

На правах рукописи

Сулима Антон Сергеевич

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА *LUXK*, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО
СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО
(*PISUM SATIVUM* L.) С КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ
*RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM***

Специальность: 03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2020

Диссертационная работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Научном Учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ)

**Научный
руководитель:**

Жуков Владимир Александрович
кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией генетики растительно-
микробных взаимодействий ФГБНУ ВНИИСХМ

**Официальные
оппоненты:**

Богданова Вера Сергеевна
доктор биологических наук,
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения Российской
академии наук (ИЦиГ СО РАН)», старший научный
сотрудник лаборатории генетики и эволюции
бобовых растений

Синюшин Андрей Андреевич
кандидат биологических наук,
ФГБОУ ВО «Московский
государственный университет имени М.В.
Ломоносова», доцент кафедры генетики

**Ведущая
организация:**

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет»

Защита диссертации состоится «27» мая 2020 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.02. при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: <https://www.vir.nw.ru/dissertatsionnyj-sovet/>

Автореферат разослан
«__» _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Елена Вячеславовна Рогозина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – один из ключевых компонентов мирового сельского хозяйства (Borisov *et al.*, 2004; Костерин, 2015) и старейший модельный объект генетики. Подобно другим представителям семейства бобовые (Fabaceae), горох способен вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями из группы ризобий, которые снабжают растение азотом, фиксированным из атмосферы (Тихонович, Проворов, 2009). Биологическая фиксация азота позволяет эффективно использовать потенциал почв и сократить применение минеральных удобрений, оказывающих негативное влияние на окружающую среду, поэтому изучение генетики бобово-ризобиального симбиоза имеет большое практическое значение.

Новейшие методы молекулярной биологии в большинстве своём не адаптированы для гороха, и объём знаний о его симбиотических процессах значительно уступает тому, что к настоящему времени накоплен для модельных бобовых растений (Kulaeva *et al.*, 2017). При этом горох остаётся ценным объектом, изучение которого позволяет обогатить представления о разнообразии бобово-ризобиальных симбиозов и их функционировании благодаря ряду уникальных особенностей, присущих данному растению. Одной из таких особенностей является феномен «афганского» фенотипа – узкая симбиотическая специфичность некоторых форм гороха, происходящих из Передней Азии. Данные формы способны взаимодействовать только с отдельными штаммами ризобий, которые отличаются дополнительным ацетилированием симбиотической сигнальной молекулы (Nod-фактора), обусловленным работой гена *nodX* (Lie, 1978, 1984; Davis, Evans and Johnston, 1988). Таким образом, «афганские» формы гороха представляют собой подходящую модель для изучения специфичности симбиоза, которая является базовым условием отбора наиболее эффективных симбиотических систем и коэволюции партнёров в этих системах.

История открытия «афганского» фенотипа насчитывает уже более 80-ти лет, но все попытки установить детерминант этого признака до сих пор не увенчались успехом. Известно, что за его проявление отвечает единственный ген *Sym2*, для которого определена точка локализации в группе сцепления I генома гороха (Lie, 1984; Kozik *et al.*, 1995; Kozik, 1996). Данный регион содержит несколько весьма сходных по последовательности генов рецепторных киназ, возникших, очевидно, в процессе древней мультипликации предкового гена (Limpens *et al.*, 2003, Sulima *et al.*, 2017). Ранее обнаруженные в этом регионе гены-кандидаты на роль *Sym2* – *Sym37* и *K1*, кодирующие рецепторные киназы из семейства LysM-RLK, – не подтвердили связи с «афганским» фенотипом (Zhukov *et al.*, 2008). Однако в процессе работы с ними была выявлена последовательность нового, неизвестного ранее гена LysM-RLK, названного *LykX* (от англ. LysM Kinase exclusive). Таким образом, ЦЕЛЬЮ представленной диссертационной работы является молекулярно-биологическая и генетическая характеристика ранее неизвестного гена гороха

посевного *LykX*, кандидата на роль *Sym2*, и установление его функции в клубеньковом симбиозе.

В рамках поставленной цели были сформулированы следующие ЗАДАЧИ:

1. Отбор линий гороха, являющихся источниками новых аллелей *Sym2*, на основе фенотипического анализа образцов из коллекции ВИР.

2. Анализ участка генома гороха, соответствующего известной точке локализации *Sym2*.

3. Молекулярно-генетическая характеристика неизвестного ранее гена *LykX*, найденного в районе локализации *Sym2*.

4. Анализ аллельных вариантов гена *LykX* у серии линий, контрастных по признаку образования клубеньков с *nodX* штаммами ризобий (проявляющих широкую и узкую специфичность симбиоза).

5. Поиск мутантных линий, несущих замены в последовательности гена *LykX*, при помощи метода TILLING, и характеристика их симбиотического фенотипа.

6. Тест на аллелизм выявленных мