	8,2	7,6	6,4	8,5
Кол-во «сырых» прочтений	54470357	72256262	63805573	63059301	58274323	58576490
Оценка качества Q30 (%)	96,55	97,42	96,9	96,9	96,48	96,91

Сравнение с использованием анализа главных компонент показало хорошее разделение исследуемых образцов различной инокуляции с биологическими репликами, группирующимися вместе. Иерархическая кластеризация с использованием расстояний между образцами также показала отчетливую группировку биологических реплик в пределах образцов.

Установлено, что в анализируемых клубеньках, индуцированных AMPS04, по сравнению с клубеньками, индуцированными AMPS05, из 26411 аннотированных генов значительно повышали свою экспрессию 2924 гена, значительно понижали — 1428 генов, при заданном пороге \log_2 кратности изменений. В общей сложности с использованием DAVID было воссоздано 145 кластеров функциональной аннотации генов, значительно повышающих экспрессию, и 80 кластеров генов, значительно ее понижающих.

Среди генов, повышающих свою экспрессию при инокуляции штаммом AMPS04, по сравнению с инокуляцией штаммом AMPS05, обнаружены группы, вовлеченные в процесс ранней инфекции. Среди них кластеры: «биосинтез флавоноидов» (в терминах генной онтологии (англ. Gene Ontology, GO) GO:0009813) — уровень обогащения 4,59 (среднее геометрическое значение по

отрицательной логарифмической шкале p -значений членов в соответствующем кластере); «кальмодулин-связывающие белки» (записи InterPro: IPR046829, IPR046830, IPR046831) — уровень обогащения 2,58; «цитокинин дегидрогеназы» (GO:0019139), индуцируются Nod-факторами (Reid *et al.*, 2016) — уровень обогащения 1,55; а также «транспорт молибдат-ионов» (GO:0015689) — уровень обогащения 0,94 и ряд других. Однако, наиболее значимые уровни обогащения были присущи кластерам генов, вовлеченным в негативную регуляцию клубенькообразования. Так, кластер «WRKY» (IPR003657) имеет уровень обогащения 27,35. Исследования показывают, что большая часть генов WRKY реагирует на патогены, элиситоры и фитогормоны, связанные с защитой, такие как салициловая кислота (СК) или жасмоновая кислота (ЖК), что подразумевает важную роль семейства генов WRKY в иммунитете растений (Chen *et al.*, 2019). Помимо этого, обнаружены кластер «NAC» (IPR003441) — уровень обогащения 14,47; «AP2/ERF» (IPR001471) — уровень обогащения 12,03; «фасциклин-подобные арабиногалактановые белки» (IPR045003) — уровень обогащения 10,37; «глутатион-S-трансферазы» (IPR036282) — уровень обогащения 7,27; «регуляция сигнального пути, опосредованного ЖК» (GO:2000022) — уровень обогащения 5,09; «сигнальный путь, активируемый абсцизовой кислотой (АБК)» (GO:0009738) — уровень обогащения 1,49; «ингибиторы пектин-эстераз» (код доступа SMART: SM00856) — уровень обогащения 0,92; «субтилизин-подобные протеазы» (IPR041469) — уровень обогащения 0,15.

Белки NAC участвуют в процессах развития растений, но также показано, что они могут выступать как положительные регуляторы старения клубеньков, в частности у *L. japonicus* (Wang *et al.*, 2023).

Домен ERF обнаружен у генов патогенеза, индуцируемых этиленом (Ohme-Takagi, Shinshi, 1995). Этилен действует как негативный регулятор развития клубеньков у большинства Бобовых (Цыганова, Цыганов, 2015). Фитогормоны ЖК, СК и АБК также негативно влияют на развитие и функционирование клубеньков (Цыганова, Цыганов, 2018). ЖК демонстрирует

выраженное ингибирующее действие на ключевые процессы симбиоза. Она подавляет экспрессию генов *ENOD11* и *RIP1*, которые активируются на ранних стадиях симбиотического взаимодействия (Sun *et al.*, 2006). Кроме того, ЖК угнетает кальциевые осцилляции, индуцируемые Nod-фактором, а метилжасмонат, производное ЖК, блокирует скручивание корневых волосков, развитие инфекционных нитей и образование клубеньковых примордиев (Nakagawa, Kawaguchi, 2006). АБК играет важную роль в адаптации растений к различным стрессовым условиям, включая засуху, низкие температуры и засоление (Umezawa *et al.*, 2010). АБК проявляет ингибирующее действие на процесс клубенькообразования, блокирует деление клеток корня, что препятствует формированию примордиев клубеньков (Phillips, 1971).

Фасциклин-подобные арабиногалактановые белки расположены на поверхности клетки, в клеточной стенке или на плазматической мембране, они участвуют в процессах развития, а домены фасциклина являются предполагаемыми доменами клеточной адгезии (He *et al.*, 2019). Показано, что данные белки участвуют в ответе на патогены (Hromadová *et al.*, 2021). В корнях сои увеличение экспрессии генов фасциклин-подобных АГБ было вызвано атакой нематод (Beneventi *et al.*, 2013).

Иммунитет растений, запускаемый РАМР, характеризуется быстрой продукцией активных форм кислорода (АФК), активацией сигнальных каскадов и общим транскрипционным перепрограммированием в пользу защиты. Было показано, что субтилизин-подобные белки активируют защитные гены, а другой особенностью этих белков считается участие в программируемой гибели клеток (Vartapetian *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2011). В свою очередь, глутатион-S-трансферазы являются известными антиоксидантами в клубеньках, и признаны критически важными для защиты клубеньков от АФК (Dalton *et al.*, 2009).

Как можно видеть из анализа, в неэффективных клубеньках, индуцированных штаммом AMPS04, не только активируются защитные реакции, что было описано на гистологическом и ультраструктурном уровнях (см. пункт 3.2.2.), и дополнительно подтвердилось данными этого

транскриптомного исследования, но также активны пути негативной гормональной регуляции клубенькообразования посредством стрессовых фитогормонов.

Среди кластеров генов значимо понизивших свою экспрессию при инокуляции штаммом AMPS04, по сравнению с инокуляцией штаммом AMPS05, помимо прочих были обнаружены: кластеры генов гистонов с кодами доступа SM00417, SM00414, SM00427 — уровни обогащения 29,74, 16,89 и 14,92, соответственно; кластер «леггемоглобин-подобные» (IPR001032) — уровень обогащения 13,08; «циклины» (SM00385) — уровень обогащения 4,59; «MCM комплекс» (GO:0042555) репликации ДНК — уровень обогащения 3,8; а также кластер, содержащий гены ингибиторы фруктозидаз и пектин-эстераз (SM00856) — уровень обогащения 1,56; и кластеры генов с термином GO «активность полигалактуроназ» (GO:0004650) — уровень обогащения 1,16 и «активность пектин-эстераз» (GO:0030599) — уровень обогащения 0,65.

Обобщая, среди генов значимо понижающих свою экспрессию, помимо генов, очевидно связанных с образованием клубеньков, таких как гены биосинтеза леггемоглобинов, ENOD5 (арабиногалактанопоподобный белок, участвующий в инфекции (Scheres *et al.*, 1990)) или Nodulin-26 (специфичный для клубеньков канал в симбиосомной мембране (Dean *et al.*, 1999)) находятся гены гистонов, циклины, а также гены, кодирующие факторы репликации. Полученные данные могут свидетельствовать о меньшей активности меристем и транскрипционной активности маленьких клубеньков, индуцированных AMPS04, что подтверждается исходя из их морфологии (Kirichek *et al.*, 2026).

Помимо описанного выше, в ходе анализа генов, участвующих в модификации клеточных стенок, был идентифицирован 121 дифференциально экспрессируемый ген с предсказанной внеклеточной локализацией и аннотацией CAZY: 84 гена с повышенной экспрессией и 37 генов с пониженной экспрессией (Рисунок 25). Среди них несколько семейств CAZY были значительно перепредставлены: AA1, GH16, AA2 и GH1 для генов с повышенной экспрессией и GH28 для генов с пониженной экспрессией (Рисунок 25А). Следует отметить,

что большая часть генов в семействе AA1 были гомологами генов лакказы 4 и 17 у арабидопсиса. Было показано, что при отключении этих генов у арабидопсиса уровень лигнификации существенно снижался (Berthet *et al.*, 2011). Еще одним чрезмерно представленным семейством было AA2, состоящее из пероксидаз. Хотя известно, что пероксидазы индуцируются как часть защитной реакции растений (Almagro *et al.*, 2008), сообщалось также о том, что некоторые пероксидазы совместно с лакказами локализуются во вторичной клеточной стенке арабидопсиса (Hoffmann *et al.*, 2020). Широко представленные члены GH16 были отмечены как вероятные белки ксилоглюканэндотрансглюкозилазы/гидролазы. Эти ферменты способствуют пластичности клеточной стенки и участвуют в ее ремоделировании. Недавно было высказано предположение, что эти ферменты не только участвуют в делении клеток посредством разрыхления клеточных стенок, но и участвуют в реакции на биотические стрессы (Ishida, Yokooyama, 2022). В совокупности полученные данные еще раз подчеркивают вероятные защитные реакции, возникающие в неэффективных клубеньках при инокуляции штаммом *R. laguerreae* AMPS04 по сравнению с эффективными индуцированными AMPS05.

Для генов, кодирующих гликопротеины богатые гидроксипролином (Рисунок 25Б), 14 имели повышенную экспрессию (5 GPI-AGP, 4 CL-EXT, 3 МААВ, 2 non GPI-AGP), в то время как 3 — пониженную (2 non GPI-AGP, 1 МААВ).

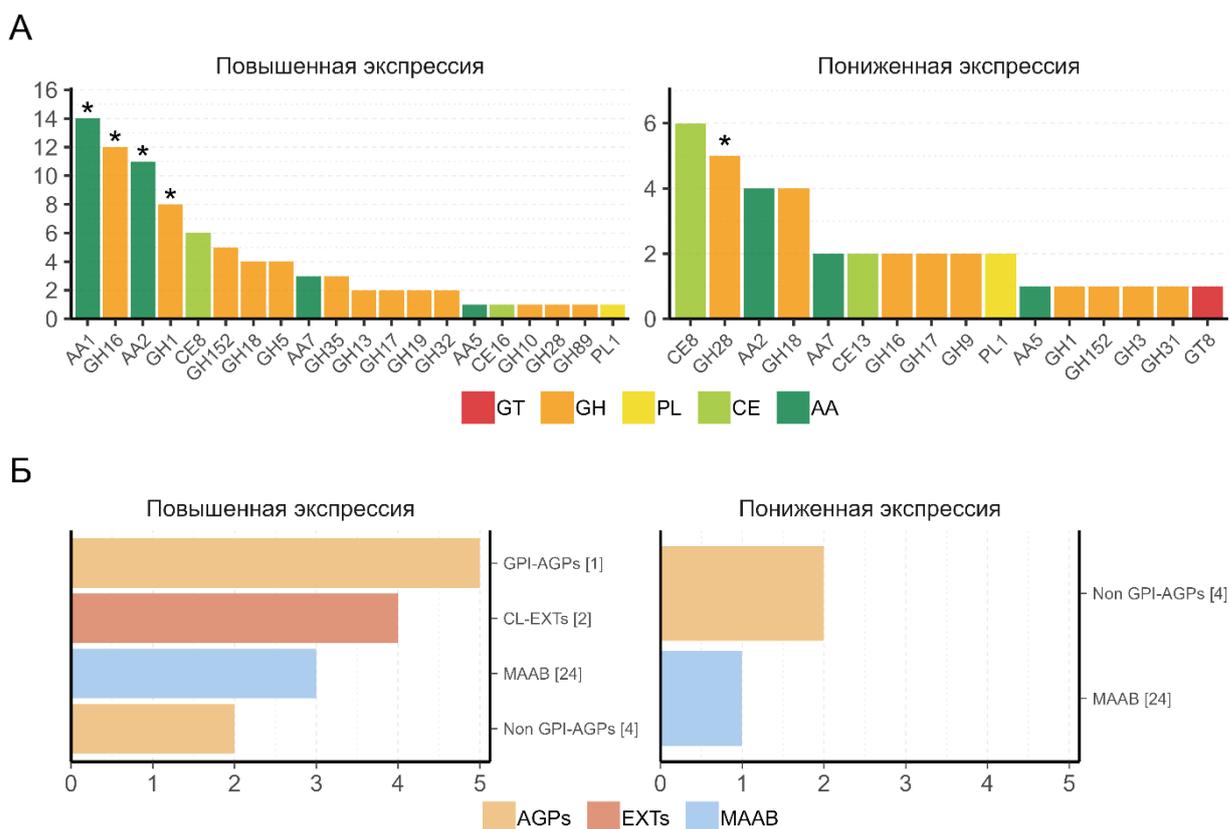


Рисунок 25 — Количество дифференциально экспрессирующихся генов из изученных групп в клубеньках *Pisum sativum*, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS04 по сравнению с индуцированными штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS05

А — гены активных в отношении углеводов ферментов с внеклеточной локализацией, Б — гены гидроксипролин-богатых белков. Звездочки указывают на значимо обогащенные семейства. GT — гликозилтрансферазы; GH — гликозидгидролазы; PL — полисахарид-лиазы; CE — эстеразы углеводов; AA — вспомогательные активности. GPI-AGP — арабиногалактановые белки с гликозилфосфатидинозитоловым якорем; CL-EXTs — экстенсины, способные к поперечным сшивкам; MAAB — белки, содержащие менее 15% мотивов, характерных для гидроксипролин-богатых белков. Числа в квадратных скобках обозначают номер класса.

3.4. Влияние окружающей среды

Для оценки влияния факторов окружающей среды на симбиотическую совместимость растения сорта Rondo выращивались в вегетационных домиках, в которых динамически изменялся режим температуры. Измерения температуры субстрата в горшках в ходе эксперимента показали, что значение температуры в отдельные дни превышало 30°C (Kirichek *et al.*, 2024b). Учитывая, что питательный раствор FP был лишен источников доступного азота, а повышенная

температура субстрата создавала экстремальные условия, симбиотические партнеры вынуждены были демонстрировать максимальную совместимость для успешного взаимодействия.

Розовые клубеньки, индуцированные штаммом *R. johnstonii* 3841, имели типичную гистологическую организацию и состояли из трех выраженных зон (Vasse *et al.*, 1990): меристемы (зона I), зоны инфекции (зона II) и зоны азотфиксации (зона III) (Приложение А Рисунок 14). В неинфицированных клетках зоны азотфиксации наблюдалось накопление гранул крахмала (Приложение А Рисунок 14Г).

В розовых клубеньках округлой формы, индуцированных штаммом *R. laguerreae* AMPS17, наблюдали все три четко представленные гистологические зоны (Приложение А Рисунок 15А, Б); зона азотфиксации содержала много крупных инфицированных клеток, подобных тем, которые наблюдались в клубеньках, индуцированных штаммом *R. johnstonii* 3841 (Приложение А Рисунки 14Г, 15Г). Однако отмечено интенсивное накопление гранулы крахмала в клетках клубенька (Приложение А Рисунок 15Г).

После инокуляции штаммом AMPS23 были обнаружены розовые клубеньки, а также округлые белые, которые, по-видимому, были неэффективными (Рисунок 26). Гистологический анализ розовых клубеньков выявил формирование всех гистологических зон (Рисунок 26Б-Г). Зона азотфиксации была представлена крупными вытянутыми клетками, плотно заполненными симбиосомами (Рисунок 26Г). Каких-либо признаков дегенерации симбиотических структур обнаружено не было, хотя наблюдалось накопление крахмала (Рисунок 26Г). Ранее ни в одном из экспериментов штамм AMPS23 не формировал клубеньки без выраженной дегенерации симбиотических структур и клеток.

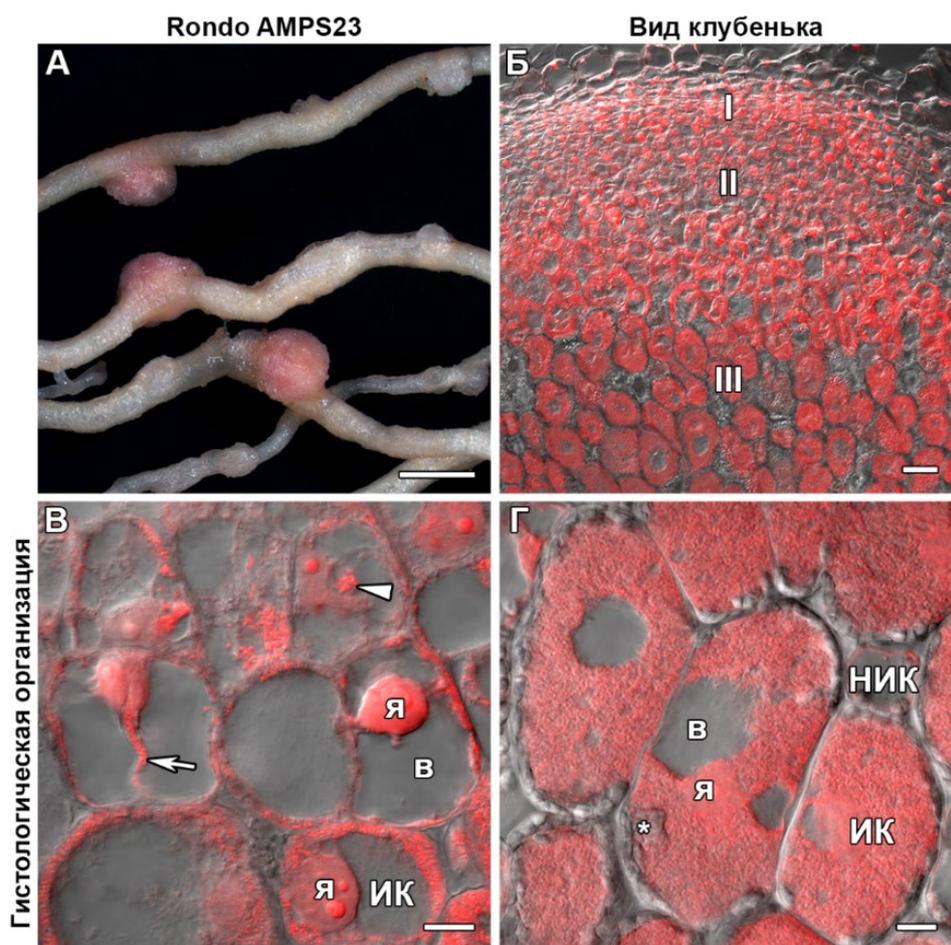


Рисунок 26 — Общий вид и гистологическая организация трехнедельных клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS23

Совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации; я — ядро; в — вакуоль; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; звездочкой (*) обозначены гранулы крахмала; стрелка указывает на инфекционную нить; наконечник стрелки — на инфекционную каплю. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В, Г — 10 мкм.

Клубеньки, индуцированные штаммом AMPS05, были слегка удлинённые и бледно-розовые (Приложение А Рисунок 16А). Они имели интактную зональность без каких-либо видимых отклонений (Приложение А Рисунок 16Б–Г). Однако в зоне азотфиксации было обнаружено сравнительно небольшое количество крупных инфицированных клеток, содержащих симбиосомы (в отличие от клубеньков, индуцированных штаммом *R. johnstonii* 3841). В дополнение к этому цитоплазма инфицированных клеток выглядела «ажурной», то есть перибактероидные пространства в симбиосомах были увеличены. В

клубеньках присутствовало значительное количество клеток, содержащих гранулы крахмала (Приложение А Рисунок 16Г).

Во время эксперимента было обнаружено что штаммы AMPS34, AMPS04 и AMPS22 индуцируют круглые белые, вероятно, неэффективные клубеньки (Рисунок 27А, Приложение А Рисунки 17А, 18А). Гистологическая структура клубеньков, индуцированных штаммом AMPS04, оказалась аномально организованной (Приложение А Рисунок 17Б). В таких клубеньках зона инфекции была увеличена. Большая часть центральной ткани клубенька содержала неинфицированные клетки, заполненные многочисленными инфекционными нитями и увеличенными инфекционными каплями, из которых высвобождение ризобий было затруднено (Приложение А Рисунок 17В). Вместо истинной зоны азотфиксации обнаруживалась зона, заполненная неинфицированными клетками и клетками, в которых бактериоды быстро дегенерировали. Как инфицированные, так и неинфицированные клетки были заполнены гранулами крахмала (Приложение А Рисунок 17Г).

В клубеньках, индуцированных штаммом AMPS34, зона инфекции и зона, соответствующая зоне азотфиксации (зона III'), были представлены (Рисунок 27Б–Г). Большинство клеток в зоне III' содержали небольшое количество симбиосом в тонком слое цитоплазмы, которая казалась уплотненной. Кроме того, было отмечено, что в клубеньках, индуцированных AMPS34, бактериоды подверглись преждевременной дегенерации, а большое количество крахмала откладывалось в тканях (Рисунок 27Г).

В случае инокуляции штаммом AMPS22 обнаруживались одиночные бледно-розовые клубеньки и множество округлых белых, в белых клубеньках не было зоны, соответствующей зоне азотфиксации, клетки не дифференцировались в азотфиксирующие (Приложение А Рисунок 18Б–Г). Такие клетки были заполнены одиночными симбиосомами со слабодифференцированными бактериодами. Кроме того, в этих клетках образовались многочисленные мелкие вакуоли, что является следствием

действия стрессовых условий. Гранулы крахмала накапливались в неинфицированных клетках (Приложение А Рисунок 18Г).

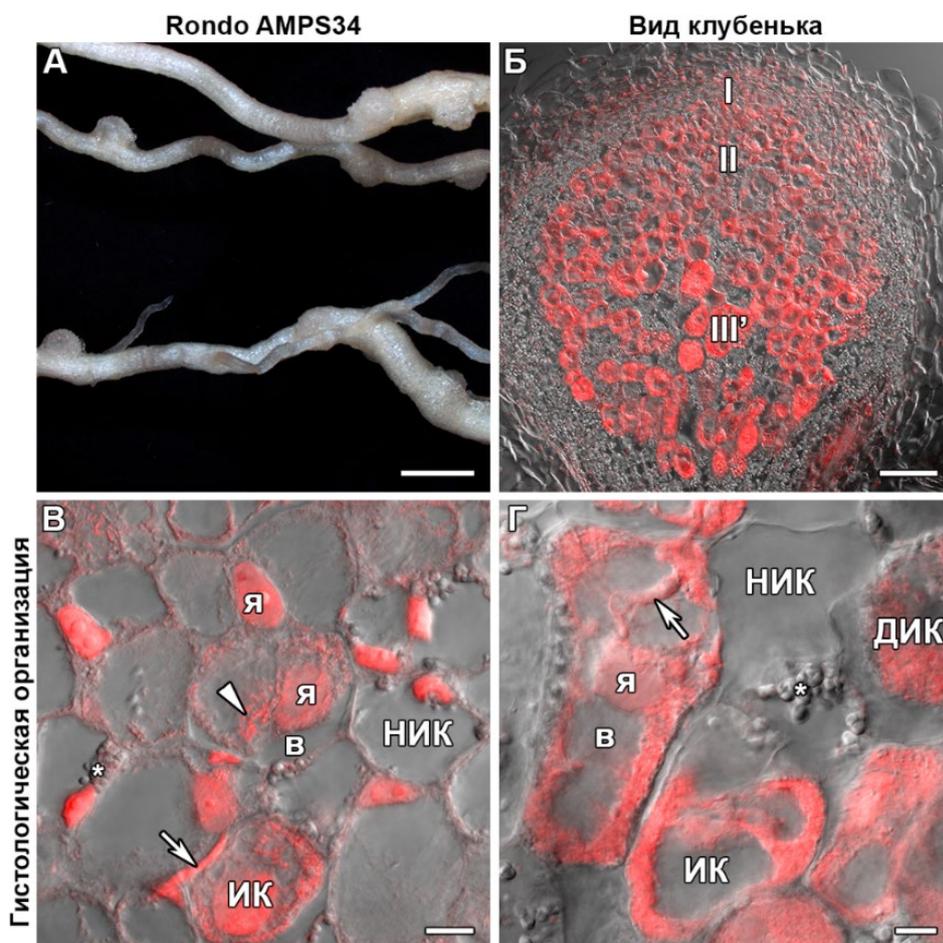


Рисунок 27 — Общий вид и гистологическая организация трехнедельных клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS34

Совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (ДИС) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III' — зона, соответствующая зоне азотфиксации; я — ядро; в — вакуоль; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка; звездочкой (*) обозначены гранулы крахмала; стрелки указывает на инфекционные нити; наконечник стрелки — на инфекционную каплю. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В, Г — 10 мкм.

Как сообщалось ранее, неподходящие температуры отрицательно влияют на выживаемость, конкурентоспособность и рост ризобий (Khan *et al.*, 2021). Поддержание внутриклеточного гомеостаза ризобий, включая pH, температуру и концентрацию ионов, имеет решающее значение для азотфиксации посредством активности нитрогеназы и тесно связано с правильной гистологической структурой и функционированием симбиотических клубеньков

(Li, Li, 2023). Процесс колонизации корней был описан как наиболее чувствительный к действию температуры, поскольку неоптимальная температура снижает количество клубеньков, из-за нарушенного прикрепления бактерий к корневым волоскам и образования инфекционных нитей (Hungria, Franco, 1993; Zhang, Smith, 1996; Yuan *et al.*, 2020). Высокие температуры могут препятствовать образованию клубеньков, уменьшать количество примордиев клубеньков и изменять адгезию бактерий к корневым волоскам гороха (Frings, 1976). Ранее было установлено, что высокие температуры в корневой зоне нарушают рост инфекционных нитей и дифференцировку бактерий в азотфиксирующие бактериоиды у *Trifolium subterraneum* L. (Roughley, 1970; Pankhurst, Gibson, 1973). В клубеньках *Trifolium pratense* L., подвергнутых воздействию высокой температуры, сохранность ткани, заполненной бактериоидами, снижалась (Roughley *et al.*, 1981).

В этом исследовании в клубеньках, индуцированных штаммами AMPS04 и AMPS22, наблюдалось нарушение инфекционного процесса, приводящее к редкому выходу бактерий в цитоплазму клеток хозяина, образованию большого количества неинфицированных клеток и аномальной дифференцировке бактериоидов (Приложение А Рисунки 17В, Г, 18В, Г). В результате зона, соответствующая зоне азотфиксации, не образовалась (Приложение А Рисунки 17Б, 18Б).

Раннее старение клубеньков гороха, которое приводит к преждевременной дегенерации симбиотических структур и клеток, наблюдалось при воздействии различных стрессовых факторов, в том числе кадмия и фунгицидов (Tsyganova *et al.*, 2019c; Gorshkov *et al.*, 2020; Gorshkov *et al.*, 2023). Недавно было показано, что воздействие повышенных температур на растения гороха, инокулированных штаммом *R. johnstonii* 3841 вызывает необычное апикальных старение (Serova *et al.*, 2023). Кроме того, сообщалось о полной дегенерации симбиотических структур в мелких белых клубеньках гороха линии Sprint-2 в сочетании с неэффективным симбионтом *R. leguminosarum* sv. *viciae* CIAM1064, выращенных в тепличных условиях (Borisov *et al.*, 1992). В этом исследовании

быстрая дегенерация бактериоидов наблюдалась в клубеньках, индуцированных штаммами AMPS34 (Рисунок 27Б, Г) и AMPS04 (Приложение А Рисунок 17Б, Г).

Важно отметить, что при инокуляции штаммом AMPS23 установлено частичное восстановление симбиотического фенотипа. Так, часть клубеньков характеризовались розовой окраской и полноценной развитой зоной азотфиксации без явных признаков дегенерации симбиотических структур (Рисунок 26А, Б), что отличает эти данные от полученных ранее в лабораторных условиях (Рисунок 19А). Данный факт указывает на то, что иногда окружающая среда может сыграть ключевую роль в совместимости партнеров. По-видимому, повышение температуры может восстанавливать инфекцию, как описано для подземного клевера при клубенькообразовании с *R. leguminosarum* sv. *trifolii* ANU794 (de Boer, Djordjevic, 1995). Однако мы также наблюдали противоположный эффект, поскольку растения, инокулированные штаммом AMPS34, образовывали только белые клубеньки без истинной зоны азотфиксации (Рисунок 27А, Б) в отличие от удлинённых розовых, которые обнаруживались ранее в ходе лабораторных экспериментов (Рисунок 16А).

Следует отметить, что в ходе исследования наблюдалось обильное накопление гранул крахмала как в неинфицированных, так и в инфицированных клетках в клубеньках, индуцированных всеми штаммами *R. laguerreae* (Рисунки 26Г, 27Г, Приложение А Рисунки 15Г, 16Г, 17В–Г, 18Г). Прежде уже было продемонстрировано отложение крахмала в клетках клубеньков в ответ на воздействие экстремальных температур (Dart, Mercer, 1965). Кроме того, отложение крахмала является одним из хорошо известных признаков неэффективности образованных клубеньков (Forrest *et al.*, 1991).

Заключение

Азотфиксирующий симбиоз между бобовыми культурами и ризобиями играет ключевую роль в развитии устойчивого сельского хозяйства, позволяя сократить использование минеральных удобрений и снизить нагрузку на окружающую среду. В сельском хозяйстве биологические процессы формируют комплексную систему, где генетические особенности растений, экологические условия и почвенный микробиом образуют единую взаимосвязанную сеть. Несмотря на то, что симбиотические отношения между Бобовыми и ризобиями достаточно стабильны благодаря эволюционно развитым механизмам контроля и координации взаимодействия, этот баланс остается хрупким и напрямую зависит как от генотипов обоих партнеров, так и от факторов среды. Симбиотическая совместимость служит связующим звеном между генетическими и экологическими факторами и определяет конечный результат взаимодействия — эффективным или неэффективным симбиоз.

Проведенное исследование было посвящено изучению симбиотической совместимости между различными штаммами бактерий *Rhizobium* и растениями гороха. Выявлена значительная вариабельность симбиотической совместимости в системе *R. laguerreae* – горох посевной. Обнаружены как эффективные, так и неэффективные ассоциации между конкретными штаммами бактерий и генотипами растений. По результатам работы можно выделить несколько характеристик симбиотической совместимости в бобово-ризобииальном симбиозе. Полная симбиотическая совместимость должна отвечать следующим критериям:

- морфологические (розовый цвет клубеньков; удлиненная форма клубеньков; отсутствие признаков азотного голодания);
- цитологические (правильная гистологическая зональность; нормальное развитие инфекционных нитей; выход бактерий из инфекционных капель; правильная дифференцировка бактериоидов;

отсутствие цитологических маркеров активации защитных реакций;
отсутствие преждевременного старения клубенька);

- физиолого-биохимические (эффективная фиксация азота);
- молекулярные (правильная перестройка компонентов симбиотического интерфейса; отсутствие активности генов, вовлеченных в защитные реакции растений или ответы на биотические стрессы).

Установлено, что сорт Rondo демонстрировал наибольшую восприимчивость к инокуляции ризобиями, а штамм *R. laguerreae* AMPS05 проявил максимальную эффективность. Полученные результаты подчеркивают необходимость тщательного анализа различных сортов гороха, а также, вероятно, других бобовых культур при подборе комплементарных штаммов микросимбионтов. При этом следует учитывать условия окружающей среды, в которых будет формироваться симбиоз: температурный режим почвы; влажность; pH; наличие питательных веществ; конкуренцию с почвенными микроорганизмами и другие. Подбор эффективных пар растений и ризобий для выращивания в полевых условиях представляет сложную задачу, требующую проведения обширных исследований.

В дальнейшем видится целесообразным разработать новые методы отбора высокоэффективных штаммов для конкретных сортов гороха, принимая во внимание полученные в ходе работы данные о симбиотической совместимости. Только комплексный подход к оценке всех факторов симбиотической совместимости позволит создать оптимальные пары, способные обеспечить максимальную эффективность азотфиксации в агросистемах.

Выводы

1. На основании данных секвенирования полных геномов, анализируемые штаммы *Rhizobium laguerreae* отнесены к трем геновидам в пределах комплекса видов *Rhizobium leguminosarum*: AMPS22 — к геновиду N; AMPS05 и AMPS34 — к геновиду O; AMPS04, AMPS17 и AMPS23 — к геновиду R. Только штаммы AMPS04, AMPS17 и AMPS23 могут рассматриваться как *R. laguerreae sensu stricto*.

2. Выявлены аномалии гистологической и ультраструктурной организации симбиотических клубеньков гороха посевного различных генотипов, определяющие формирование неэффективного симбиоза с *R. laguerreae*: аномалии, связанные со структурой инфекционных нитей — для штаммов AMPS04, AMPS17, AMPS22, AMPS23; с поддержанием структуры симбиосом — для всех анализируемых штаммов.

3. Установлено, что штамм *R. laguerreae* AMPS05 может рассматриваться как наиболее совместимый микросимбионт, обеспечивающий значимый прирост биомассы и накопление азота растениями гороха посевного.

4. Показаны признаки активации защитных реакций, индуцируемые штаммами *R. laguerreae* в клубеньках: отложение каллозы при инокуляции штаммом AMPS34; повышение уровней экспрессии генов, вовлеченных в защитные реакции, и понижение уровней экспрессии генов, участвующих в клубенькообразовании, при инокуляции AMPS04.

5. Выявлены нарушения молекулярного взаимодействия между партнерами при формировании симбиотической поверхности: штаммы AMPS04 и AMPS23 не вызывают дезтерификацию гомогалактуронанов в инфицированных клетках и не индуцируют накопление арабиногалактанового белка-маркера в ювинильных симбиосомах; штаммы AMPS04, AMPS17 и AMPS34 вызывают аномальную секрецию арабиногалактанпротеин экстенсина матрикса в межклетники; штамм AMPS34 стимулирует отложение каллозы в стенках инфицированных клеток.

6. Пластичность симбиотического фенотипа зависит от условий среды; для штамма *R. laguerreae* AMPS23 установлено восстановление симбиотического фенотипа части клубеньков в условиях динамического повышения температуры; для штамма AMPS34 показан обратный эффект.

Список сокращений

- ABB — блокирующий буфер Амершема (англ. Amersham blocking buffer);
- ANI — средняя идентичность нуклеотидов (сокр. англ. Average Nucleotide Identity);
- BSA — бычий сывороточный альбумин;
- BSA-C — ацелированный BSA;
- CCRC-M — антитела из серии «Complex Carbohydrate Research Center-Monoclonal»;
- JIM — антитела из серии «John Innes Monoclonal»;
- LM — антитела из серии «Leeds Monoclonal»;
- MAC — антитела из серии ECACC («European collection of authenticated cell cultures»);
- ONT — технология секвенирования Oxford Nanopore Technologies;
- OrthoANI — средняя идентичность нуклеотидов ортологов (сокр. англ. Orthologous Average Nucleotide Identity);
- PBS — фосфатный буфер;
- Rlc — комплекс видов *Rhizobium leguminosarum* (англ. *Rhizobium leguminosarum* complex);
- TBS — трис-буферный физиологический раствор;
- АГБ — арабиногалактановый белок;
- АГБ-Э — арабиногалактановый белок-экстенсин;
- ГГ — гомогалактуронан;
- дни — день после инокуляции;
- ЛПС — липополисахариды;
- РГ-I — рамногалактуронан I.

Список литературы

1. Иванова К.А., Цыганов В.Е. Защитные реакции в бобово-ризобиальном симбиозе: индукция и супрессия (обзор) // Сельскохозяйственная биология. — 2014. № 3. — С. 3-12.
2. Проворов Н.А., Андронов Е.Е. Геномная эволюция α -протеобактерий в системе симбиоза // Микробиология. — 2024. — Т. 93, № 6. — С. 679-689.
3. Цыганова А.В. Симбиотический интерфейс в развитии клубеньков Бобовых: Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук; Санкт-Петербургский государственный университет. — Санкт-Петербург, 2024.
4. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. Сообщение I. Этилен (обзор) // Сельскохозяйственная биология. — 2015. — Т. 50, № 3. — С. 267-277.
5. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. II. Салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты // Сельскохозяйственная биология. — 2018. — Т. 53, № 1. — С. 3-14.
6. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Растительная клеточная стенка в симбиотических взаимодействиях. Пектины // Сельскохозяйственная биология. — 2019. — Т. 54, № 3. — С. 446-457.
7. Abdian P.L., Caramelo J.J., Ausmees N., Zorreguieta A. RapA2 is a calcium-binding lectin composed of two highly conserved cadherin-like domains that specifically recognize *Rhizobium leguminosarum* acidic exopolysaccharides // Journal of Biological Chemistry. — 2013. — V. 288, № 4. — P. 2893-2904.
8. Acosta-Jurado S., Alias-Villegas C., Navarro-Gómez P., Almozara A., Rodríguez-Carvajal M.A., Medina C., Vinardell J.-M. *Sinorhizobium fredii* HH103 *syrM* inactivation affects the expression of a large number of genes, impairs nodulation with soybean and extends the host-range to *Lotus japonicus* // Environmental Microbiology. — 2020. — V. 22, № 3. — P. 1104-1124.
9. Adams V., Li J., Wisniewski J.A., Uzal F.A., Moore R.J., McClane B.A., Rood J.I. Virulence plasmids of spore-forming bacteria // Microbiology Spectrum. — 2014. — V. 2, № 6. — Art. 2.6.04.
10. Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system // Canadian Journal of Microbiology. — 2008. — V. 54, № 10. — P. 876-886.
11. Afonin A., Sulima A., Zhernakov A., Zhukov V. Draft genome of the strain RCAM1026 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // Genom Data. — 2017. — V. 11. — P. 85-86.
12. Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barceló A., Pedreño M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions // Journal of Experimental Botany. — 2008. — V. 60, № 2. — P. 377-390.
13. Alunni B., Gourion B. Terminal bacteroid differentiation in the legume-rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond // New Phytologist. — 2016. — V. 211, № 2. — P. 411-417.

14. Andrews M., Andrews M.E. Specificity in legume-rhizobia symbioses // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2017. — V. 18, № 4. — Art. 705.
15. Andrews M., De Meyer S., James E.K., Stępkowski T., Hodge S., Simon M.F., Young J.P.W. Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance // *Genes*. — 2018. — V. 9, № 7. — Art. 321.
16. Andrews S. FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. — 2010. — URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (дата обращения: 20 мая 2025).
17. Andronov E.E., Aksenova T.S., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Safronova V.I., Pinaev A.G., Evsyukov I.V., Provorov N.A. Strain-specific markers of rhizobia according to whole genome sequencing data // *Microbiology*. — 2025. — V. 94, № 1. — P. 29-37.
18. Arnold W., Rump A., Klipp W., Priefer U.B., Pühler A. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* // *Journal of Molecular Biology*. — 1988. — V. 203, № 3. — P. 715-738.
19. Barnett M.J., Long S.R. The *Sinorhizobium meliloti* SyrM regulon: effects on global gene expression are mediated by *syrA* and *nodD3* // *Journal of Bacteriology*. — 2015. — V. 197, № 10. — P. 1792-1806.
20. Basile L.A., Lepek V.C. Legume-rhizobium dance: an agricultural tool that could be improved? // *Microbial Biotechnology*. — 2021. — V. 14, № 5. — P. 1897-1917.
21. Batstone R.T., Dutton E.M., Wang D., Yang M., Frederickson M.E. The evolution of symbiont preference traits in the model legume *Medicago truncatula* // *New Phytologist*. — 2017. — V. 213, № 4. — P. 1850-1861.
22. Becker A., Bergès H., Krol E., Bruand C., Rüberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe F., de Bruijn F.J. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2004. — V. 17, № 3. — P. 292-303.
23. Beneventi M.A., da Silva O.B., de Sá M.E.L., Firmino A.A.P., de Amorim R.M.S., Albuquerque É.V.S., da Silva M.C.M., da Silva J.P., Campos M.d.A., Lopes M.J.C., Togawa R.C., Pappas G.J., Grossi-de-Sa M.F. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction // *BMC Genomics*. — 2013. — V. 14, № 1. — Art. 322.
24. Beringer J.E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* // *Journal of General Microbiology*. — 1974. — V. 84, № 1. — P. 188-198.
25. Berrabah F., Benaceur F., Yin C., Xin D., Magne K., Garmier M., Gruber V., Ratet P. Defense and senescence interplay in legume nodules // *Plant Communications*. — 2024. — V. 5, № 4. — Art. 100888.
26. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads // *Molecular Biology and Evolution*. — 2014. — V. 31, № 5. — P. 1077-1088.

27. Berthet S., Demont-Caulet N., Pollet B., Bidzinski P., Cézard L., Le Bris P., Borrega N., Hervé J., Blondet E., Balzergue S., Lapierre C., Jouanin L. Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems // *The Plant Cell*. — 2011. — V. 23, № 3. — P. 1124-1137.
28. Bittner A.N., Foltz A., Oke V. Only one of five *groEL* genes is required for viability and successful symbiosis in *Sinorhizobium meliloti* // *Journal of Bacteriology*. — 2007. — V. 189, № 5. — P. 1884-1889.
29. Black M., Moolhuijzen P., Chapman B., Barrero R., Howieson J., Hungria M., Bellgard M. The genetics of symbiotic nitrogen fixation: comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters // *Genes*. — 2012. — V. 3, № 1. — P. 138-166.
30. Boivin S., Ait Lahmidi N., Sherlock D., Bonhomme M., Dijon D., Heulin-Gotty K., Le-Queré A., Pervent M., Tauzin M., Carlsson G., Jensen E., Journet E.-P., Lopez-Bellido R., Seidenglanz M., Marinkovic J., Colella S., Brunel B., Young P., Lepetit M. Host-specific competitiveness to form nodules in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* // *New Phytologist*. — 2020. — V. 226, № 2. — P. 555-568.
31. Boivin S., Mahé F., Debellé F., Pervent M., Tancelin M., Tauzin M., Wielbo J., Mazurier S., Young P., Lepetit M. Genetic variation in host-specific competitiveness of the symbiont *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* // *Frontiers in Plant Science*. — 2021. — V. 12. — Art. 719987.
32. Borisov A.Y., Morzhina E.V., Kulikova O.A., Tchetkova S.A., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. New symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) affecting either nodule initiation or symbiosome development // *Symbiosis*. — 1992. — V. 14. — P. 297-313.
33. Bouchnak I., Coulon D., Salis V., D'Andréa S., Bréhélin C. Lipid droplets are versatile organelles involved in plant development and plant response to environmental changes // *Frontiers in Plant Science*. — 2023. — V. 14. — Art. 1193905.
34. Bourassa D.V., Kannenberg E.L., Sherrier D.J., Buhr R.J., Carlson R.W. The lipopolysaccharide lipid A long-chain fatty acid is important for *Rhizobium leguminosarum* growth and stress adaptation in free-living and nodule environments // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2017. — V. 30, № 2. — P. 161-175.
35. Bourcy M., Brocard L., Pislariu C.I., Cosson V., Mergaert P., Tadege M., Mysore K.S., Udvardi M.K., Gourion B., Ratet P. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions // *New Phytologist*. — 2013. — V. 197, № 4. — P. 1250-1261.
36. Bovin A.D., Pavlova O.A., Dolgikh A.V., Leppyanen I.V., Dolgikh E.A. The role of heterotrimeric G-protein beta subunits during nodulation in *Medicago truncatula* Gaertn and *Pisum sativum* L // *Frontiers in Plant Science*. — 2022. — V. 12. — Art. 808573.
37. Brewin N.J. Development of the legume root nodule // *Annual Review of Cell Biology*. — 1991. — V. 7, № 1. — P. 191-226.

38. Brewin N.J. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes // *The Rhizobiaceae*. — Dordrecht: Springer, 1998. — P. 417-429.
39. Brewin N.J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis // *Critical Reviews in Plant Sciences*. — 2004. — V. 23, № 4. — P. 293-316.
40. Brewin N.J., Rae A.L., Perotto S., Knox J.P., Roberts K., LeGal M.F., Sindhu S.S., Wood E.A., Kannenberg E.L. Immunological dissection of the plant-microbe interface in pea nodules // *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives* / Gresshoff P. M. et al. — Boston, MA: Springer US, 1990. — P. 227-234.
41. Bruneau A., Doyle J.J., Herendeen P., Hughes C., Kenicer G., Lewis G., Pennington R.T., Mackinder B., Pennington R.T., Sanderson M.J., Mackinder B., Sanderson M., Koenen E., Wojciechowski M.F. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades // *Taxon*. — 2013. — V. 62. — P. 217-248.
42. Busby P.E., Soman C., Wagner M.R., Friesen M.L., Kremer J., Bennett A., Morsy M., Eisen J.A., Leach J.E., Dangl J.L. Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture // *PLOS Biology*. — 2017. — V. 15, № 3. — Art. e2001793.
43. Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. The Carbohydrate-Active enZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics // *Nucleic Acids Research*. — 2008. — V. 37. — P. D233-D238.
44. Cao Y., Halane M.K., Gassmann W., Stacey G. The role of plant innate immunity in the legume-*Rhizobium* symbiosis // *Annual Review of Plant Biology*. — 2017. — V. 68. — P. 535-561.
45. Carlson R.W., Forsberg L.S., Kannenberg E.L. Lipopolysaccharides in *Rhizobium*-legume symbioses // *Endotoxins: Structure, Function and Recognition* / Wang X., Quinn P. J. — Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. — P. 339-386.
46. Catoira R., Timmers A., Maillet F., Galera C., Penmetsa R.V., Cook D., Dénarié J., Gough C. The *HCL* gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling // *Development*. — 2001. — V. 128, № 9. — P. 1507-1518.
47. Cava J.R., Elias P.M., Turowski D.A., Noel K.D. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants // *Journal of Bacteriology*. — 1989. — V. 171, № 1. — P. 8-15.
48. Cermola M., Fedorova E., Taté R., Riccio A., Favre R., Patriarca E.J. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*–*Phaseolus vulgaris* symbiosis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2000. — V. 13, № 7. — P. 733-741.
49. Chen X., Li C., Wang H., Guo Z. WRKY transcription factors: evolution, binding, and action // *Phytopathology Research*. — 2019. — V. 1, № 1. — Art. 13.
50. Chojnacka K., Skrzypczak D., Szopa D., Izydorczyk G., Moustakas K., Witek-Krowiak A. Management of biological sewage sludge: fertilizer nitrogen

recovery as the solution to fertilizer crisis // Journal of Environmental Management. — 2023. — V. 326. — Art. 116602.

51. Chomicki G., Werner G.D.A., West S.A., Kiers E.T. Compartmentalization drives the evolution of symbiotic cooperation // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2020. — V. 375, № 1808. — Art. 20190602.

52. Coba de la Peña T., Fedorova E., Pueyo J.J., Lucas M.M. The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? // Frontiers in Plant Science. — 2018. — V. 8. — Art. 2229.

53. Cornuault V., Buffetto F., Marcus S.E., Crépeau M.-J., Guillon F., Ralet M.-C., Knox J.P. LM6-M: a high avidity rat monoclonal antibody to pectic α -1,5-L-arabinan // bioRxiv. — 2017.

54. Crichton R. Chapter 17 - Molybdenum, tungsten, vanadium and chromium // Biological inorganic chemistry / Crichton R. — Cambridge: Academic Press, 2019. — P. 475-498.

55. Cui Y., Shen J., Gao C., Zhuang X., Wang J., Jiang L. Biogenesis of plant prevacuolar multivesicular bodies // Molecular Plant. — 2016. — V. 9, № 6. — P. 774-786.

56. Currier H.B., Strugger S. Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of *Allium cepa* L // Protoplasma. — 1956. — V. 45, № 4. — P. 552-559.

57. Dalton D.A., Boniface C., Turner Z., Lindahl A., Kim H.J., Jelinek L., Govindarajulu M., Finger R.E., Taylor C.G. Physiological roles of glutathione S-transferases in soybean root nodules // Plant Physiology. — 2009. — V. 150, № 1. — P. 521-530.

58. Dart P., Mercer F. The effect of growth temperature, level of ammonium nitrate, and light intensity on the growth and nodulation of cowpea (*Vigna sinensis* Endl. ex Hassk.) // Australian Journal of Agricultural Research. — 1965. — V. 16, № 3. — P. 321-345.

59. Dazzo F.B., Truchet G.L., Hollingsworth R.I., Hrabak E.M., Pankratz H.S., Philip-Hollingsworth S., Salzwedel J.L., Chapman K., Appenzeller L., Squartini A. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs // Journal of Bacteriology. — 1991. — V. 173, № 17. — P. 5371-5384.

60. de Boer M.H., Djordjevic M.A. The inhibition of infection thread development in the cultivar-specific interaction of *Rhizobium* and subterranean clover is not caused by a hypersensitive response // Protoplasma. — 1995. — V. 185, № 1. — P. 58-71.

61. de Carvalho-Niebel F., Fournier J., Becker A., Marín Arancibia M. Cellular insights into legume root infection by rhizobia // Current Opinion in Plant Biology. — 2024. — V. 81. — Art. 102597.

62. De Castro C., Molinaro A., Lanzetta R., Silipo A., Parrilli M. Lipopolysaccharide structures from *Agrobacterium* and *Rhizobiaceae* species // Carbohydrate Research. — 2008. — V. 343, № 12. — P. 1924-1933.

63. De Coster W., D'Hert S., Schultz D.T., Cruts M., Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data // *Bioinformatics*. — 2018. — V. 34, № 15. — P. 2666-2669.
64. de Faria S.M., Ringelberg J.J., Gross E., Koenen E.J.M., Cardoso D., Ametsitsi G.K.D., Akomatey J., Maluk M., Tak N., Gehlot H.S., Wright K.M., Teaumroong N., Songwattana P., de Lima H.C., Prin Y., Zartman C.E., Sprent J.I., Ardley J., Hughes C.E., James E.K. The innovation of the symbiosome has enhanced the evolutionary stability of nitrogen fixation in legumes // *New Phytologist*. — 2022. — V. 235, № 6. — P. 2365-2377.
65. de Maagd R.A., Rao A.S., Mulders I.H., Goosen-de Roo L., van Loosdrecht M.C., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J. Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread // *Journal of Bacteriology*. — 1989. — V. 171, № 2. — P. 1143-1150.
66. Dean R.M., Rivers R.L., Zeidel M.L., Roberts D.M. Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties // *Biochemistry*. — 1999. — V. 38, № 1. — P. 347-353.
67. Dennis G., Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C., Lempicki R.A. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery // *Genome Biology*. — 2003. — V. 4, № 5. — Art. P3.
68. Depret G., Houot S., Allard M.R., Breuil M.C., Nouaïm R., Laguerre G. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations // *FEMS Microbiology Ecology*. — 2004. — V. 51, № 1. — P. 87-97.
69. Di Lorenzo F., Speciale I., Silipo A., Alías-Villegas C., Acosta-Jurado S., Rodríguez-Carvajal M.-Á., Dardanelli M.S., Palmigiano A., Garozzo D., Ruiz-Sainz J.-E., Molinaro A., Vinardell J.-M. Structure of the unusual *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide and its role in symbiosis // *Journal of Biological Chemistry*. — 2020. — V. 295, № 32. — P. 10969-10987.
70. DiCenzo G., Milunovic B., Cheng J., Finan T.M. The tRNA^{arg} gene and *engA* are essential genes on the 1.7-Mb pSymB megaplasmid of *Sinorhizobium meliloti* and were translocated together from the chromosome in an ancestral strain // *Journal of Bacteriology*. — 2013. — V. 195, № 2. — P. 202-212.
71. DiCenzo G.C., Finan T.M. The divided bacterial genome: structure, function, and evolution // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2017. — V. 81, № 3. — Art. e00019-17.
72. diCenzo G.C., Yang Y., Young J.P.W., Kuzmanović N. Refining the taxonomy of the order *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) based on whole genome comparisons of over 130 type strains // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2024. — V. 74, № 4. — Art. 006328.
73. diCenzo G.C., Zamani M., Checcucci A., Fondi M., Griffiths J.S., Finan T.M., Mengoni A. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses // *Canadian Journal of Microbiology*. — 2019. — V. 65. — P. 1-33.

74. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // *Bioinformatics*. — 2012. — V. 29, № 1. — P. 15-21.
75. Doin de Moura G.G., Remigi P., Masson-boivin C., Capela D. Experimental evolution of legume symbionts: what have we learnt? // *Genes*. — 2020. — V. 11. — P. 339-339.
76. Dolgikh A.V., Salnikova E.A., Dymo A.M., Kantsurova E.S., Aksenova T.S., Yuzikhin O.S., Kurchak O.N., Onishchuk O.P., Dolgikh E.A. Characterization and *de novo* genome assembly for new *Rhizobium ruizarguesonis* rhizobial strain Vst36-3 involved in symbiosis with *Pisum* and *Vicia* plants // *Current Microbiology*. — 2025. — V. 82, № 6. — Art. 284.
77. Dong W., Song Y. The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — V. 21, № 16. — Art. 5926.
78. Dong W., Zhu Y., Chang H., Wang C., Yang J., Shi J., Gao J., Yang W., Lan L., Wang Y., Zhang X., Dai H., Miao Y., Xu L., He Z., Song C., Wu S., Wang D., Yu N., Wang E. An SHR–SCR module specifies legume cortical cell fate to enable nodulation // *Nature*. — 2020. — V. 589. — P. 586-590.
79. Dragičević M.B., Paunović D.M., Bogdanović Milica D., Todorović S.I., Simonović A.D. ragp: pipeline for mining of plant hydroxyproline-rich glycoproteins with implementation in R // *Glycobiology*. — 2019. — V. 30, № 1. — P. 19-35.
80. Drula E., Garron M.-L., Dogan S., Lombard V., Henrissat B., Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature // *Nucleic Acids Research*. — 2022. — V. 50, № D1. — P. D571-D577.
81. Dunnett C.W. Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case // *Journal of the American Statistical Association*. — 1980. — V. 75, № 372. — P. 796-800.
82. Einsle O. On the shoulders of giants — reaching for nitrogenase // *Molecules*. — 2023. — V. 28, № 24. — Art. 7959.
83. Einsle O., Rees D.C. Structural enzymology of nitrogenase enzymes // *Chemical Reviews*. — 2020. — V. 120, № 12. — P. 4969-5004.
84. Ekanayake G., LaMontagne E.D., Heese A. Never walk alone: clathrin-coated vesicle (CCV) components in plant immunity // *Annual Review of Phytopathology*. — 2019. — V. 57. — P. 387-409.
85. El Msehli S., Lambert A., Hopkins J., Boncompagni E., Smiti-Aschi S., Hérouart D., Frendo P. Physiological and genetic changes during natural senescence of *Medicago truncatula* root nodules // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. — 2019. — V. 182, № 3. — P. 385-392.
86. Fagorzi C., Bacci G., Huang R., Cangoli L., Checcucci A., Fini M., Perrin E., Natali C., diCenzo G.C., Mengoni A. Nonadditive transcriptomic signatures of genotype-by-genotype interactions during the initiation of plant-rhizobium symbiosis // *mSystems*. — 2021. — V. 6, № 1. — Art. e00974-20.

87. Fåhraeus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique // *Journal of General Microbiology*. — 1957. — V. 16, № 2. — P. 374-381.
88. Fauvart M., Michiels J. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium–legume symbiosis // *FEMS Microbiology Letters*. — 2008. — V. 285, № 1. — P. 1-9.
89. Firmin J.L., Wilson K.E., Carlson R.W., Davies A.E., Downie J.A. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor // *Molecular Microbiology*. — 1993. — V. 10, № 2. — P. 351-360.
90. Fischer H.-M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia // *Microbiological Reviews*. — 1994. — V. 58, № 3. — P. 352-386.
91. Fliegmann J., Bono J.-J. Lipo-chitoooligosaccharidic nodulation factors and their perception by plant receptors // *Glycoconjugate Journal*. — 2015. — V. 32, № 7. — P. 455-464.
92. Flores-Félix J.D., Carro L., Cerda-Castillo E., Squartini A., Rivas R., Velázquez E. Analysis of the interaction between *Pisum sativum* L. and *Rhizobium laguerreae* strains nodulating this legume in northwest Spain // *Plants*. — 2020. — V. 9, № 12. — Art. 1755.
93. Fonouni-Farde C., Tan S., Baudin M., Brault M., Wen J., Mysore K.S., Niebel A., Frugier F., Diet A. DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod-factor signalling and rhizobial infection // *Nature Communications*. — 2016. — V. 7. — Art. 12636.
94. Forrest S.I., Verma D.P.S., Dhindsa R.S. Starch content and activities of starch-metabolizing enzymes in effective and ineffective root nodules of soybean // *Canadian Journal of Botany*. — 1991. — V. 69, № 4. — P. 697-701.
95. Forsberg L.S., Bhat U.R., Carlson R.W. Structural characterization of the O-antigenic polysaccharide of the lipo-polysaccharide from *Rhizobium etli* strain CE3. A unique O-acetylated glycan of discrete size, containing 3-O-methyl-6-deoxy-L-talose and 2,3,4-tri-O-,methyl-1 fucose. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2000. — V. 275, № 25. — P. 18851-18863.
96. Fournier J., Teillet A., Chabaud M., Ivanov S., Genre A., Limpens E., de Carvalho-Niebel F., Barker D.G. Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair // *Plant Physiology*. — 2015. — V. 167, № 4. — P. 1233-1242.
97. Fournier J., Timmers A.C.J., Sieberer B.J., Jauneau A., Chabaud M., Barker D.G. Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization // *Plant Physiology*. — 2008. — V. 148, № 4. — P. 1985-1995.
98. Frederix M., Edwards A., Swiderska A., Stanger A., Karunakaran R., Williams A., Abbruscato P., Sanchez-Contreras M., Poole P.S., Downie J.A. Mutation of *praR* in *Rhizobium leguminosarum* enhances root biofilms, improving nodulation competitiveness by increased expression of attachment proteins // *Molecular Microbiology*. — 2014. — V. 93, № 3. — P. 464-478.

99. Frei dit Frey N., Robatzek S. Trafficking vesicles: pro or contra pathogens? // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2009. — V. 12, № 4. — P. 437-443.
100. Freshour G., Bonin C.P., Reiter W.-D., Albersheim P., Darvill A.G., Hahn M.G. Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the *mur1* mutant of *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. — 2003. — V. 131, № 4. — P. 1602-1612.
101. Frings J.F.J. The *Rhizobium*-pea symbiosis as affected by high temperatures: PhD; Wageningen University. — Wageningen, NL, 1976.
102. Fujishige N.A., Lum M.R., De Hoff P.L., Whitelegge J.P., Faull K.F., Hirsch A.M. *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation // *Molecular Microbiology*. — 2008. — V. 67, № 3. — P. 504-515.
103. Gage D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2004. — V. 68, № 2. — P. 280-300.
104. Gano-Cohen K.A., Wendlandt C.E., Stokes P.J., Blanton M.A., Quides K.W., Zomorrodian A., Adinata E.S., Sachs J.L. Interspecific conflict and the evolution of ineffective rhizobia // *Ecology Letters*. — 2019. — V. 22, № 6. — P. 914-924.
105. Gardiol A.E., Truchet G.L., Dazzo F.B. Requirement of succinate dehydrogenase activity for symbiotic bacteroid differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1987. — V. 53, № 8. — P. 1947-1950.
106. Garmier M., Gentzbittel L., Wen J., Mysore K.S., Ratet P. *Medicago truncatula*: genetic and genomic resources // *Current Protocols in Plant Biology*. — 2017. — V. 2, № 4. — P. 318-349.
107. Gaudioso-Pedraza R., Beck M., Frances L., Kirk P., Ripodas C., Niebel A., Oldroyd G.E.D., Benitez-Alfonso Y., de Carvalho-Niebel F. Callose-regulated symplastic communication coordinates symbiotic root nodule development // *Current Biology*. — 2018. — V. 28, № 22. — Art. 3562-3577.e3566.
108. Geurts R., Fedorova E., Bisseling T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2005. — V. 8, № 4. — P. 346-352.
109. Geurts R., Xiao T.T., Reinhold-Hurek B. What does it take to evolve a nitrogen-fixing endosymbiosis? // *Trends in Plant Science*. — 2016. — V. 21, № 3. — P. 199-208.
110. Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection // *Annual Review of Genetics*. — 2008. — V. 42, № 1. — P. 413-441.
111. Gíslason M.H., Nielsen H., Almagro Armenteros J.J., Johansen A.R. Prediction of GPI-anchored proteins with pointer neural networks // *Current Research in Biotechnology*. — 2021. — V. 3. — P. 6-13.
112. Gorshkov A.P., Kusakin P.G., Borisov Y.G., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Effect of triazole fungicides Titul Duo and Vintage on the development of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — V. 24, № 10. — Art. 8646.

113. Gorshkov A.P., Kusakin P.G., Borisov Y.G., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Effect of herbicides Sprut Extra (glyphosate) and Forward (quizalofop-P-ethyl) on the development of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules // Symbiosis. — 2024a. — V. 94, № 2. — P. 191-206.
114. Gorshkov A.P., Kusakin P.G., Vorobiev M.G., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Effect of insecticides imidacloprid and alpha-cypermethrin on the development of pea (*Pisum sativum* L.) nodules // Plants. — 2024b. — V. 13, № 23. — Art. 3439.
115. Gorshkov A.P., Tsyganova A.V., Vorobiev M.G., Tsyganov V.E. The fungicide tetramethylthiuram disulfide negatively affects plant cell walls, infection thread walls, and symbiosomes in pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules // Plants. — 2020. — V. 9, № 11. — Art. 1488.
116. Göttfert M. Regulation and function of rhizobial nodulation genes // FEMS Microbiology Reviews. — 1993. — V. 10, № 1-2. — P. 39-63.
117. Guan D., Stacey N., Liu C., Wen J., Mysore K.S., Torres-Jerez I., Vernié T., Tadege M., Zhou C., Wang Z.-y., Udvardi M.K., Oldroyd G.E.D., Murray J.D. Rhizobial infection is associated with the development of peripheral vasculature in nodules of *Medicago truncatula* // Plant Physiology. — 2013. — V. 162, № 1. — P. 107-115.
118. Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // Systematic Biology. — 2010. — V. 59, № 3. — P. 307-321.
119. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // Bioinformatics. — 2013. — V. 29, № 8. — P. 1072-1075.
120. Haag A.F., Arnold M.F.F., Myka K.K., Kerscher B., Dall'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G.P. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis // FEMS Microbiology Reviews. — 2013. — V. 37, № 3. — P. 364-383.
121. Haas K.T., Rivière M., Wightman R., Peaucelle A. Multitarget immunohistochemistry for confocal and super-resolution imaging of plant cell wall polysaccharides // Bio-protocol. — 2020. — V. 10, № 19. — Art. e3783.
122. Hakoyama T., Niimi K., Yamamoto T., Isobe S., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Kumagai H., Umehara Y., Brossuleit K., Petersen T.R., Sandal N., Stougaard J., Udvardi M.K., Tamaoki M., Kawaguchi M., Kouchi H., Suganuma N. The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules // Plant and Cell Physiology. — 2012. — V. 53, № 1. — P. 225-236.
123. Harrison P.W., Lower R.P.J., Kim N.K.D., Young J.P.W. Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid // Trends in Microbiology. — 2010. — V. 18, № 4. — P. 141-148.

124. Hartmann K., Peiter E., Koch K., Schubert S., Schreiber L. Chemical composition and ultrastructure of broad bean (*Vicia faba* L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis // *Planta*. — 2002. — V. 215, № 1. — P. 14-25.
125. He J., Zhao H., Cheng Z., Ke Y., Liu J., Ma H. Evolution analysis of the fasciclin-like arabinogalactan proteins in plants shows variable fasciclin-AGP domain constitutions // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — V. 20, № 8. — Art. 1945.
126. Hirsch S., Kim J., Muñoz A., Heckmann A.B., Downie J.A., Oldroyd G.E.D. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula* // *The Plant Cell*. — 2009. — V. 21, № 2. — P. 545-557.
127. Hlaváčková K., Šamaj J., Ovečka M. Cytoskeleton as a roadmap navigating rhizobia to establish symbiotic root nodulation in legumes // *Biotechnology Advances*. — 2023. — V. 69. — Art. 108263.
128. Hoffmann N., Benske A., Betz H., Schuetz M., Samuels A.L. Laccases and peroxidases co-localize in lignified secondary cell walls throughout stem development // *Plant Physiology*. — 2020. — V. 184, № 2. — P. 806-822.
129. Hromadová D., Soukup A., Tylová E. Arabinogalactan proteins in plant roots – an update on possible functions // *Frontiers in Plant Science*. — 2021. — V. 12. — Art. 674010.
130. Hsouna J., Ilahi H., Han J.C., Gritli T., Ellouze W., Zhang X.X., Mansouri M., Rahi P., El Idrissi M.M., Lamrabet M., Oubla M., Courty P.E., Wipf D., Tambong J.T., Mnasri B. *Rhizobium acaciae* sp. nov., a new nitrogen-fixing symbiovar isolated from root nodules of *Acacia saligna* in Tunisia // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2023. — V. 73, № 5. — Art. 005900.
131. Hu Y., Ribbe M.W. Biosynthesis of the metalloclusters of nitrogenases // — 2016. — V. 85. — P. 455-483.
132. Hungria M., Franco A.A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L // *Plant and Soil*. — 1993. — V. 149, № 1. — P. 95-102.
133. Ibáñez F., Wall L., Fabra A. Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots // *Journal of Experimental Botany*. — 2016. — V. 68, № 8. — P. 1905-1918.
134. Imaizumi-Anraku H., Kawaguchi M., Koiwa H., Akao S., Syōno K. Two ineffective-nodulating mutants of *Lotus japonicus* — different phenotypes caused by the blockage of endocytotic bacterial release and nodule maturation // *Plant and Cell Physiology*. — 1997. — V. 38, № 7. — P. 871-881.
135. Indrasumunar A., Kereszt A., Searle I., Miyagi M., Li D., Nguyen C.D.T., Men A., Carroll B.J., Gresshoff P.M. Inactivation of duplicated Nod factor receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.) // *Plant and Cell Physiology*. — 2010. — V. 51, № 2. — P. 201-214.

136. Ishida K., Yokoyama R. Reconsidering the function of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family // *Journal of Plant Research*. — 2022. — V. 135, № 2. — P. 145-156.
137. Ishihara H., Koriyama H., Osawa A., Zehirov G., Yamaura M., Kucho K.-i., Abe M., Higashi S., Kondorosi E., Mergaert P., Uchiumi T. Characteristics of bacteroids in indeterminate nodules of the leguminous tree *Leucaena glauca* // *Microbes and Environments*. — 2011. — V. 26, № 2. — P. 156-159.
138. Ivanov S., Fedorova E., Bisseling T. Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2010. — V. 13, № 4. — P. 372-377.
139. Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. 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. — V. 252, № 6. — P. 1505-1517.
140. Ji Y.Y., Zhang B., Zhang P., Chen L.C., Si Y.W., Wan X.Y., Li C., Wang R.H., Tian Y., Zhang Z., Tian C.F. Rhizobial migration toward roots mediated by FadL-ExoFQP modulation of extracellular long-chain AHLs // *ISME Journal*. — 2023. — V. 17, № 3. — P. 417-431.
141. Jiang H., Lei R., Ding S.-W., Zhu S. Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads // *BMC Bioinformatics*. — 2014. — V. 15, № 1. — Art. 182.
142. Jin Y., Liu H., Luo D., Yu N., Dong W., Wang C., Zhang X., Dai H., Yang J., Wang E. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways // *Nature Communications*. — 2016. — V. 7. — Art. 12433.
143. Joensen K.G., Scheutz F., Lund O., Hasman H., Kaas R.S., Nielsen E.M., Aarestrup F.M. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli* // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2014. — V. 52, № 5. — P. 1501-1510.
144. Johnson K.L., Cassin A.M., Lonsdale A., Bacic A., Doblin M.S., Schultz C.J. Pipeline to Identify Hydroxyproline-Rich Glycoproteins // *Plant Physiology*. — 2017. — V. 174, № 2. — P. 886-903.
145. Jones L., Seymour G.B., Knox J.P. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)- β -D-galactan // *Plant Physiology*. — 1997. — V. 113, № 4. — P. 1405-1412.
146. Jordan D.C. Family III. *Rhizobiaceae*. // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Krieg N. R., Holt J. G. — Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. — P. 235-242.
147. Jorin B., Imperial J. Population genomics analysis of legume host preference for specific rhizobial genotypes in the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbioses // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2015. — V. 28, № 3. — P. 310-318.

148. Kanamori N., Madsen L.H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E.M.H., Miwa H., Downie J.A., James E.K., Felle H.H., Haaning L.L., Jensen T.H., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2006. — V. 103, № 2. — P. 359-364.
149. Kannenberg E.L., Rathbun E.A., Brewin N.J. Molecular dissection of structure and function in the lipopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 using monoclonal antibodies and genetic analysis // *Molecular Microbiology*. — 1992. — V. 6, № 17. — P. 2477-2487.
150. Kannenberg E.L., Reuhs B.L., Forsberg L.S., Carlson R.W. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and functions // *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria* / Spaink H. P. et al. — Dordrecht: Springer Netherlands, 1998. — P. 119-154.
151. Karunakaran R., Ramachandran V.K., Seaman J.C., East A.K., Mouhsine B., Mauchline T.H., Prell J., Skeffington A., Poole P.S. Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca* // *Journal of Bacteriology*. — 2009. — V. 191, № 12. — P. 4002-4014.
152. Kaziūnienė J., Gegeckas A., Lapinskienė L., Razbadauskienė K., Mažylytė R., Supronienė S. Competitiveness and nitrogen fixation efficiency analysis of *Rhizobium leguminosarum* strains in different field pea (*Pisum sativum* L.) genotypes // *Agriculture*. — 2025. — V. 15, № 16. — Art. 1784.
153. Kearsley J.V.S., Sather L.M., Finan T.M. *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* // *Trends in Microbiology*. — 2024. — V. 32, № 5. — P. 516-518.
154. Kebede E. Contribution, utilization, and improvement of legumes-driven biological nitrogen fixation in agricultural systems // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. — 2021. — V. 5. — Art. 767998.
155. Keegstra K. Plant cell walls // *Plant Physiology*. — 2010. — V. 154, № 2. — P. 483-486.
156. Kereszt A., Mergaert P., Kondorosi E. Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims? // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2011. — V. 24, № 11. — P. 1300-1309.
157. Khan I., Awan S.A., Ikram R., Rizwan M., Akhtar N., Yasmin H., Sayyed R.Z., Ali S., Ilyas N. Effects of 24-epibrassinolide on plant growth, antioxidants defense system, and endogenous hormones in two wheat varieties under drought stress // *Physiologia Plantarum*. — 2021. — V. 172, № 2. — P. 696-706.
158. Kiers E.T., Rousseau R.A., West S.A., Denison R.F. Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism // *Nature*. — 2003. — V. 425. — P. 78-81.
159. Kirichuk E.A., Flores-Félix J.D., Velázquez E., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Whole-genome sequence of six *Rhizobium laguerreae* strains // *Microbiology Resource Announcements*. — 2024a. — V. 13. — Art. e00279-00224.

160. Kirichek E.A., Tsyganova A.V., Flores-Félix J.D., Velázquez E., Tsyganov V.E. Symbiotic compatibility between *Rhizobium laguerreae* and its host // Archives of Microbiology. — 2026. — V. 208, № 2. — Art. 91.
161. Kirichek E.A., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. A fair-weather friend: the impact of environmental factors on *Rhizobium laguerreae* nodulation efficiency // Russian Journal of Plant Physiology. — 2024b. — V. 71, № 6. — Art. 226.
162. Kirichek E.A., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. *Rhizobium laguerreae* pan-genome: insights into genetic diversity and symbiotic performance // Microbiology. — 2025. — V. 94, Suppl. 1. — P. S134–S138.
163. Kirienko A.N., Porozov Y.B., Malkov N.V., Akhtemova G.A., Le Signor C., Thompson R., Saffray C., Dalmais M., Bendahmane A., Tikhonovich I.A., Dolgikh E.A. Role of a receptor-like kinase K1 in pea *Rhizobium* symbiosis development // Planta. — 2018. — V. 248, № 5. — P. 1101-1120.
164. Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Timmers A.C.J., Tsyganov V.E. 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 Phytologist. — 2016. — V. 210, № 1. — P. 168-183.
165. Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., Kirichek E.A., Kusakin P.G., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. General patterns and species-specific differences in the organization of the tubulin cytoskeleton in indeterminate nodules of three legumes // Cells. — 2021. — V. 10, № 5. — Art. 1012.
166. Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., Kusakin P.G., Sadovskaya A.R., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Tubulin cytoskeleton organization in cells of determinate nodules // Frontiers in Plant Science. — 2022. — V. 13. — P. 823183.
167. Kitaeva A.B., Serova T.A., Kusakin P.G., Tsyganov V.E. Effects of elevated temperature on *Pisum sativum* nodule development: II—phytohormonal responses // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — V. 24, № 23. — Art. 17062.
168. Kneen B.E., LaRue T.A., Hirsch A.M., Smith C.A., Weeden N.F. *sym 13* — a gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum* // Plant Physiology. — 1990. — V. 94, № 3. — P. 899-905.
169. Knox J.P., Linstead P.J., King J., Cooper C., Roberts K. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices // Planta. — 1990. — V. 181, № 4. — P. 512-521.
170. Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P.A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs // Nature Biotechnology. — 2019. — V. 37, № 5. — P. 540-546.
171. Kosolapova A.O., Belousov M.V., Sulatsky M.I., Tsyganova A.V., Sulatskaya A.I., Bobylev A.G., Shtark O.Y., Tsyganov V.E., Volkov K.V., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A., Nizhnikov A.A. RopB protein of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* adopts amyloid state during symbiotic interactions with pea (*Pisum sativum* L.) // Frontiers in Plant Science. — 2022. — V. 13. — Art. 1014699.

172. Kosterin O.E., Rozov S.M. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I // *Pisum Genetics*. — 1993. — V. 25. — P. 27-31.
173. Kumar N., Lad G., Giuntini E., Kaye M.E., Udomwong P., Jannah Shamsani N., Peter W Young J., Bailly X. Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: Population genomics of *Rhizobium leguminosarum* // *Open Biology*. — 2015. — V. 5, № 1. — Art. 140133.
174. Laus M.C., Logman T.J., Lamers G.E., Van Brussel A.A.N., Carlson R.W., Kijne J.W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin // *Molecular Microbiology*. — 2006. — V. 59, № 6. — P. 1704-1713.
175. Ledermann R., Schulte C.C.M., Poole P.S. How rhizobia adapt to the nodule environment // *Journal of Bacteriology*. — 2021. — V. 203, № 12. — Art. e0053920.
176. Lee I., Ouk Kim Y., Park S.C., Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2016. — V. 66, № 2. — P. 1100-1103.
177. Leekitcharoenphon P., Nielsen E.M., Kaas R.S., Lund O., Aarestrup F.M. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica* // *PLOS ONE*. — 2014. — V. 9, № 2. — Art. e87991.
178. Lerouge I., Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2002. — V. 26, № 1. — P. 17-47.
179. Li X., Li Z. What determines symbiotic nitrogen fixation efficiency in rhizobium: recent insights into *Rhizobium leguminosarum* // *Archives of Microbiology*. — 2023. — V. 205, № 9. — Art. 300.
180. Li Y., Guo T., Sun L., Wang E.T., Young J.P.W., Tian C.F. Phylogenomic analyses and reclassification of the *Mesorhizobium* complex: proposal for 9 novel genera and reclassification of 15 species // *BMC Genomics*. — 2024. — V. 25, № 1. — Art. 419.
181. Liang J., Hoffrichter A., Brachmann A., Marín M. Complete genome of *Rhizobium leguminosarum* Norway, an ineffective *Lotus* micro-symbiont // *Standards in Genomic Sciences*. — 2018. — V. 13, № 1. — Art. 36.
182. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // *Bioinformatics*. — 2014. — V. 30, № 7. — P. 923-930.
183. Lie T.A. Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strains // *Plant and Soil*. — 1984. — V. 82, № 3. — P. 415-425.
184. Lin J., Frank M., Reid D. No home without hormones: how plant hormones control legume nodule organogenesis // *Plant Communications*. — 2020. — V. 1, № 5. — Art. 100104.

185. Liners F.o., Letesson J.-J., Didembourg C., Van Cutsem P. Monoclonal antibodies against pectin: recognition of a conformation induced by calcium // *Plant Physiology*. — 1989. — V. 91, № 4. — P. 1419-1424.
186. Liners F.o., Thibault J.-F.o., Van Cutsem P. Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies // *Plant Physiology*. — 1992. — V. 99, № 3. — P. 1099-1104.
187. Lipa P., Vinardell J.M., Janczarek M. Transcriptomic studies reveal that the *Rhizobium leguminosarum* serine/threonine protein phosphatase PssZ has a role in the synthesis of cell-surface components, nutrient utilization, and other cellular processes // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — V. 20, № 12. — Art. 2905.
188. Liu C.-W., Breakspear A., Guan D., Cerri M.R., Jackson K., Jiang S., Robson F., Radhakrishnan G.V., Roy S., Bone C., Stacey N., Rogers C., Trick M., Niebel A., Oldroyd G.E.D., de Carvalho-Niebel F., Murray J.D. NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection // *Plant Physiology*. — 2019. — V. 179, № 4. — P. 1704-1722.
189. Liu C.-W., Murray J.D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update // *Plants*. — 2016. — V. 5, № 3. — Art. 33.
190. Liu J., Rasing M., Zeng T., Klein J., Kulikova O., Bisseling T. NIN is essential for development of symbiosomes, suppression of defence and premature senescence in *Medicago truncatula* nodules // *New Phytologist*. — 2021. — V. 230, № 1. — P. 290-303.
191. Liu S., Jiao J., Tian C.-F. Adaptive evolution of rhizobial symbiosis beyond horizontal gene transfer: from genome innovation to regulation reconstruction // *Genes*. — 2023. — V. 14, № 2. — Art. 274.
192. Liu Z., Persson S., Sánchez-Rodríguez C. At the border: the plasma membrane–cell wall continuum // *Journal of Experimental Botany*. — 2015. — V. 66, № 6. — P. 1553-1563.
193. Loh J., Stacey G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2003. — V. 69, № 1. — P. 10-17.
194. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biology*. — 2014. — V. 15, № 12. — Art. 550.
195. Lucas M.M., Peart J.L., Brewin N.J., Kannenberg E.L. Isolation of monoclonal antibodies reacting with the core component of lipopolysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 and mutant derivatives // *Journal of Bacteriology*. — 1996. — V. 178, № 10. — P. 2727-2733.
196. Lulai E.C., Morgan W.C. Histochemical probing of potato periderm with neutral red: a sensitive cytofluorochrome for the hydrophobic domain of suberin // *Biotechnic and Histochemistry*. — 1992. — V. 67, № 4. — P. 185-195.

197. MacLean A.M., Finan T.M., Sadowsky M.J. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes // *Plant Physiology*. — 2007. — V. 144, № 2. — P. 615-622.
198. Mäder P., Fliessbach A., Dubois D., Gunst L., Fried P., Niggli U. Soil fertility and biodiversity in organic farming // *Science*. — 2002. — V. 296, № 5573. — P. 1694-1697.
199. Manni M., Berkeley M.R., Seppey M., Simao F.A., Zdobnov E.M. BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes // *Molecular Biology and Evolution*. — 2021a. — V. 38, № 10. — P. 4647-4654.
200. Manni M., Berkeley M.R., Seppey M., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genomic data quality and beyond // *Current Protocols*. — 2021b. — V. 1, № 12. — Art. e323.
201. Maróti G., Kondorosi É. Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? // *Frontiers in Microbiology*. — 2014. — V. 5. — Art. 326.
202. Martínez-Molina E., Sánchez Juanes F., Carro L., Flores-Félix J.D., Martínez-Hidalgo P., Cerda Castillo E., González Buitrago J.M., Velázquez E. Identification of rhizobial strains nodulating *Pisum sativum* in northern Spain soils by MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) analysis // *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* / González-Andrés F., James E. eds.: *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* — Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2016. — P. 37-44.
203. Martínez-Romero E., Peix A., Hungria M., Mousavi S.A., Martínez-Romero J., Young P. Guidelines for the description of rhizobial symbiovars // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2024. — V. 74, № 5. — Art. 006373.
204. Mbengue M., Camut S., de Carvalho-Niebel F., Deslandes L., Froidure S., Klaus-Heisen D., Moreau S., Rivas S., Timmers T., Hervé C. The *Medicago truncatula* E3 ubiquitin ligase PUB1 interacts with the LYK3 symbiotic receptor and negatively regulates infection and nodulation // *The Plant Cell*. — 2010. — V. 22, № 10. — P. 3474-3488.
205. Mbengue M.D., Hervé C., Debelle F. Nod factor signaling in symbiotic nodulation // *Advances in Botanical Research* / Frenedo P. et al. — Academic Press, 2020. — P. 1-39.
206. Mendoza-Suárez M., Andersen S.U., Poole P.S., Sánchez-Cañizares C. Competition, nodule occupancy, and persistence of inoculant strains: key factors in the *Rhizobium*-legume symbioses // *Frontiers in Plant Science*. — 2021. — V. 12. — Art. 690567.
207. Mergaert P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., Mausset A.-E., Barloy-Hubler F., Galibert F., Kondorosi A., Kondorosi E. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis

// Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2006. — V. 103, № 13. — P. 5230-5235.

208. Messinese E., Mun J.-H., Yeun L.H., Jayaraman D., Rougé P., Barre A., Lounnon G., Schornack S., Bono J.-J., Cook D.R., Ané J.-M. A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula* // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2007. — V. 20, № 8. — P. 912-921.

209. Miller J.B., Pratap A., Miyahara A., Zhou L., Bornemann S., Morris R.J., Oldroyd G.E.D. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling // The Plant Cell. — 2013. — V. 25, № 2. — P. 5053-5066.

210. Mohnen D. 3.15 - Biosynthesis of pectins and galactomannans // Comprehensive Natural Products Chemistry / Barton S. D. et al. — Oxford: Pergamon, 1999. — P. 497-527.

211. Mongiardini E.J., Ausmees N., Pérez-Giménez J., Julia Althabegoiti M., Ignacio Quelas J., López-García S.L., Lodeiro A.R. The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation // FEMS Microbiology Ecology. — 2008. — V. 65, № 2. — P. 279-288.

212. Morzhina E.V., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. Four developmental stages identified by genetic dissection of pea (*Pisum sativum* L.) root nodule morphogenesis // Plant Science. — 2000. — V. 155, № 1. — P. 75-83.

213. Moscatiello R., Squartini A., Mariani P., Navazio L. Flavonoid-induced calcium signalling in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // New Phytologist. — 2010. — V. 188, № 3. — P. 814-823.

214. Muglia C., Comai G., Spegazzini E., Riccillo P.M., Aguilar O.M. Glutathione produced by *Rhizobium tropici* is important to prevent early senescence in common bean nodules // FEMS Microbiology Letters. — 2008. — V. 286, № 2. — P. 191-198.

215. Munns D.N. Acid soil tolerance in legumes and rhizobia // Advances in Plant Nutrition. — 1986. — V. 2. — P. 63-91.

216. Nakagawa T., Kawaguchi M. Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus* // Plant and Cell Physiology. — 2006. — V. 47, № 1. — P. 176-180.

217. Nelson M.S., Sadowsky M.J. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes // Frontiers in Plant Science. — 2015. — V. 6. — Art. 491.

218. Newcomb W. A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules // Canadian Journal of Botany. — 1976. — V. 54, № 18. — P. 2163-2186.

219. Nguema-Ona E., Vické-Gibouin M., Cannesan M.-A., Driouich A. Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions // Trends in Plant Science. — 2013. — V. 18, № 8. — P. 440-449.

220. Niehaus K., Kapp D., Pühler A. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant // *Planta*. — 1993. — V. 190, № 3. — P. 415-425.
221. Niehaus K., Lagares A., Pühler A. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 1998. — V. 11, № 9. — P. 906-914.
222. Nitawaki Y., Hayato K., Tabing M.M.L., Akihiro Y., and Saeki Y. Effect of salt stress on soybean growth and nodulation under inoculation with soybean rhizobia // *Soil Science and Plant Nutrition*. — 2021. — V. 67, № 2. — P. 103-113.
223. Nitawaki Y., Yasukochi T., Naono S., Yamamoto A., Saeki Y. Effects of NaCl treatment on root nodule formation, isoflavone secretion in soybean, and nodulation gene expression in rhizobia // *Microbes and Environments*. — 2024. — V. 39, № 4. — Art. ME24023.
224. Noel K.D., Box J.M., Bonne V.J. 2-O-methylation of fucosyl residues of a rhizobial lipopolysaccharide is increased in response to host exudate and is eliminated in a symbiotically defective mutant // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2004. — V. 70, № 3. — P. 1537-1544.
225. Noh J.-G., Jeon H.-E., So J.-S., Chang W.-S. Effects of the *Bradyrhizobium japonicum waaL (rfaL)* gene on hydrophobicity, motility, stress tolerance, and symbiotic relationship with soybeans // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2015. — V. 16, № 8. — P. 16778-16791.
226. Novák K., Pešina K., Nebesářová J., Škrdleta V., Lisá L., Našinec V. Symbiotic tissue degradation pattern in the ineffective nodules of three nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.) // *Annals of Botany*. — 1995. — V. 76, № 3. — P. 303-313.
227. Ohme-Takagi M., Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element // *The Plant Cell*. — 1995. — V. 7, № 2. — P. 173-182.
228. Ojeda K.J., Box J.M., Noel K.D. Genetic basis for *Rhizobium etli* CE3 O-antigen O-methylated residues that vary according to growth conditions // *Journal of Bacteriology*. — 2010. — V. 192, № 3. — P. 679-690.
229. Oldroyd G.E. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants // *Nature Reviews Microbiology*. — 2013. — V. 11, № 4. — P. 252-263.
230. Oldroyd G.E., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // *Annual Review of Plant Biology*. — 2008. — V. 59. — P. 519-546.
231. Oldroyd G.E.D., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis // *Annual Review of Genetics*. — 2011. — V. 45, № 1. — P. 119-144.
232. Oono R., Anderson C.G., Denison R.F. Failure to fix nitrogen by non-reproductive symbiotic rhizobia triggers host sanctions that reduce fitness of their

reproductive clonemates // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2011. — V. 278, № 1718. — P. 2698-2703.

233. Ovchinnikova E., Journet E.-P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., Fedorova E., Liu W., den Camp R.O., Zhukov V., Tikhonovich I., Borisov A., Bisseling T., Limpens E. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* spp. // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2011. — V. 24, № 11. — P. 1333-1344.

234. Pan H., Stonoha-Arther C., Wang D. *Medicago* plants control nodulation by regulating proteolysis of the receptor-like kinase DMI2 // Plant Physiol. — 2018. — V. 177, № 2. — P. 792-802.

235. Pankhurst C.E., Gibson A.H. *Rhizobium* strain influence on disruption of clover nodule development at high root temperature // Microbiology. — 1973. — V. 74, № 2. — P. 219-231.

236. Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarszewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nature Biotechnology. — 2018. — V. 36, № 10. — P. 996-1004.

237. Parnell J.J., Berka R., Young H.A., Sturino J.M., Kang Y., Barnhart D.M., DiLeo M.V. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms // Frontiers in Plant Science. — 2016. — V. 7 — Art. 1110.

238. Pattathil S., Avci U., Baldwin D., Swennes A.G., McGill J.A., Popper Z., Bootten T., Albert A., Davis R.H., Chennareddy C., Dong R., O'Shea B., Rossi R., Leoff C., Freshour G., Narra R., O'Neil M., York W.S., Hahn M.G. A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies // Plant Physiology. — 2010. — V. 153, № 2. — P. 514-525.

239. Pedersen H.L., Fangel J.U., McCleary B., Ruzanski C., Rydahl M.G., Ralet M.-C., Farkas V., von Schantz L., Marcus S.E., Andersen M.C.F., Field R., Ohlin M., Knox J.P., Clausen M.H., Willats W.G.T. Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research // Journal of Biological Chemistry. — 2012. — V. 287, № 47. — P. 39429-39438.

240. Peleg-Grossman S., Volpin H., Levine A. Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species // Journal of Experimental Botany. — 2007. — V. 58, № 7. — P. 1637-1649.

241. Perotto S., Brewin N., Kannenberg E. Cytological evidence for a host defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 1994. — V. 7, № 1. — P. 99-112.

242. Perrine-Walker F.M., Kouchi H., Ridge R.W. Endoplasmic reticulum-targeted GFP reveals ER remodeling in *Mesorhizobium*-treated *Lotus japonicus* root hairs during root hair curling and infection thread formation // Protoplasma. — 2014. — V. 251, № 4. — P. 817-826.

243. Pessi G., Ahrens C.H., Rehrauer H., Lindemann A., Hauser F., Fischer H.-M., Hennecke H. Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum*

bacteroids in soybean root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2007. — V. 20, № 11. — P. 1353-1363.

244. Phillips D.A. Abscisic acid inhibition of root nodule initiation in *Pisum sativum* // *Planta*. — 1971. — V. 100, № 3. — P. 181-190.

245. Pini F., Galardini M., Bazzicalupo M., Mengoni A. Plant-bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in *Alphaproteobacteria*? // *Genes*. — 2011. — V. 2, № 4. — P. 1017-1032.

246. Pohlert T. PMCMRplus: calculate pairwise multiple comparisons of mean rank sums extended. — 2024. — URL: <https://CRAN.R-project.org/package=PMCMRplus2024> (дата обращения: 13 апреля 2025).

247. Poole P., Ramachandran V., Terpolilli J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts // *Nature Reviews Microbiology*. — 2018. — V. 16, № 5. — P. 291-303.

248. Porter S.S., Dupin S.E., Denison R.F., Kiers E.T., Sachs J.L. Host-imposed control mechanisms in legume–rhizobia symbiosis // *Nature Microbiology*. — 2024. — V. 9, № 8. — P. 1929-1939.

249. Porter S.S., Simms E.L. Selection for cheating across disparate environments in the legume-rhizobium mutualism // *Ecology Letters*. — 2014. — V. 17, № 9. — P. 1121-1129.

250. Priefer U.B. Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39 // *Journal of Bacteriology*. — 1989. — V. 171, № 11. — P. 6161-6168.

251. Provorov N.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E., Vorobyov N.I. Evolution of symbiotic bacteria within the extra- and intra-cellular plant compartments: experimental evidence and mathematical simulation (Mini-review) // *Symbiosis*. — 2012. — V. 58, № 1-3. — P. 39-50.

252. Puhlmann J., Bucheli E., Swain M.J., Dunning N., Albersheim P., Darvill A.G., Hahn M.G. Generation of monoclonal antibodies against plant cell-wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal α -(1→2)-linked fucosyl-containing epitope // *Plant Physiology*. — 1994. — V. 104, № 2. — P. 699-710.

253. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard E.M., Albrechtsen A.S., James E.K., Thirup S., Stougaard J. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range // *EMBO Journal*. — 2007. — V. 26, № 17. — P. 3923-3935.

254. Rae A., Perotto S., Knox J., Kannenberg E., Brewin N. Expression of extracellular glycoproteins in the uninfected cells of developing pea nodule tissue // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 1991. — V. 4, № 6. — P. 563-570.

255. Rahi P., Giram P., Chaudhari D., diCenzo G.C., Kiran S., Khullar A., Chandel M., Gawari S., Mohan A., Chavan S., Mahajan B. *Rhizobium indicum* sp. nov., isolated from root nodules of pea (*Pisum sativum*) cultivated in the Indian trans-Himalayas // *Systematic and Applied Microbiology*. — 2020. — V. 43, № 5. — Art. 126127.

256. Rajkumari J., Katiyar P., Dheeman S., Pandey P., Maheshwari D.K. The changing paradigm of rhizobial taxonomy and its systematic growth upto postgenomic technologies // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. — 2022. — V. 38, № 11. — Art. 206.
257. Regus J.U., Quides K.W., O'Neill M.R., Suzuki R., Savory E.A., Chang J.H., Sachs J.L. Cell autonomous sanctions in legumes target ineffective rhizobia in nodules with mixed infections // *American Journal of Botany*. — 2017. — V. 104, № 9. — P. 1299-1312.
258. Reid D.E., Heckmann A.B., Novák O., Kelly S., Stougaard J. CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE3 maintains cytokinin homeostasis during root and nodule development in *Lotus japonicus* // *Plant Physiology*. — 2016. — V. 170, № 2. — P. 1060-1074.
259. Remigi P., Zhu J., Young J.P.W., Masson-Boivin C. Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts // *Trends in Microbiology*. — 2016. — V. 24, № 1. — P. 63-75.
260. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *Journal of Cell Biology*. — 1963. — V. 17, № 1. — P. 208-212.
261. Rinaudi L.V., Giordano W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia // *FEMS Microbiology Letters*. — 2010. — V. 304, № 1. — P. 1-11.
262. Rivas R., Velazquez E., Willems A., Vizcaino N., Subba-Rao N.S., Mateos P.F., Gillis M., Dazzo F.B., Martinez-Molina E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2002. — V. 68, № 11. — P. 5217-5222.
263. Rodríguez-Navarro D.N., Dardanelli M.S., Ruíz-Saínz J.E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants // *FEMS Microbiology Letters*. — 2007. — V. 272, № 2. — P. 127-136.
264. Rosselli R., La Porta N., Muresu R., Stevanato P., Concheri G., Squartini A. Pangenomics of the symbiotic *Rhizobiales*. Core and accessory functions across a group endowed with high levels of genomic plasticity // *Microorganisms*. — 2021. — V. 9, № 2. — Art. 407.
265. Roughley R.J. The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum* // *Annals of Botany*. — 1970. — V. 34, № 3. — P. 631-646.
266. Roughley R.J., Nutman P.S., Chandler M.R. Effect of host plant selection and temperature on the structure of root nodules of red clover (*Trifolium pratense* L.) // *Plant and Soil*. — 1981. — V. 61, № 1. — P. 113-124.
267. Roy S., Liu W., Nandety R.S., Crook A., Mysore K.S., Pislariu C.I., Frugoli J., Dickstein R., Udvardi M.K. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation // *The Plant Cell*. — 2020. — V. 32, № 1. — P. 15-41.

268. Sachs J.L., Quides K.W., Wendlandt C.E. Legumes versus rhizobia: a model for ongoing conflict in symbiosis // *New Phytologist*. — 2018. — V. 219, № 4. — P. 1199-1206.
269. Sachs J.L., Russell J.E., Lii Y.E., Black K.C., Lopez G., Patil A.S. Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont // *Journal of Evolutionary Biology*. — 2010. — V. 23, № 9. — P. 1919-1927.
270. Safronova V., Belimov A., Sazanova A., Chirak E., Kuznetsova I., Andronov E., Pinaev A., Tsyganova A., Seliverstova E., Kitaeva A., Tsyganov V., Tikhonovich I. Two broad host range rhizobial strains isolated from relict legumes have various complementary effects on symbiotic parameters of co-inoculated plants // *Frontiers in Microbiology*. — 2019. — V. 10. — Art. 514.
271. Sagan M., Ney B., Duc G. Plant symbiotic mutants as a tool to analyse nitrogen nutrition and yield relationship in field-growth peas (*Pisum sativum* L.) // *Plant and Soil*. — 1993. — V. 153, № 1. — P. 33-45.
272. Sahlman K., Fåhraeus G. An electron microscope study of root-hair infection by *Rhizobium* // *Journal of General Microbiology*. — 1963. — V. 33. — P. 425-427.
273. Saïdi S., Ramírez-Bahena M.-H., Santillana N., Zúñiga D., Álvarez-Martínez E., Peix A., Mhamdi R., Velázquez E. *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2014. — V. 64, № 1. — P. 242-247.
274. Salas M.E., Lozano M.J., López J.L., Draghi W.O., Serrania J., Torres Tejerizo G.A., Albicoro F.J., Nilsson J.F., Pistorio M., Del Papa M.F., Parisi G., Becker A., Lagares A. Specificity traits consistent with legume-rhizobia coevolution displayed by *Ensifer meliloti* rhizosphere colonization // *Environmental Microbiology*. — 2017. — V. 19, № 9. — P. 3423-3438.
275. Saldaña G., Martínez-Alcántara V., Vinardell J.M., Bellogín R., Ruíz-Sainz J.E., Balatti P.A. Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr) // *Archives of Microbiology*. — 2003. — V. 180, № 1. — P. 45-52.
276. Sánchez-Cañizares C., Jorrín B., Durán D., Nadendla S., Albareda M., Rubio-sanz L., Lanza M., González-Guerrero M., Prieto R.I., Giglio M.G., Rey L., Ruiz-Argüeso T., Palacios J.M., Imperial J. Genomic diversity in the endosymbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum* // *Genes*. — 2018. — V. 9, № 2. — Art. 60.
277. Santos R., Hérouart D., Puppo A., Touati D. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis // *Molecular Microbiology*. — 2000. — V. 38, № 4. — P. 750-759.
278. Scheres B., van Engelen F., van der Knaap E., van de Wiel C., van Kammen A., Bisseling T. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule // *Plant Cell*. — 1990. — V. 2, № 8. — P. 687-700.
279. Schlaman H.R.M., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia // *Journal of Bacteriology*. — 1992. — V. 174, № 16. — P. 5177-5182.

280. Schmeisser C., Liesegang H., Krysciak D., Bakkou N., Le Quéré A., Wollherr A., Heinemeyer I., Morgenstern B., Pommerening-Röser A., Flores M., Palacios R., Brenner S., Gottschalk G., Schmitz R.A., Broughton W.J., Perret X., Strittmatter A.W., Streit W.R. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2009. — V. 75, № 12. — P. 4035-4045.
281. Schwember R., Schulze J., Pozo A., Cabeza R.A. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules // *Plants*. — 2019. — V. 8. — P. 333-333.
282. Serova T.A., Kusakin P.G., Kitaeva A.B., Seliverstova E.V., Gorshkov A.P., Romanyuk D.A., Zhukov V.A., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Effects of elevated temperature on *Pisum sativum* nodule development: I — detailed characteristic of unusual apical senescence // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — V. 24, № 24. — Art. 17144.
283. Serova T.A., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization // *Journal of Plant Physiology*. — 2017. — V. 212. — P. 29-44.
284. Serova T.A., Tsyganov V.E. Symbiotic nodule senescence in legumes: molecular-genetic and cellular aspects (review) // *Agricultural Biology*. — 2014. — V. 5. — P. 3-15.
285. Serova T.A., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages // *Protoplasma*. — 2018. — V. 255, № 5. — P. 1443-1459.
286. Sickerman N.S., Rettberg L.A., Lee C.C., Hu Y., Ribbe M.W. Cluster assembly in nitrogenase // *Essays in Biochemistry*. — 2017. — V. 61. — P. 271-280.
287. Singh S., Katzer K., Lambert J., Cerri M., Parniske M. CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development // *Cell Host and Microbe*. — 2014. — V. 15, № 2. — P. 139-152.
288. Singh S., Varma A. Structure, function, and estimation of leghemoglobin // *Rhizobium Biology and Biotechnology* / Hansen A. *et al.* — Cham: Springer, 2017. — P. 309-330.
289. Skerman V.B.D., McGOWAN V., Sneath P.H.A. Approved lists of bacterial names // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 1980. — V. 30, № 1. — P. 225-420.
290. Smallwood M., Yates E.A., Willats W.G.T., Martin H., Knox J.P. Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot // *Planta*. — 1996. — V. 198, № 3. — P. 452-459.
291. Smillie C.S., Smith M.B., Friedman J., Cordero O.X., David L.A., Alm E.J. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome // *Nature*. — 2011. — V. 480, № 7376. — P. 241-244.
292. Soedarjo M., Borthakur D. Mimosine, a toxin produced by the tree-legume *Leucaena* provides a nodulation competition advantage to mimosine-degrading

Rhizobium strains // Soil Biology and Biochemistry. — 1998. — V. 30, № 12. — P. 1605-1613.

293. Sogawa A., Yamazaki A., Yamasaki H., Komi M., Manabe T., Tajima S., Hayashi M., Nomura M. SNARE proteins LjVAMP72a and LjVAMP72b are required for root symbiosis and root hair formation in *Lotus japonicus* // Frontiers in Plant Science. — 2019. — V. 9. — Art. 1992.

294. The *Rhizobiaceae*: molecular biology of model plant-associated bacteria. / Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J. — Dordrecht: Springer Science+Business, 1998.

295. Spaink H.P., Sheeley D.M., van Brussel A.A.N., Glushka J., York W.S., Tak T., Geiger O., Kennedy E.P., Reinhold V.N., Lugtenberg B.J.J. A novel highly saturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium* // Nature. — 1991. — V. 354. — P. 125–130.

296. Stonoha-Arther C., Wang D. Tough love: accommodating intracellular bacteria through directed secretion of antimicrobial peptides during the nitrogen-fixing symbiosis // Current Opinion in Plant Biology. — 2018. — V. 44. — P. 155-163.

297. Su C. Pectin modifications at the symbiotic interface // New Phytologist. — 2023. — V. 238, № 1. — P. 25-32.

298. Su C., Klein M.-L., Hernández-Reyes C., Batzenschlager M., Ditengou F.A., Lacey B., Keller J., Delaux P.-M., Ott T. The *Medicago truncatula* DREPP protein triggers microtubule fragmentation in membrane nanodomains during symbiotic infections // The Plant Cell. — 2020. — V. 32, № 5. — P. 1689-1702.

299. Su C., Zhang G., Rodriguez-Franco M., Hinnenberg R., Wietschorke J., Liang P., Yang W., Uhler L., Li X., Ott T. Transcellular progression of infection threads in *Medicago truncatula* roots is associated with locally confined cell wall modifications // Current Biology. — 2023. — V. 33, № 3. — Art. 533-542.e535.

300. Suganuma N., Tamaoki M., Takaki M. Comparison of the protein composition and enzymatic activities during development between effective and plant-determined ineffective nodules in pea // Plant and Cell Physiology. — 1993. — V. 34, № 6. — P. 781-788.

301. Sulima A.S., Zhukov V.A., Kulaeva O.A., Vasileva E.N., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. New sources of *Sym2^A* allele in the pea (*Pisum sativum* L.) carry the unique variant of candidate LysM-RLK gene *LykX* // PeerJ. — 2019. — V. 7. — Art. e8070.

302. Sun J., Cardoza V., Mitchell D.M., Bright L., Oldroyd G., Harris J.M. Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation // The Plant Journal. — 2006. — V. 46, № 6. — P. 961-970.

303. Suzaki T., Kawaguchi M. Root nodulation: A developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection // Current Opinion in Plant Biology. — 2014. — V. 21. — P. 16-22.

304. Suzaki T., Takeda N., Nishida H., Hoshino M., Ito M., Misawa F., Handa Y., Miura K., Kawaguchi M. LACK OF SYMBIONT ACCOMMODATION controls intracellular symbiont accommodation in root nodule and arbuscular mycorrhizal

symbiosis in *Lotus japonicus* // PLOS Genetics. — 2019. — V. 15, № 1. — Art. e1007865.

305. Takács T., Cseresnyés I., Kovács R., Parádi I., Kelemen B., Szili-Kovács T., Füzy A. Symbiotic effectivity of dual and tripartite associations on soybean (*Glycine max* L. Merr.) cultivars inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and AM fungi // Frontiers in Plant Science. — 2018. — V. 9. — Art. 1631.

306. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic Acids Research. — 2016. — V. 44, № 14. — P. 6614-6624.

307. Taulé C., Zabaleta M., Mareque C., Platero R., Sanjurjo L., Sicardi M., Frioni L., Battistoni F., Fabiano E. New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan // Applied and Environmental Microbiology. — 2012. — V. 78, № 6. — P. 1692-1700.

308. Temprano-Vera F., Rodríguez-Navarro D.N., Acosta-Jurado S., Perret X., Fossou R.K., Navarro-Gómez P., Zhen T., Yu D., An Q., Buendía-Clavería A.M., Moreno J., López-Baena F.J., Ruiz-Sainz J.E., Vinardell J.M. *Sinorhizobium fredii* strains HH103 and NGR234 form nitrogen fixing nodules with diverse wild soybeans (*Glycine soja*) from central china but are ineffective on northern china accessions // Frontiers in Microbiology. — 2018. — V. 9. — Art. 2843.

309. Teufel F., Almagro Armenteros J.J., Johansen A.R., Gíslason M.H., Pihl S.I., Tsirigos K.D., Winther O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models // Nature Biotechnology. — 2022. — V. 40, № 7. — P. 1023-1025.

310. Thumhuri V., Almagro Armenteros J.J., Johansen Alexander R., Nielsen H., Winther O. DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models // Nucleic Acids Research. — 2022. — V. 50. — P. W228-W234.

311. Tian C.F., Zhou Y.J., Zhang Y.M., Li Q.Q., Zhang Y.Z., Li D.F., Wang S., Wang J., Gilbert L.B., Li Y.R., Chen W.X. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2012. — V. 109, № 22. — P. 8629-8634.

312. Tikhonovich I., Provorov N. Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion // Annals of Applied Biology. — 2011. — V. 159, № 2. — P. 155-168.

313. Tikhonovich I.A., Borisov A.Y., Tsyganov V.E., Ovtsyna A.O., Dolgikh E.A., Provorov N.A. Integration of plant and microbial genetic systems in symbiosis // Biology Bulletin Reviews. — 2005. — V. 125, № 3. — P. 227-238.

314. Timmers A.C., Auriac M.C., Truchet G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements // Development. — 1999. — V. 126, № 16. — P. 3617-3628.

315. Tóth K., Stacey G. Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-rhizobium symbiosis? // *Frontiers in Plant Science*. — 2015. — V. 6. — Art. 401.
316. Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., de Billy F., Promé J.-C., Dénarié J. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa // *Nature*. — 1991. — V. 351, № 6328. — P. 670-673.
317. Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Molecular and General Genetics*. — 1998. — V. 259, № 5. — P. 491-503.
318. Tsyganov V.E., Tsyganova A.V. Symbiotic regulatory genes controlling nodule development in *Pisum sativum* L // *Plants*. — 2020. — V. 9, № 12. — Art. 1741.
319. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Herrera-Cervera J.A., Sanjuan-Pinilla J.M., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Priefer U.B., Olivares J., Sanjuan J. Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum* // *New Phytologist*. — 2003. — V. 159, № 2. — P. 521-530.
320. Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Structure and development of the legume-rhizobial symbiotic interface in infection threads // *Cells*. — 2021. — V. 10, № 5. — Art. 1050.
321. Tsyganova A.V., Ivanova K.A., Tsyganov V.E. Histological and ultrastructural nodule organization of the pea (*Pisum sativum*) mutant SGEFix⁻⁵ in the *Sym33* gene encoding the transcription factor *PsCYCLOPS/PsIPD3* // *Ecological genetics*. — 2019a. — V. 17, № 1. — P. 65-70.
322. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. Bacterial release is accompanied by ectopic accumulation of cell wall material around the vacuole in nodules of *Pisum sativum sym33-3* allele encoding transcription factor *PsCYCLOPS/PsIPD3* // *Protoplasma*. — 2019b. — V. 256, № 5. — P. 1449-1453.
323. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Gorshkov A.P., Serova T.A., Tsyganov V.E. Effect of elevated temperature on premature senescence in nodules of pea (*Pisum sativum* L.) *sym26* and *sym27* mutants. II. Ultrastructural organization // *Russian Journal of Plant Physiology*. — 2023a. — V. 70, № 8. — Art. 201.
324. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Gorshkov A.P., Tsyganov V.E. Analysis of *Glycine max* and *Galega orientalis* nodules revealed specific features of symbiotic interface organization in determinate and indeterminate nodules // *Russian Journal of Plant Physiology*. — 2023b. — V. 70, № 8. — Art. 192.
325. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Tsyganov V.E. Influence of mutation in pea (*Pisum sativum* L.) *cdt* (*cadmium tolerance*) gene on histological and ultrastructural nodule organization // *Ecological genetics*. — 2019c. — V. 17, № 1. — P. 71-80.
326. Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Tsyganov V.E. Comparison of the formation of plant-microbial interface in *Pisum sativum* L. and *Medicago truncatula*

Gaertn. nitrogen-fixing nodules // International Journal of Molecular Sciences. — 2023c. — V. 24, № 18. — Art. 13850.

327. Tsyganova A.V., Tsyganov V.E., Findlay K.C., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Brewin N.J. Distribution of legume arabinogalactan protein-extensin (AGPE) glycoproteins in symbiotically defective pea mutants with abnormal infection threads // Cell and Tissue Biology. — 2009. — V. 3, № 1. — P. 93-102.

328. Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T., Kuromori T., Tanokura M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport // Plant and Cell Physiology. — 2010. — V. 51, № 11. — P. 1821-1839.

329. Usukhbayar N., Takano Y., Uesugi S., Muroi M., Osada H., Kimura K.I. 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene induces ferroptosis-like cell death through lipid peroxidation // Free Radical Research. — 2023. — V. 57, № 3. — P. 208-222.

330. Van de Velde W., Guerra J.C.P., Keyser A.D., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M., Goormachtig S. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula* // Plant Physiology. — 2006. — V. 141, № 2. — P. 711-720.

331. VandenBosch K.A., Bradley D.J., Knox J.P., Perotto S., Butcher G.W., Brewin N.J. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots // The EMBO Journal. — 1989. — V. 8, № 2. — P. 335-341.

332. Vanderlinde E.M., Hynes M.F., Yost C.K. Homoserine catabolism by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 requires a plasmid-borne gene cluster that also affects competitiveness for nodulation // Environmental Microbiology. — 2014. — V. 16, № 1. — P. 205-217.

333. Vanderlinde E.M., Yost C.K. Mutation of the sensor kinase *chvG* in *Rhizobium leguminosarum* negatively impacts cellular metabolism, outer membrane stability, and symbiosis // Journal of Bacteriology. — 2012. — V. 194, № 4. — P. 768-777.

334. Vartapetian A.B., Tuzhikov A.I., Chichkova N.V., Taliansky M., Wolpert T.J. A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases // Cell Death & Differentiation. — 2011. — V. 18, № 8. — P. 1289-1297.

335. Vasse J., de Billy F., Camut S., Truchet G. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules // Journal of Bacteriology. — 1990. — V. 172, № 8. — P. 4295-4306.

336. Veereshlingam H., Haynes J.G., Penmetsa R.V., Cook D.R., Sherrier D.J., Dickstein R. *nip*, a symbiotic *Medicago truncatula* mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response // Plant Physiology. — 2004. — V. 136, № 3. — P. 3692-3702.

337. Venado R.E., Wange L.E., Shen D., Pinnau F., Andersen T.G., Enard W., Marín M. Tissue-specific regulation of lipid polyester synthesis genes controlling oxygen permeation into *Lotus japonicus* nodules // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2022. — V. 119, № 47. — Art. e2206291119.

338. Verherbruggen Y., Marcus S.E., Haeger A., Ordaz-Ortiz J.J., Knox J.P. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan // *Carbohydrate Research*. — 2009. — V. 344, № 14. — P. 1858-1862.
339. Vernié T., Camut S., Camps C., Rembliere C., de Carvalho-Niebel F., Mbengue M., Timmers T., Gascioli V., Thompson R., le Signor C., Lefebvre B., Cullimore J., Hervé C. PUB1 interacts with the receptor kinase DMI2 and negatively regulates rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses through its ubiquitination activity in *Medicago truncatula* // *Plant Physiology*. — 2016. — V. 170, № 4. — P. 2312-2324.
340. Voragen A.G.J., Coenen G.-J., Verhoef R.P., Schols H.A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls // *Structural Chemistry*. — 2009. — V. 20, № 2. — P. 263-275.
341. Voroshilova V.A., Boesten B., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Priefer U.B. 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* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 4. — P. 471-476.
342. Walker L., Lagunas B., Gifford M.L. Determinants of host range specificity in legume-rhizobia symbiosis // *Frontiers in Microbiology*. — 2020. — V. 11. — Art. 585749.
343. Wang L., Tian T., Liang J., Li R., Xin X., Qi Y., Zhou Y., Fan Q., Ning G., Becana M., Duanmu D. A transcription factor of the NAC family regulates nitrate-induced legume nodule senescence // *New Phytologist*. — 2023. — V. 238, № 5. — P. 2113-2129.
344. Wang Q., Liu J., Zhu H. Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions // *Frontiers in Plant Science*. — 2018. — V. 9. — Art. 313.
345. Watanabe R., Artigas Ramirez M.D., Agake S.-i., Bellingrath-Kimura S.D., Lewandowska S., Onishi Y., Nishikawa Y., Takeyama H., Yasuda M., Ohkama-Ohtsu N. Genetic characterization and symbiotic performance of soybean rhizobia under cold and water-deficient conditions in Poland // *Plants*. — 2025. — V. 14, № 12. — Art. 1786.
346. Welmillage S.U., James E.K., Tak N., Shedge S., Huang L., Muszyński A., Azadi P., Gyaneshwar P. A rhamnose-rich O-antigen of *Paraburkholderia phymatum* MP20 is required for symbiosis with *Mimosa pudica* // *Journal of Bacteriology*. — 2025. — V. 207, № 2. — Art. e00422-00424.
347. Wen A., Havens K.L., Bloch S.E., Shah N., Higgins D.A., Davis-Richardson A.G., Sharon J., Rezaei F., Mohiti-Asli M., Johnson A., Abud G., Ane J.-M., Maeda J., Infante V., Gottlieb S.S., Lorigan J.G., Williams L., Horton A., McKellar M., Soriano D., Caron Z., Elzinga H., Graham A., Clark R., Mak S.-M., Stupin L., Robinson A., Hubbard N., Broglie R., Tamsir A., Temme K. Enabling biological nitrogen fixation for cereal crops in fertilized fields // *ACS Synthetic Biology*. — 2021. — V. 10, № 12. — P. 3264-3277.

348. Westhoek A., Field E., Rehling F., Mulley G., Webb I., Poole P.S., Turnbull L.A. Policing the legume-*Rhizobium* symbiosis: a critical test of partner choice // *Scientific Reports*. — 2017. — V. 7, № 1. — Art. 1419.
349. Wheatley R.M., Ford B.L., Li L., Aroney S.T.N., Knights H.E., Ledermann R., East A.K., Ramachandran V.K., Poole P.S. Lifestyle adaptations of *Rhizobium* from rhizosphere to symbiosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2020. — V. 117, № 38. — P. 23823-23834.
350. Wilkinson H.H., Spoerke J.M., Parker M.A. Divergence in symbiotic compatibility in a legume-bradyrhizobium mutualism // *Evolution*. — 1996. — V. 50, № 4. — P. 1470-1477.
351. Willats W.G.T., Marcus S.E., Knox J.P. Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- α -L-arabinan // *Carbohydrate Research*. — 1998. — V. 308, № 1. — P. 149-152.
352. Williams A., Wilkinson A., Krehenbrink M., Russo D.M., Zorreguieta A., Downie J.A. Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection // *Journal of Bacteriology*. — 2008. — V. 190, № 13. — P. 4706-4715.
353. Wilmowicz E., Kućko A., Alché J.D.D., Czeszewska-Rosiak G., Florkiewicz A.B., Kapusta M., Karwaszewski J. Remodeling of cell wall components in root nodules and flower abscission zone under drought in yellow lupine // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — V. 23, № 3. — Art. 1680.
354. Wojciechowski M.F., Sanderson M.J., Steele K.P., Liston A. Molecular phylogeny of the “temperate herbaceous tribes” of papilionoid legumes: a supertree approach // *Advances in Legume Systematics, part 9*. — Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. — P. 277-298.
355. Woodward L.P., Sible C.N., Seebauer J.R., Below F.E. Soil inoculation with nitrogen-fixing bacteria to supplement maize fertilizer need // *Agronomy Journal*. — 2025. — V. 117, № 1. — Art. e21729.
356. Wright C., Wykes M. Medaka: sequence correction provided by ONT Research. — 2017. — URL: GitHub, <https://github.com/nanoporetech/medaka> (дата обращения: 8 декабря 2023).
357. Xiao T.T., Schilderink S., Moling S., Deinum E.E., Kondorosi E., Franssen H., Kulikova O., Niebel A., Bisseling T. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules // *Development*. — 2014. — V. 141, № 18. — P. 3517-3528.
358. Xie F., Murray J.D., Kim J., Heckmann A.B., Edwards A., Oldroyd G.E.D., Downie J.A. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2012. — V. 109, № 2. — P. 633-638.
359. Yamaguchi Y., Barona G., Ryan C.A., Pearce G. GmPep914, an eight-amino acid peptide isolated from soybean leaves, activates defense-related genes // *Plant Physiology*. — 2011. — V. 156, № 2. — P. 932-942.
360. Yates E.A., Valdor J.-F., Haslam S.M., Morris H.R., Dell A., Mackie W., Knox J.P. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-

arabinogalactan-protein monoclonal antibodies // *Glycobiology*. — 1996. — V. 6, № 2. — P. 131-139.

361. Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2001. — V. 51, № Pt 1. — P. 89-103.

362. Young J.P.W., Crossman L.C., Johnston A.W., Thomson N.R., Ghazoui Z.F., Hull K.H., Wexler M., Curson A.R., Todd J.D., Poole P.S., Mauchline T.H., East A.K., Quail M.A., Churcher C., Arrowsmith C., Cherevach I., Chillingworth T., Clarke K., Cronin A., Davis P., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Mungall K., Norbertczak H., Rabbinowitsch E., Sanders M., Simmonds M., Whitehead S., Parkhill J. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components // *Genome Biology*. — 2006. — V. 7, № 4. — Art. R34.

363. Young J.P.W., Jorriin B., Moeskjær S., James E.K. *Rhizobium brockwellii* sp. nov., *Rhizobium johnstonii* sp. nov. and *Rhizobium beringeri* sp. nov., three genospecies within the *Rhizobium leguminosarum* species complex // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2023. — V. 73, № 7. — Art. 005979.

364. Young J.P.W., Moeskjær S., Afonin A., Rahi P., Maluk M., James E.K., Cavassim M.I.A., Rashid M.H.O., Aserse A.A., Perry B.J., Wang E.T., Velázquez E., Andronov E.E., Tampakaki A., Félix J.D.F., González R.R., Youseif S.H., Lepetit M., Boivin S., Jorriin B., Kenicer G.J., Peix Á., Hynes M.F., Ramírez-Bahena M.H., Gulati A., Tian C.F. Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex // *Genes*. — 2021. — V. 12, № 1. — Art. 111.

365. Yuan K., Reckling M., Ramirez M.D.A., Djedidi S., Fukuhara I., Ohyama T., Yokoyama T., Bellingrath-Kimura S.D., Halwani M., Egamberdieva D., Ohkama-Ohtsu N. Characterization of *Rhizobia* for the improvement of soybean cultivation at cold conditions in central Europe // *Microbes and Environments*. — 2020. — V. 35, № 1. — Art. ME19124.

366. Zahran H.H. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 1999. — V. 63, № 4. — P. 968-989.

367. Zhang F., Smith D.L. Inoculation of soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions // *Plant and Soil*. — 1996. — V. 179, № 2. — P. 233-241.

368. Zhang J., Peng S., Andrews M., Liu C., Shang Y., Li S., Wang E., Zhang X. *Rhizobium changzhiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia sativa* L. in North China // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2021. — V. 71, № 3. — Art. 004724.

369. Zhang X., Wu J., Kong Z. Cellular basis of legume–rhizobium symbiosis // *Plant Communications*. — 2024. — V. 5, № 11. — Art. 101045.

370. Zhao R., Liu L.X., Zhang Y.Z., Jiao J., Cui W.J., Zhang B., Wang X.L., Li M.L., Chen Y., Xiong Z.Q., Chen W.X., Tian C.F. Adaptive evolution of rhizobial symbiotic compatibility mediated by co-evolved insertion sequences // ISME Journal. — 2018. — V. 12, № 1. — P. 101-111.

371. Zheng J., Ge Q., Yan Y., Zhang X., Huang L., Yin Y. dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation // Nucleic Acids Research. — 2023. — V. 51, № W1. — P. W115-W121.

372. Zipfel C., Oldroyd G.E.D. Plant signalling in symbiosis and immunity // Nature. — 2017. — V. 543. — P. 328-336.

373. Zou Q., Luo S., Wu H., He D., Li X., Cheng G. A GMC oxidoreductase GmcA is required for symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // Frontiers in Microbiology. — 2020. — V. 11. — Art. 394.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю Виктору Евгеньевичу Цыганову за всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения диссертационной работы, советы и конструктивную критику.

Автор выражает благодарность своим коллегам, сотрудникам лаборатории молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ: Анне Викторовне Цыгановой, Анне Борисовне Китаевой, Петру Глебовичу Кусакину и Артемию Павловичу Горшкову за их вклад в совместные исследования, дружескую атмосферу, помощь и поддержку.

Автор благодарен сотрудникам ресурсного центра ФГБНУ ВНИИСХМ «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология», особенно Пинаеву Алесандру Георгиевичу, а также Андронову Евгению Евгеньевичу и Гуро Полине Дмитриевне за помощь и ценные советы, связанные со сборкой и анализом бактериальных геномов.

Автор искренне благодарен своим родителям Андрею Николаевичу и Инне Николаевне Киричек за поддержку, заботу и любовь; а также лучшему другу Андрееву Максиму Владимировичу, за то, что мы начали исследовательский путь вместе, хоть сейчас и идем разными дорогами.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Иллюстративные материалы

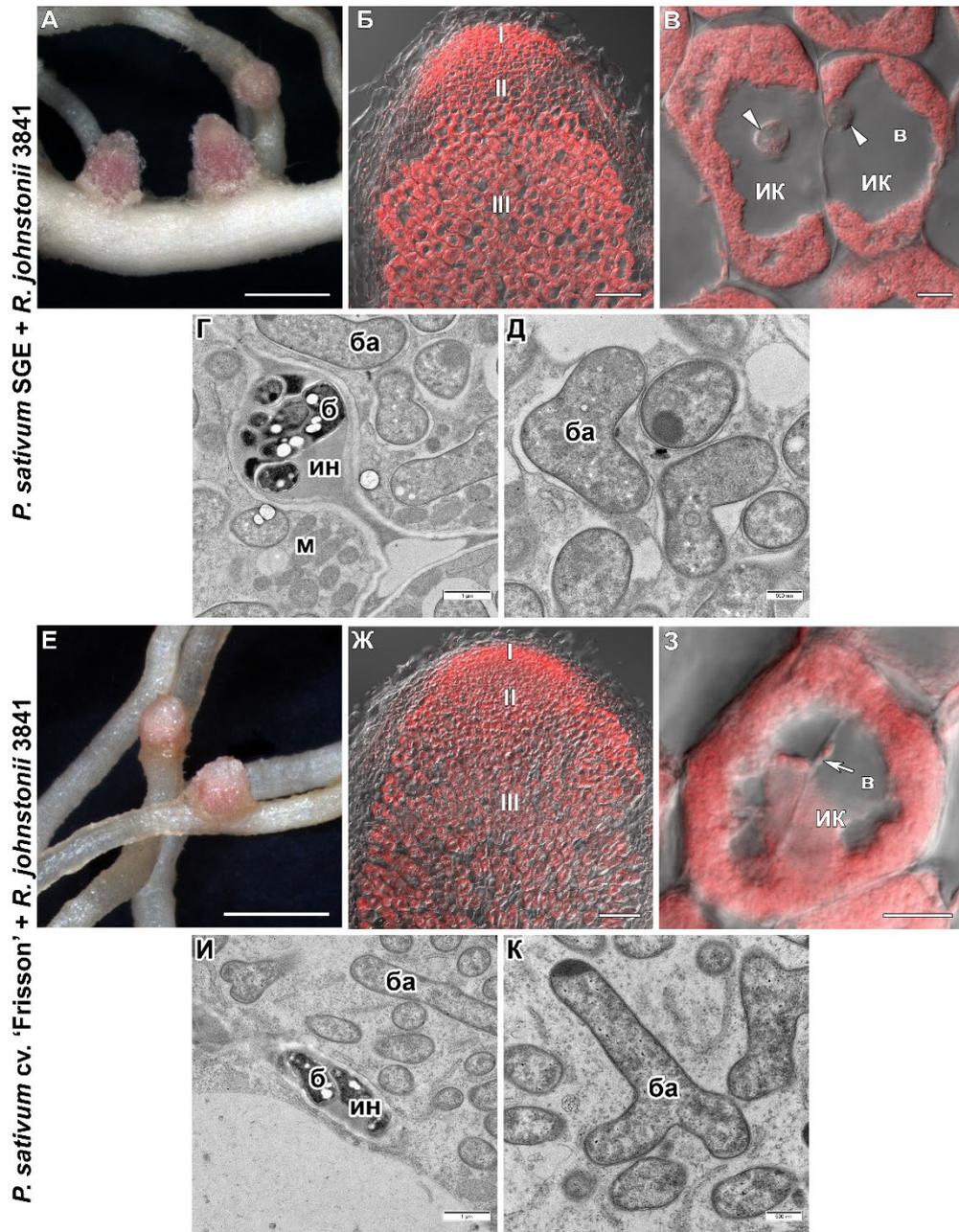


Рисунок 1 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха, индуцированных штаммом *Rhizobium johnstonii* 3841

А, Е — общий вид корней. Б, В, Ж, З — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации. ИК — инфицированная клетка; в — вакуоль; стрелка указывает на инфекционную нить, наконечники стрелок — на инфекционные капли. Г, Д, И, К — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; б — бактерия; м — митохондрия; ба — бактериод. Масштабные линейки: А, Е — 2 мм, Б, Ж — 100 мкм, В, З — 10 мкм, Г, Д, И, К — масштаб указан под каждой линейкой.

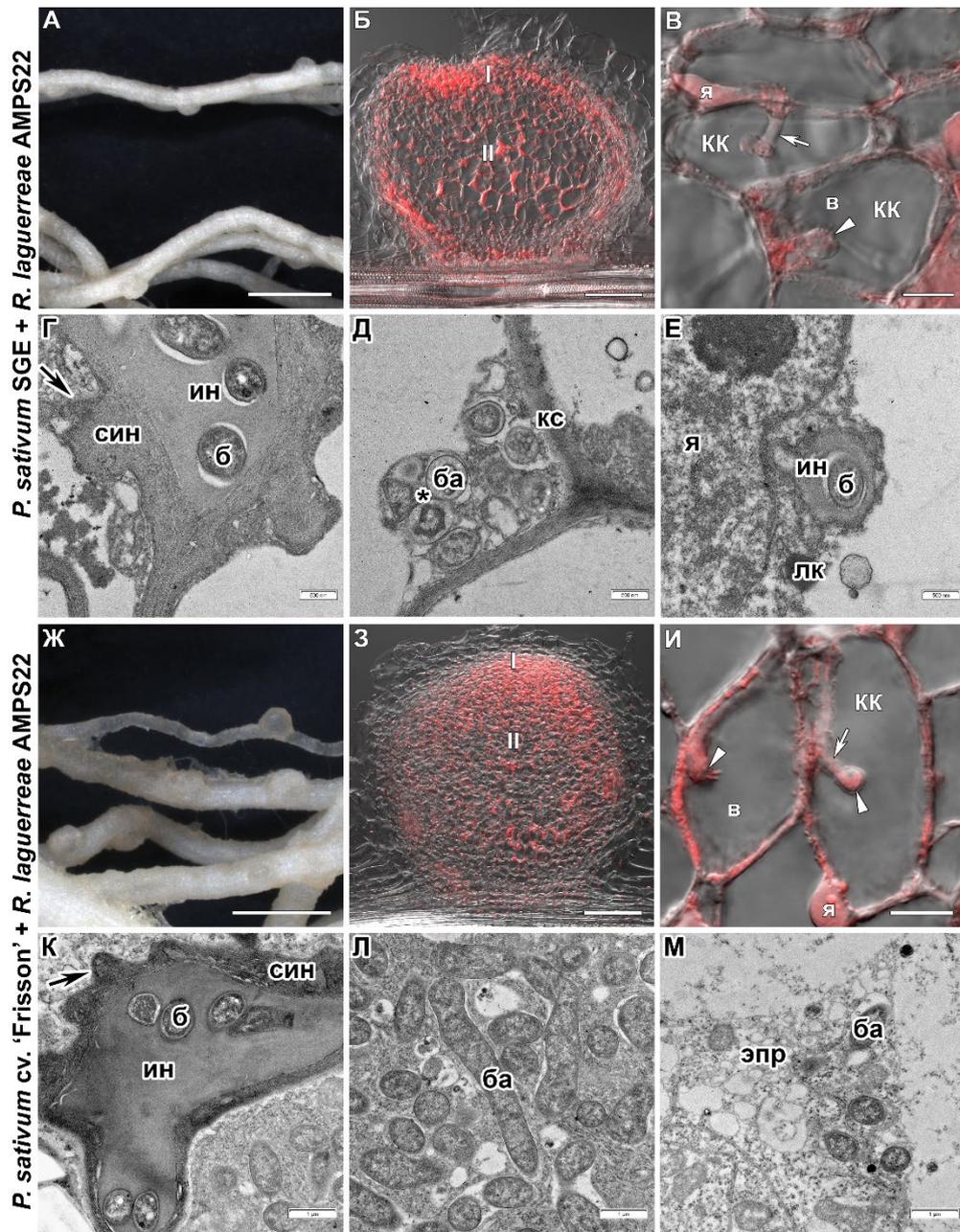


Рисунок 2 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS22

А, Ж — общий вид корней. Б, В, З, И — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции. КК — колонизируемая клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелки указывают на инфекционные нити, наконечники стрелок — на инфекционные капли. Г–Е, К–М — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; син — стенка инфекционной нити; б — бактерия; ба — бактериод; кс — клеточная стенка; черная звездочка (*) — мультибактероидная симбиосома; я — ядро; лк — липидная капля; черная стрелка — вырост стенки инфекционной нити; эпр — эндоплазматический ретикулум. Масштабные линейки: А, Ж — 2 мм, Б, З — 100 мкм, В, И — 10 мкм, Г–Е, К–М — масштаб указан под каждой линейкой.

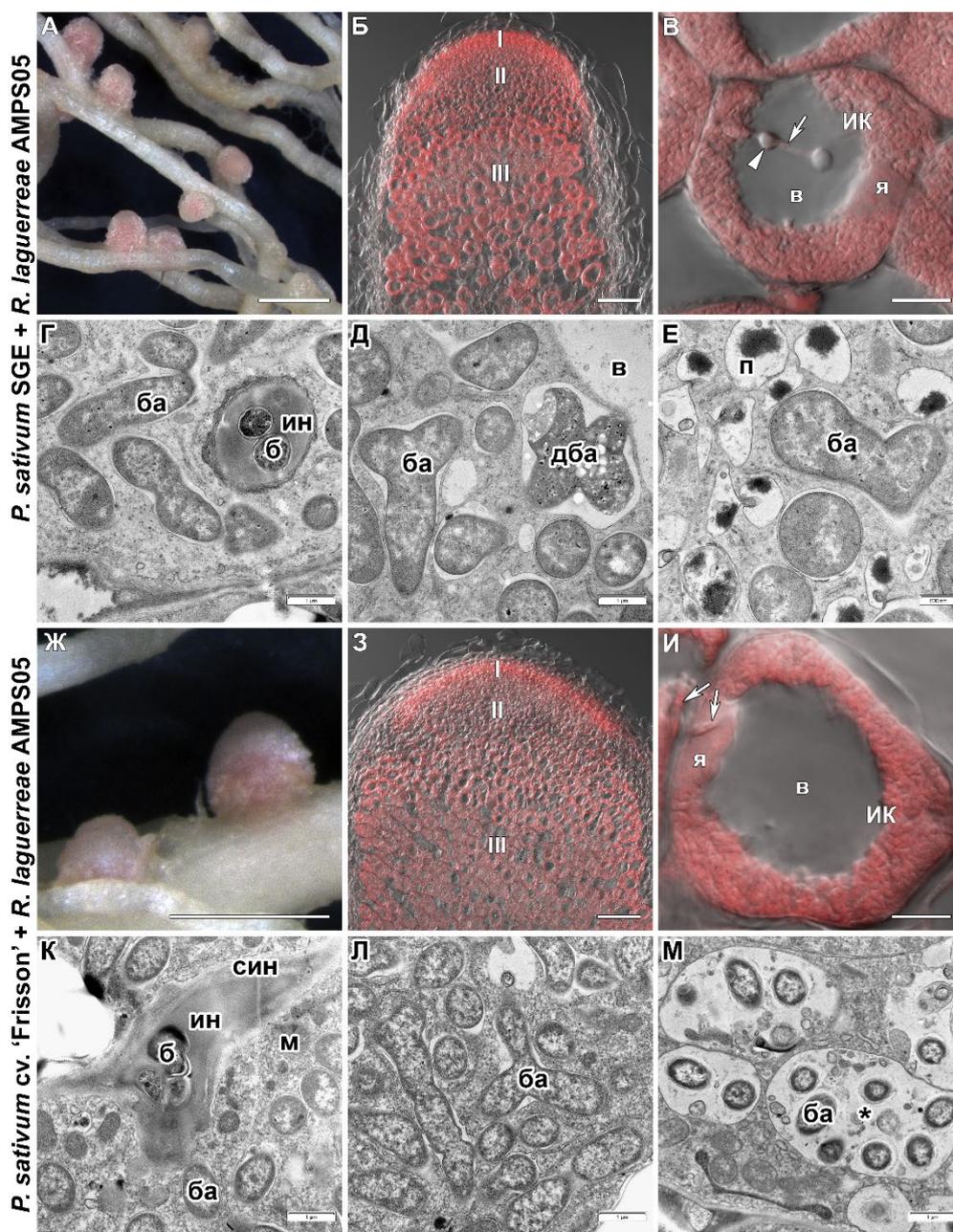


Рисунок 3 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS05

А, Ж — общий вид корней. Б, В, З, И — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации. ИК — инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелки указывают на инфекционные нити, наконечник стрелки — на инфекционную каплю. Г–Е, К–М — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; син — стенка инфекционной нити; б — бактерия; ба — бактериод; дба — дегенерирующий бактериод; п — пероксисома; м — митохондрия; черная звездочка (*) — мультибактериодная симбиосома. Масштабные линейки: А, Ж — 2 мм, Б, З — 100 мкм, В, И — 10 мкм, Г–Е, К–М — масштаб указан под каждой линейкой.

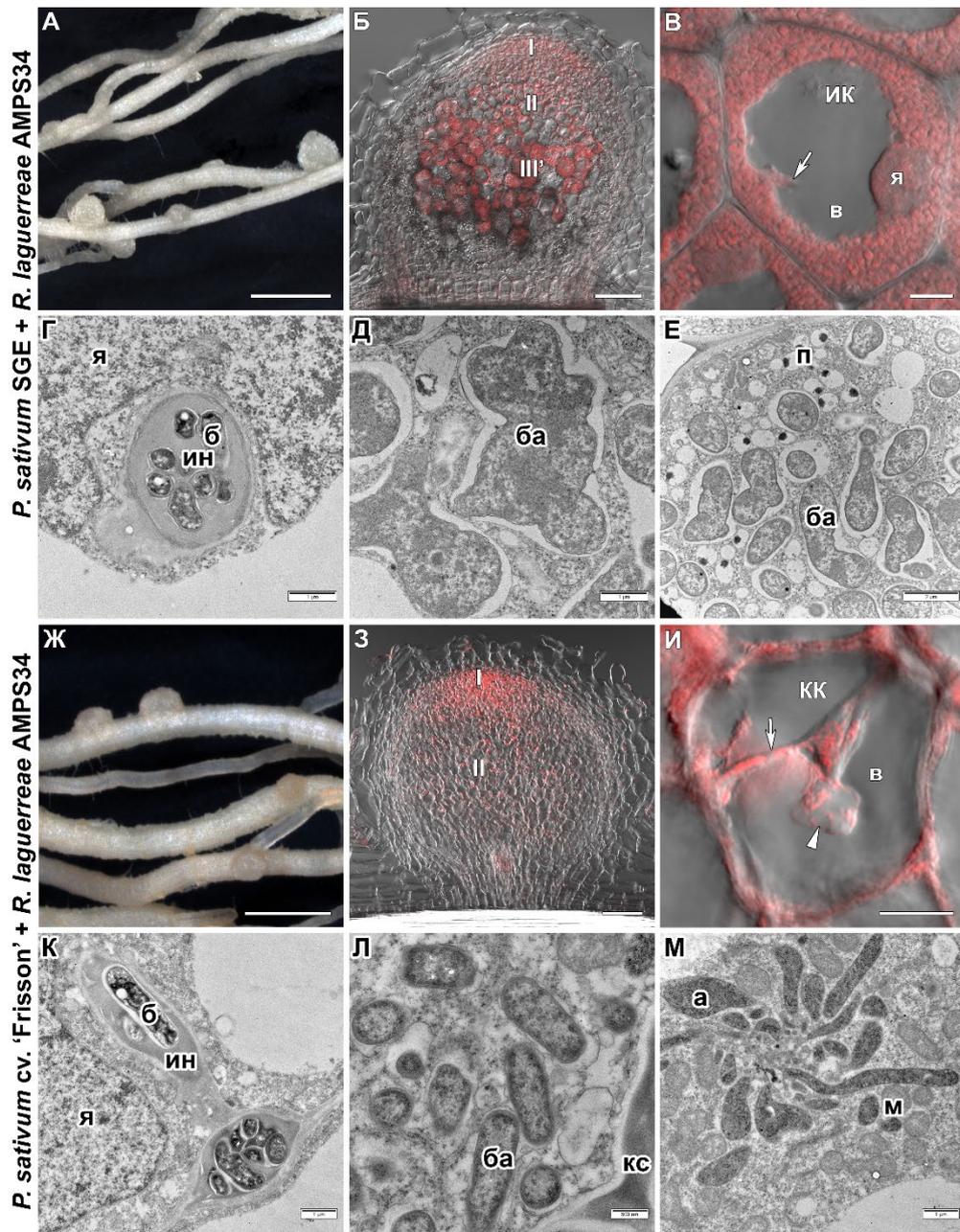


Рисунок 4 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS34

А, Ж — общий вид корней. Б, В, З, И — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III' — зона, соответствующая зоне азотфиксации. ИК — инфицированная клетка; КК — колонизируемая клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелки указывают на инфекционные нити, наконечник стрелки — на инфекционную каплю. Г–Е, К–М — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; б — бактерия; ба — бактероид; кс — клеточная стенка; я — ядро; п — пероксисома; а — амилопласт; м — митохондрия. Масштабные линейки: А, Ж — 2 мм, Б, З — 100 мкм, В, И — 10 мкм, Г–Е, К–М — масштаб указан под каждой линейкой.

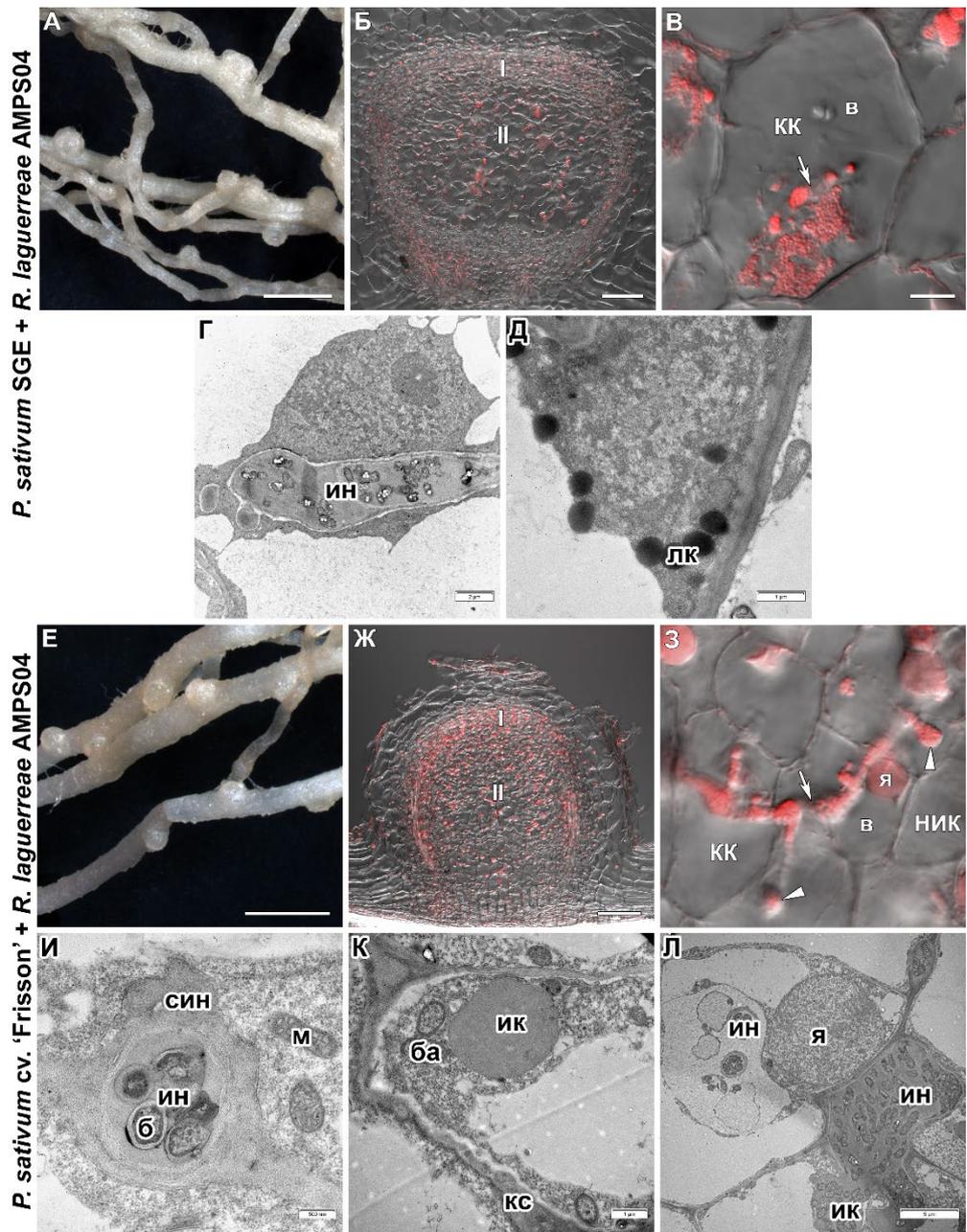


Рисунок 5 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS04

А, Е — общий вид корней. Б, В, Ж, З — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции. КК — колонизируемая клетка; НИК — неинфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелки указывают на инфекционные нити, наконечники стрелок — на инфекционные капли. Г, Д, И–Л — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; син — стенка инфекционной нити; б — бактерия; ба — бактериоид; кс — клеточная стенка; я — ядро; лк — липидная капля; ик — инфекционная капля. Масштабные линейки: А, Е — 2 мм, Б, Ж — 100 мкм, В, З — 10 мкм, Г–Д, И–Л — масштаб указан под каждой линейкой.

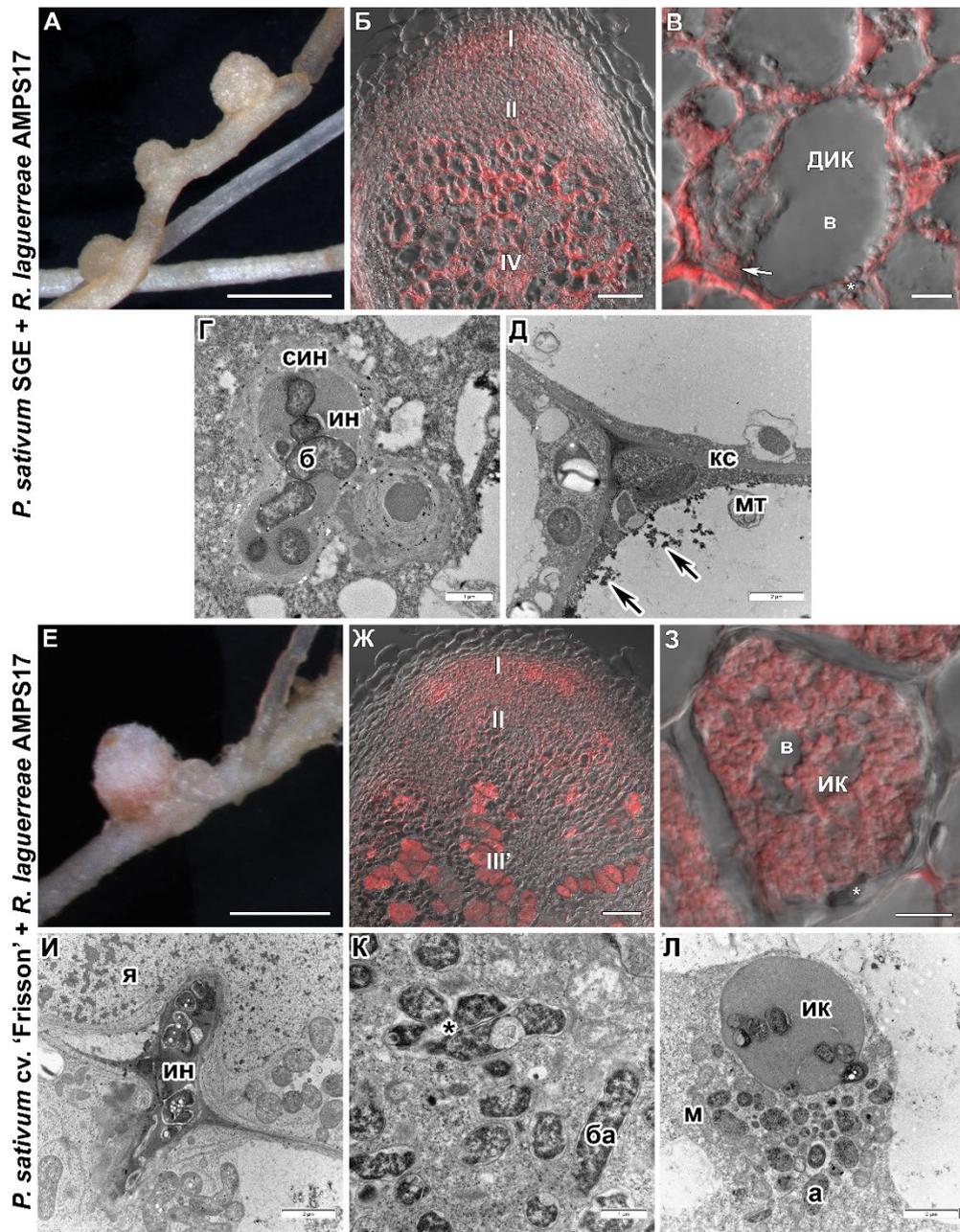


Рисунок 6 — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS17

А, Е — общий вид корней. Б, В, Ж, З — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (ДИС) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона, соответствующая зоне азотфиксации, IV — зона старения. ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка; ИК — инфицированная клетка; в — вакуоль; стрелка указывает на инфекционную нить; белая звездочка (*) — гранулы крахмала. Г, Д, И–Л — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; син — стенка инфекционной нити; б — бактерия; ба — бактериод; кс — клеточная стенка; мт — миелиновое тельце; черная стрелка — белковые агрегаты; я — ядро; ик — инфекционная капля; черная звездочка (*) — мультибактериодная симбиосома; а — амилопласт; м — митохондрия. Масштабные линейки: А, Е — 2 мм, Б, Ж — 100 мкм, В, З — 10 мкм, Г, Д, И–Л — масштаб указан под каждой линейкой.

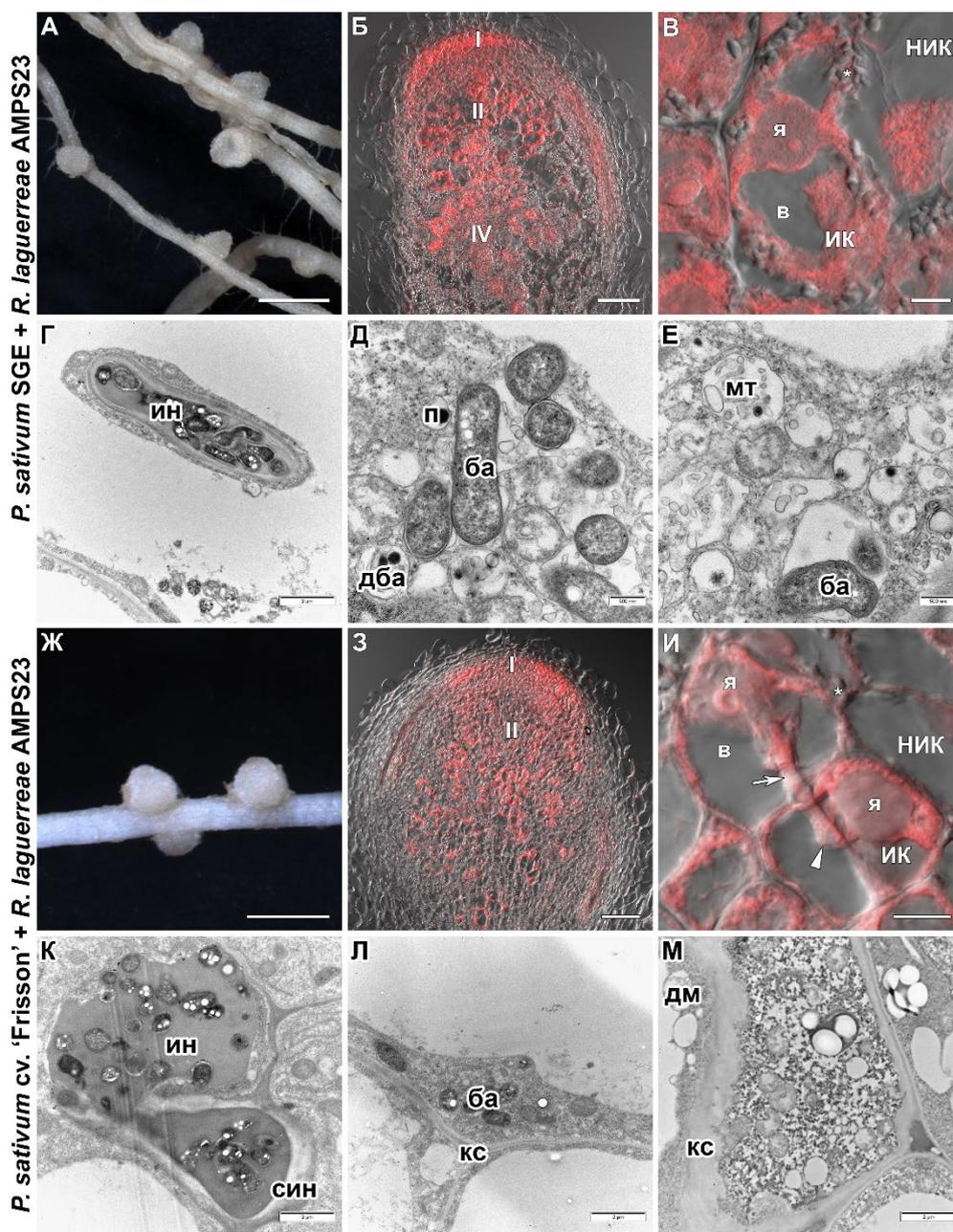


Рисунок 7. — Общий вид, гистологическая и ультраструктурная организация клубеньков гороха, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS23

А, Ж — общий вид корней. Б, В, З, И — совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, IV — зона старения. НИК — неинфицированная клетка; ИК — инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелка указывает на инфекционную нить, наконечник стрелки — на инфекционную каплю; белая звездочка (*) — гранулы крахмала. Г–Е, К–М — просвечивающая электронная микроскопия. ин — инфекционная нить; син — стенка инфекционной нити; ба — бактериод; дба — дегенерирующий бактериод; п — пероксисома; мт — мультивезикулярное тельце; кс — клеточная стенка; дм — дегенерирующая митохондрия. Масштабные линейки: А, Ж — 2 мм, Б, З — 100 мкм, В, И — 10 мкм, Г–Е, К–М — масштаб указан под каждой линейкой.

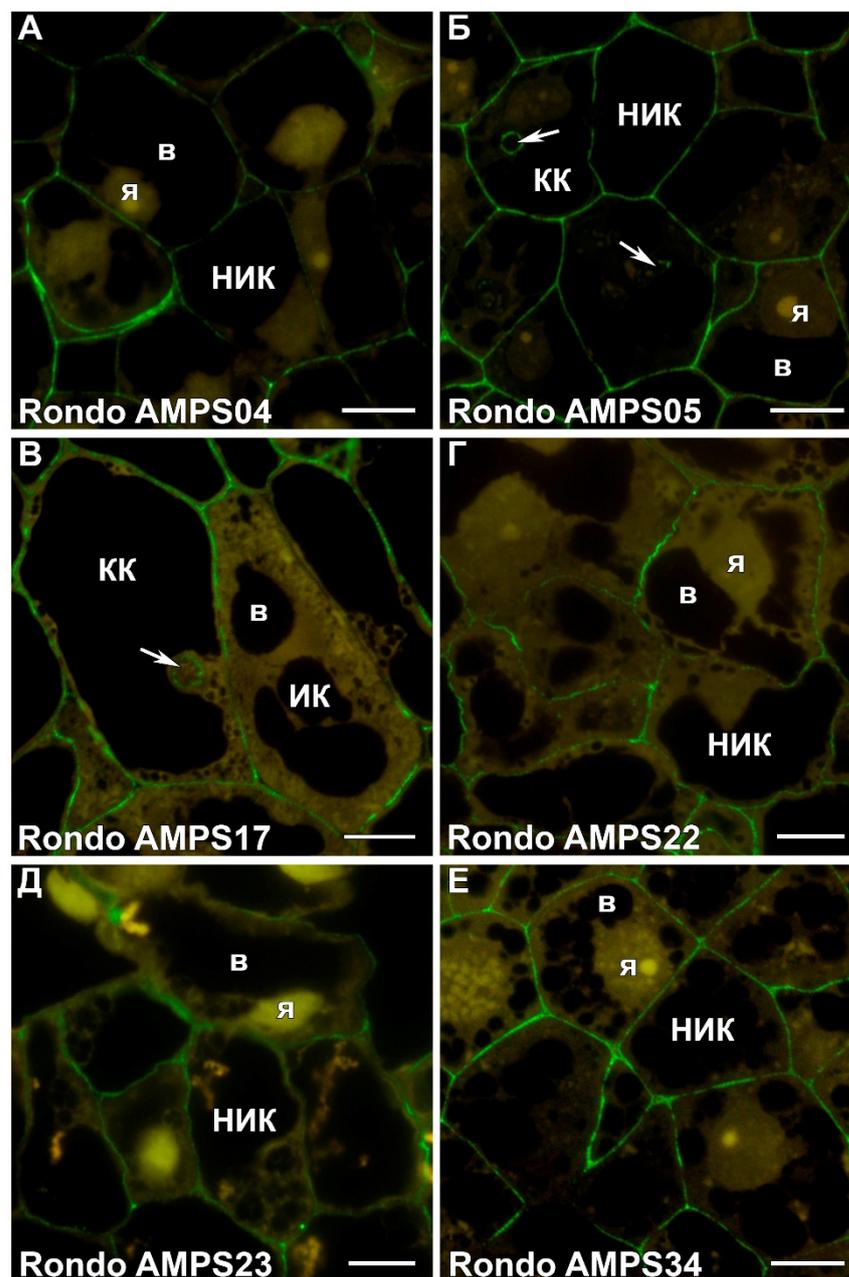


Рисунок 8 — Иммунолокализация эпитопа высоко метил-этерифицированного гомогалактуронана, меченного антителом J1M7, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммунолокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити. Масштабные линейки — 10 мкм.

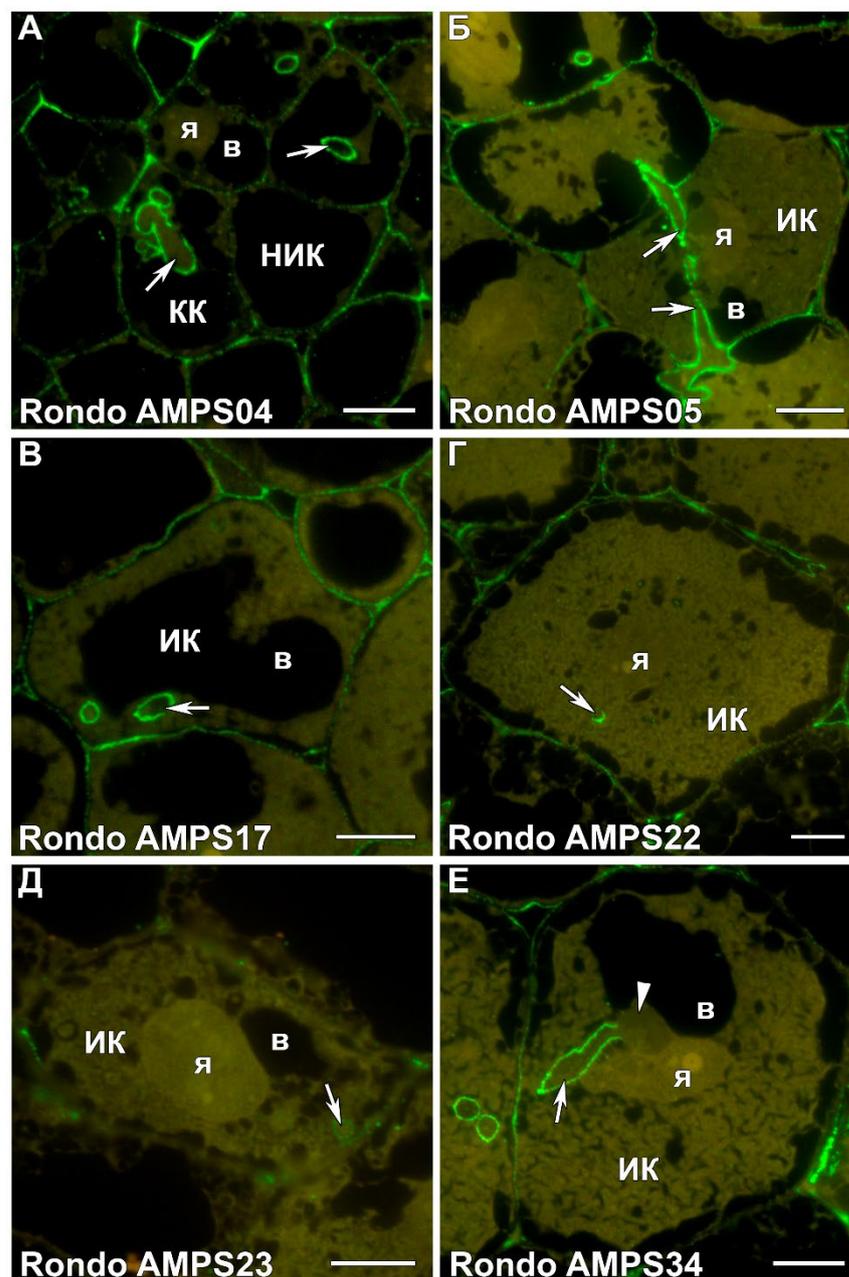


Рисунок 9 — Иммулокализация эпитопа частично метил-этерифицированного гомогалактуронана, меченного антителом J1M5, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммулокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити, треугольником — инфекционная капля. Масштабные линейки — 10 мкм.

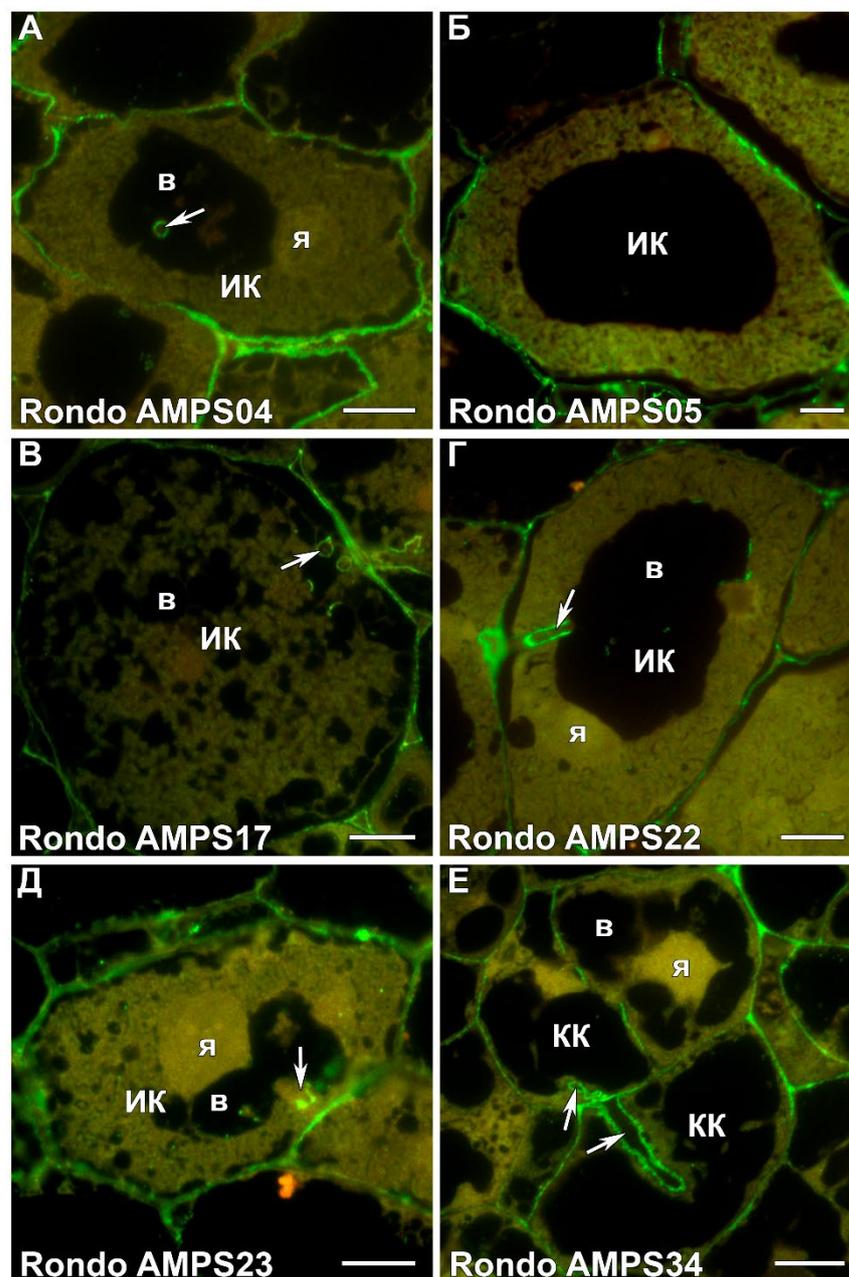


Рисунок 10 — Иммунолокализация эпитопа димерной ассоциации цепей гомогалактуронана через ионы Ca^{2+} , меченного антителом 2F4, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммунолокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити. Масштабные линейки — 10 мкм.

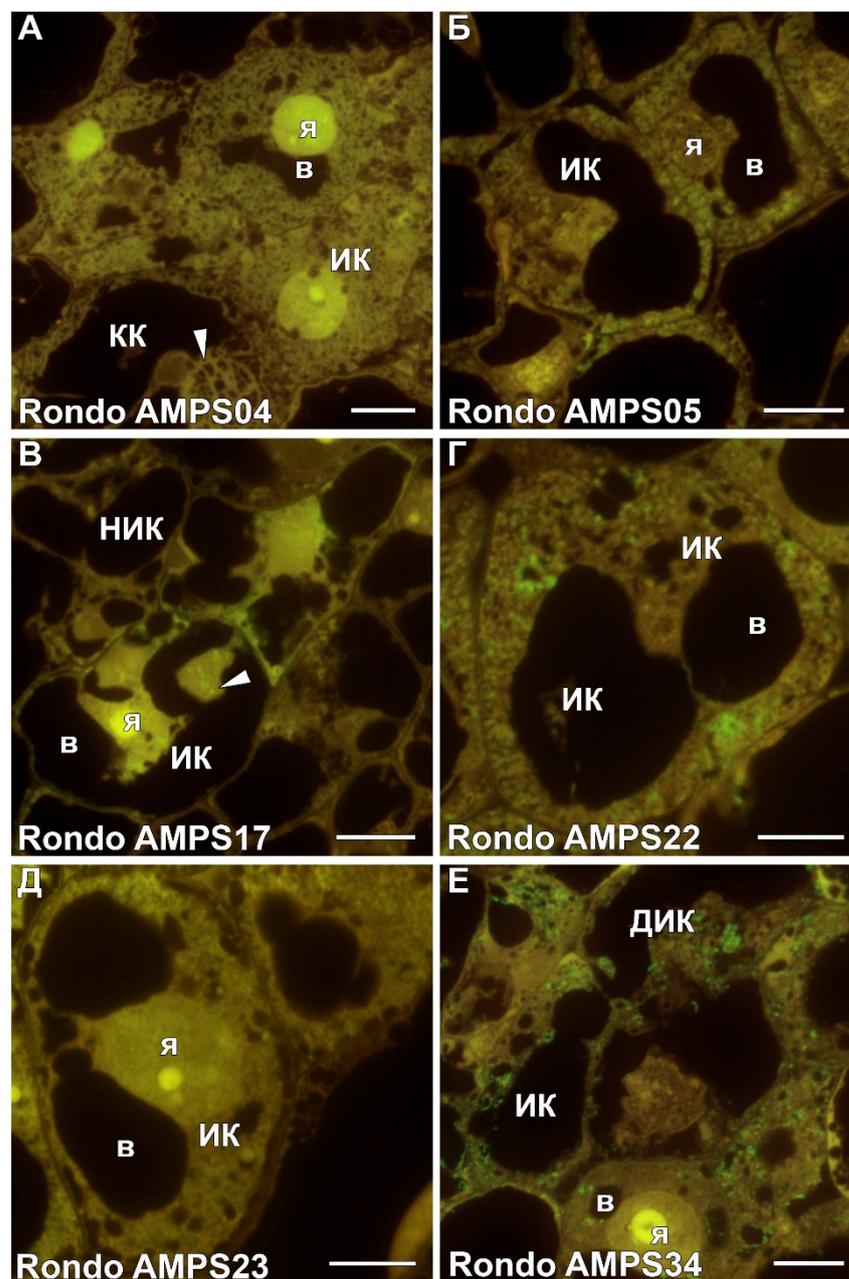


Рисунок 11 — Иммунолокализация эпитопа 1,5- α -L-арабинана рамногалактуронана I, меченного антителом LM6-M, в клубеньках гороха
 Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммунолокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка, НИК — неинфицированная клетка; ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; треугольниками обозначены инфекционные капли. Масштабные линейки — 10 мкм.

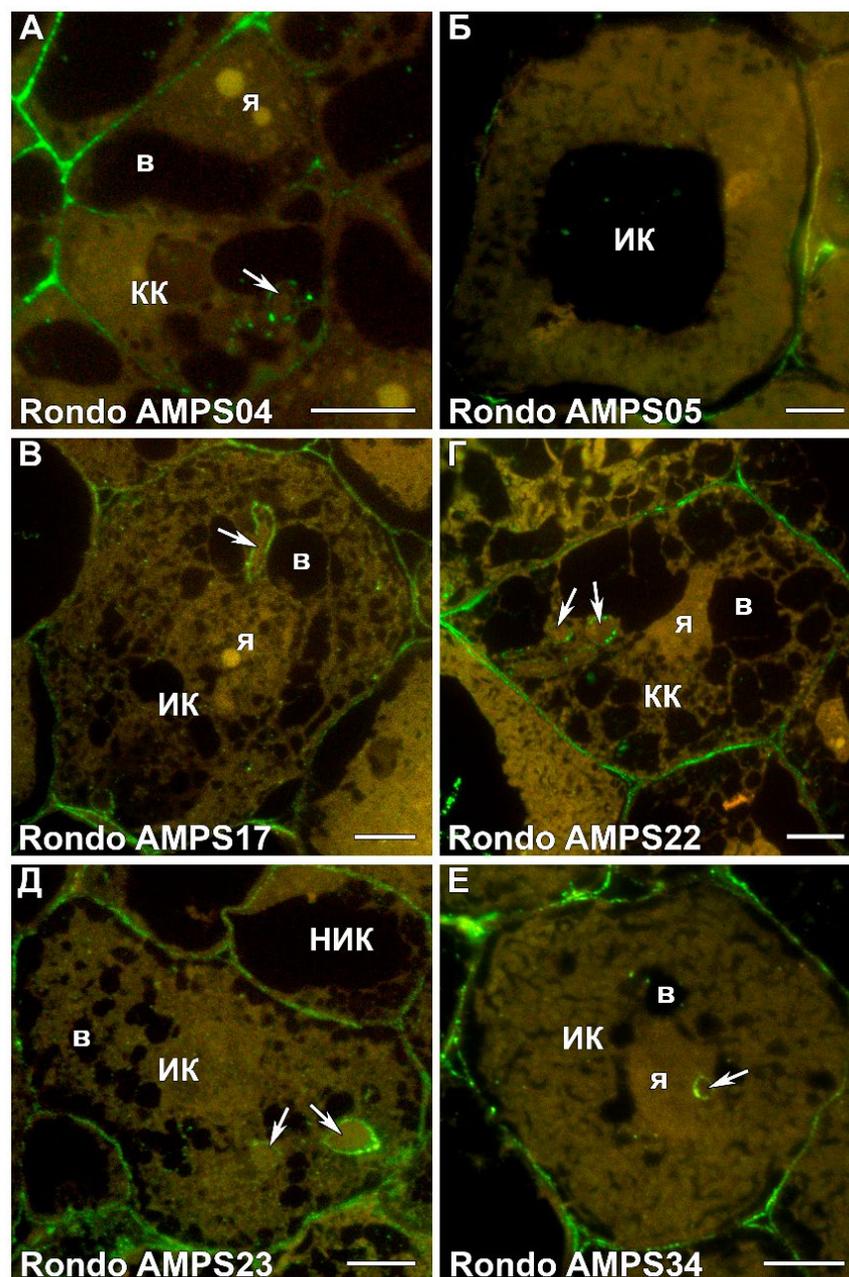


Рисунок 12 — Иммунолокализация эпитопа фукозилированного ксилоглюкана, меченного антителом ССРС-М1, в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. Для иммунолокализации использовали моноклональные вторичные антитела IgG козы против мыши, конъюгированное с AlexaFluor 488. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; я — ядро; в — вакуоль; стрелками обозначены инфекционные нити. Масштабные линейки — 10 мкм.

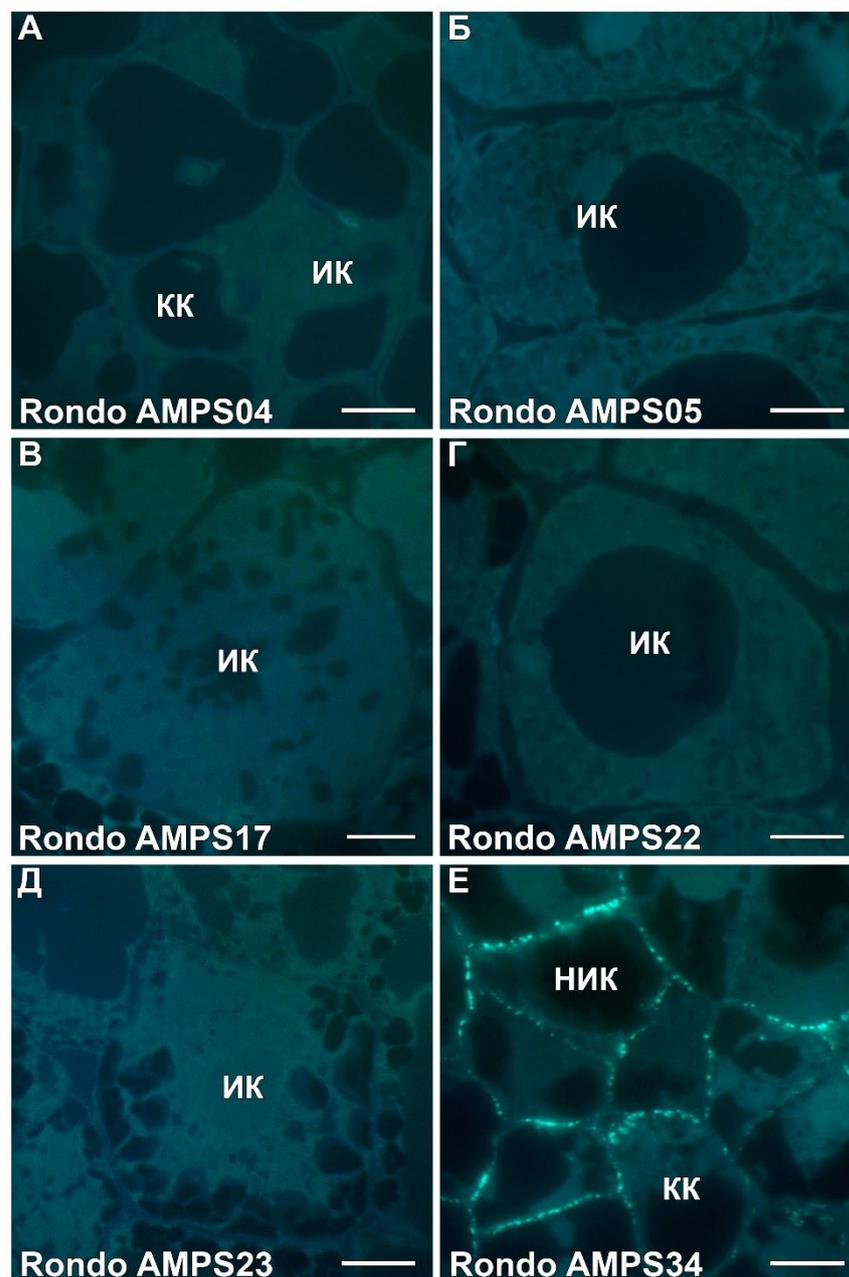


Рисунок 13 — Гистохимическая локализация отложений каллозы в клубеньках гороха

Штамм, используемый для инокуляции, указан на каждой фотографии. КК — колонизированная клетка; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка. Масштабные линейки — 10 мкм.

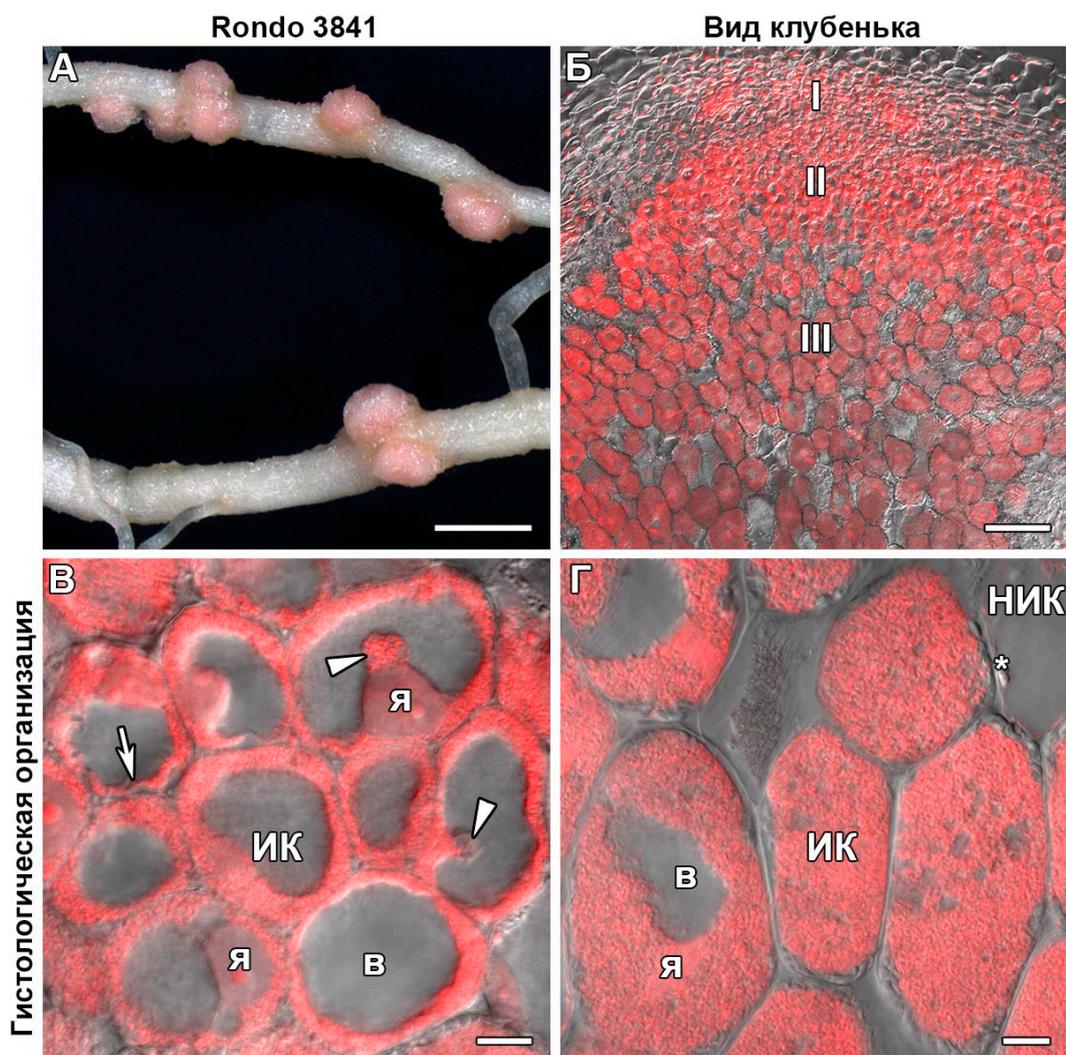


Рисунок 14 — Общий вид и гистологическая организация трехнедельных клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных штаммом *Rhizobium johnstonii* 3841

Совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксация; я — ядро; в — вакуоль; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; звездочкой (*) обозначены гранулы крахмала; стрелка указывает на инфекционную нить; наконечники стрелок — на инфекционные капли. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В, Г — 10 мкм.

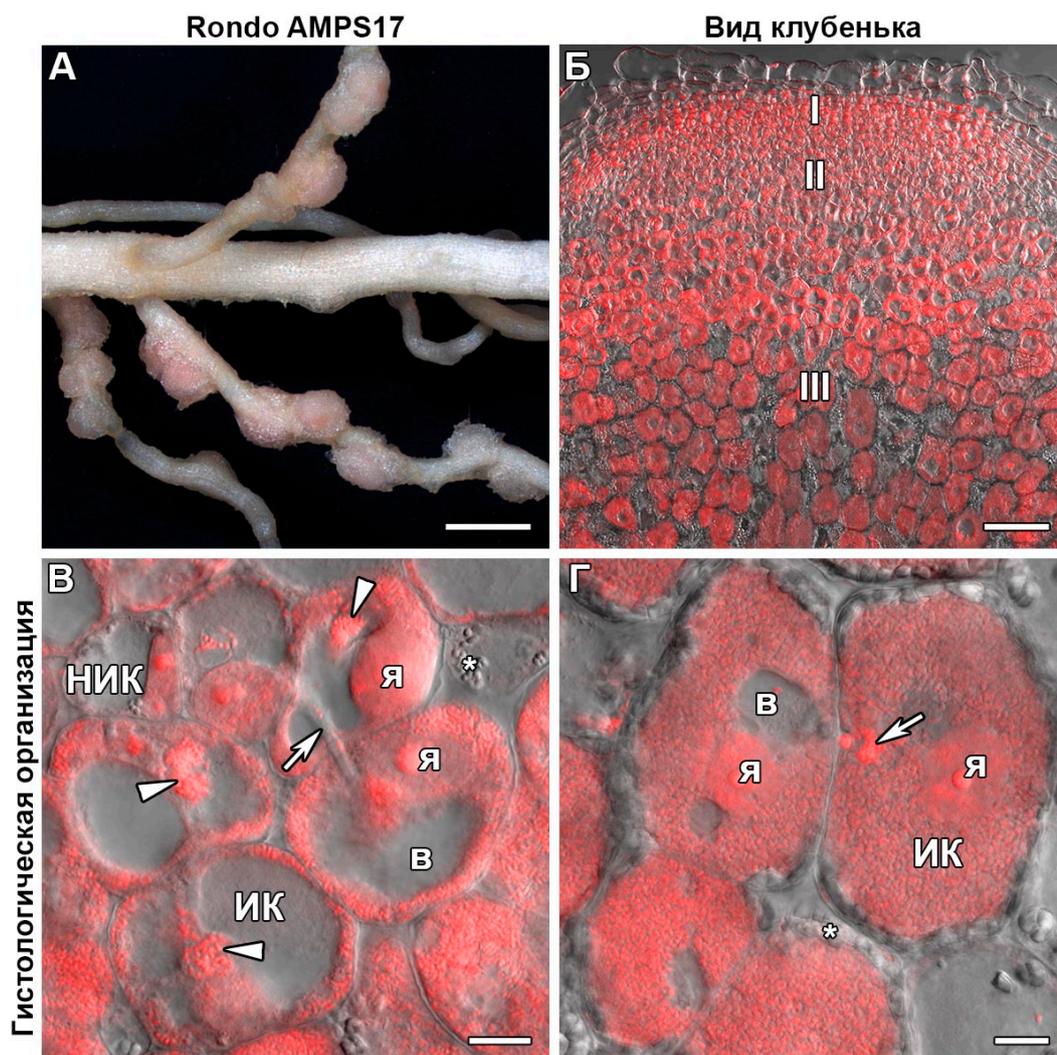


Рисунок 15 — Общий вид и гистологическая организация трехнедельных клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS17

Совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации; я — ядро; в — вакуоль; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; звездочкой (*) обозначены гранулы крахмала; стрелки указывают на инфекционные нити; наконечники стрелок — на инфекционные капли. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В, Г — 10 мкм.

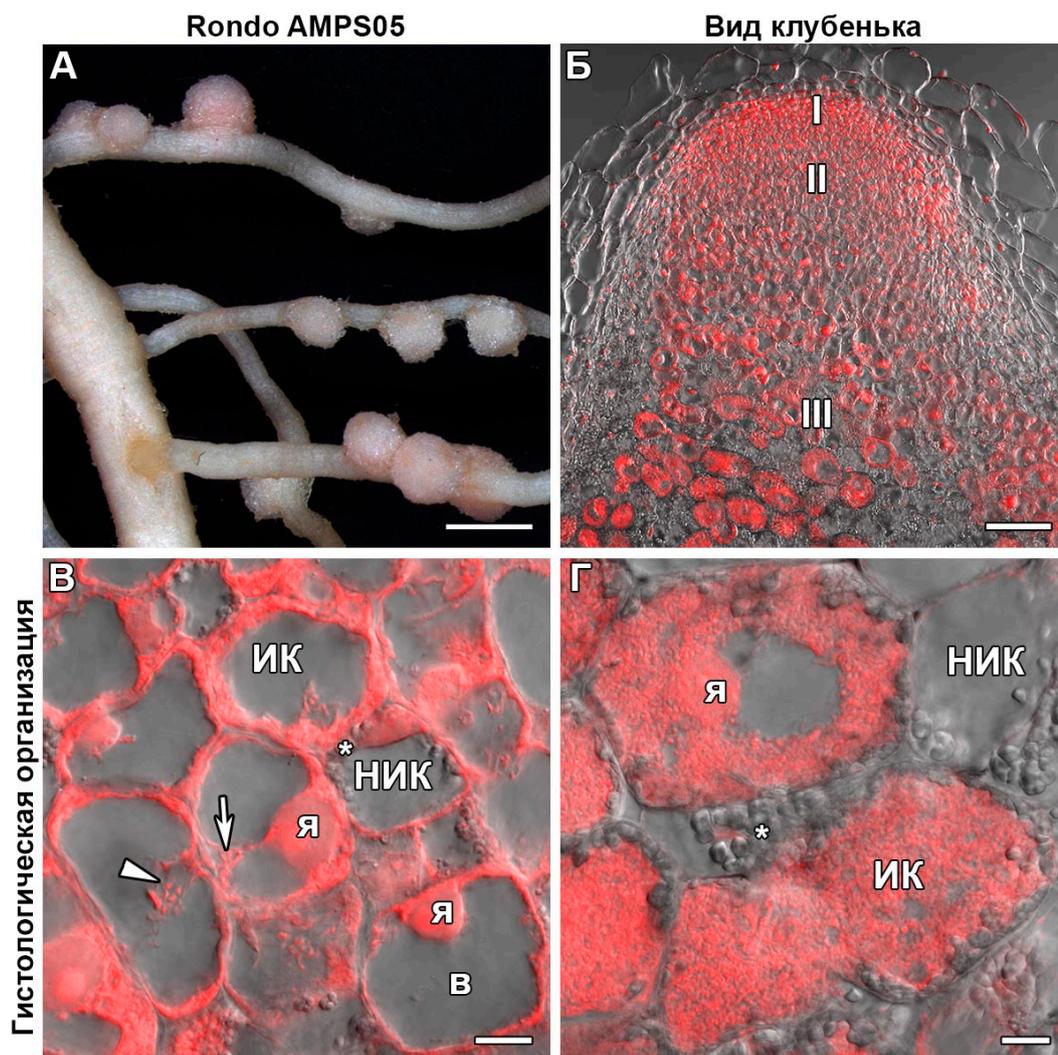


Рисунок 16 — Общий вид и гистологическая организация трехнедельных клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS05

Совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации; я — ядро; в — вакуоль; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; звездочкой (*) обозначены гранулы крахмала; стрелка указывает на инфекционную нить; наконечник стрелки — на инфекционную каплю. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В, Г — 10 мкм.

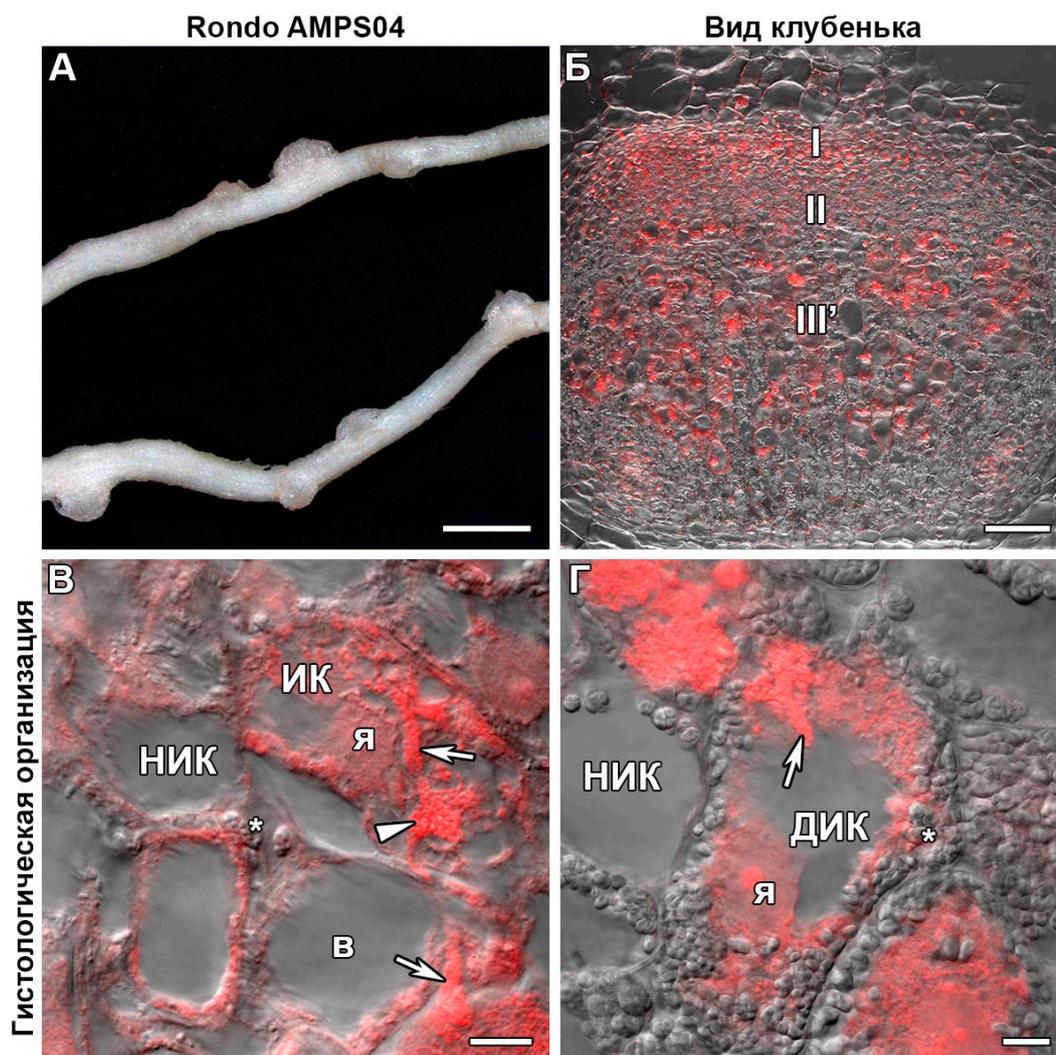


Рисунок 17 — Общий вид и гистологическая организация трехнедельных клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS04

Совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции, III' — зона, соответствующая зоне азотфиксации; я — ядро; в — вакуоль; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; ДИК — дегенерирующая инфицированная клетка; звездочкой (*) обозначены гранулы крахмала; стрелки указывают на инфекционные нити; наконечник стрелки — на инфекционную каплю. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В, Г — 10 мкм.

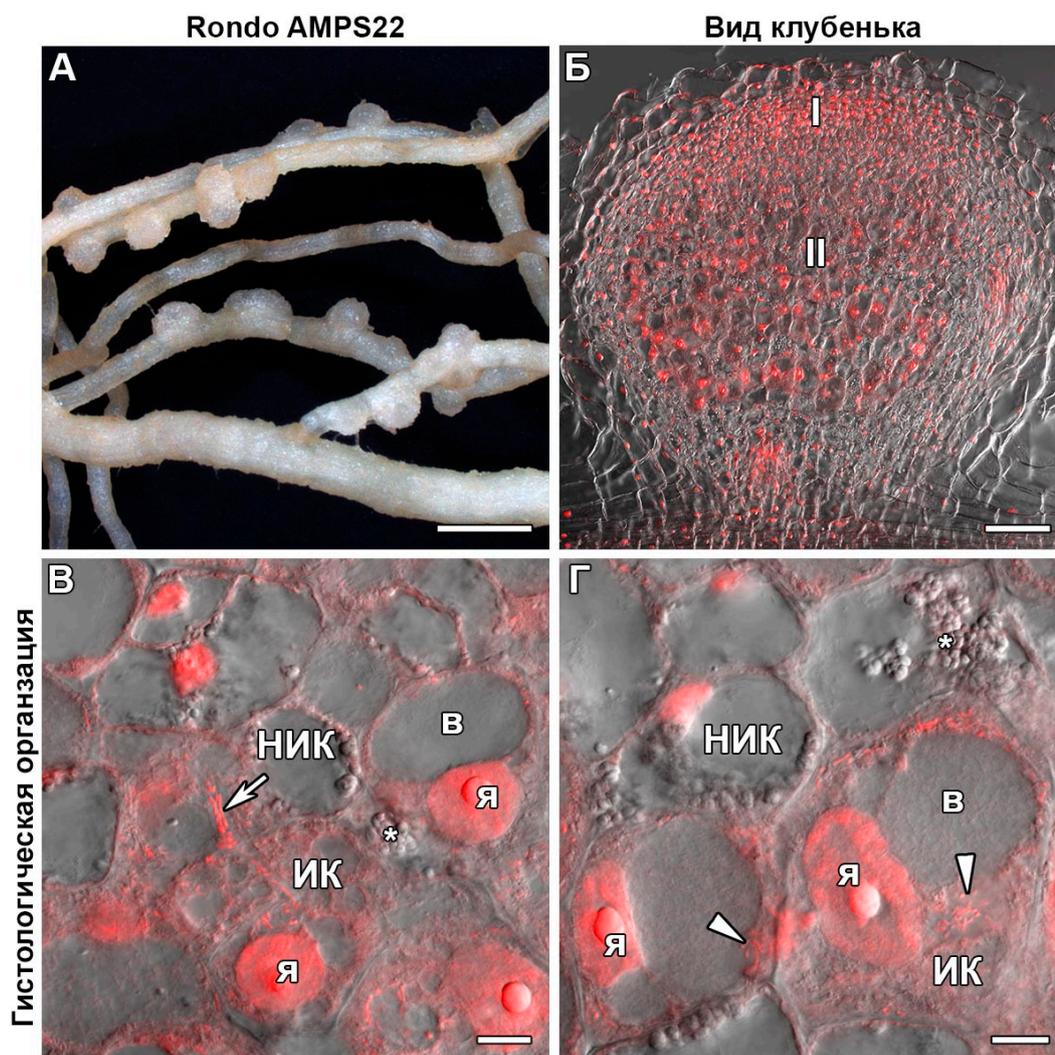


Рисунок 18 — Общий вид и гистологическая организация трехнедельных клубеньков гороха сорта Rondo, индуцированных штаммом *Rhizobium laguerreae* AMPS22

Совмещение оптического среза дифференциально-интерференционного контраста (DIC) и красного канала (ядра и бактерии; ДНК окрашена йодидом пропидия). I — меристема, II — зона инфекции; я — ядро; в — вакуоль; ИК — инфицированная клетка; НИК — неинфицированная клетка; звездочкой (*) обозначены гранулы крахмала; стрелка указывает на инфекционную нить; наконечники стрелок — на инфекционные капли. Масштабные линейки: А — 2 мм, Б — 100 мкм, В, Г — 10 мкм.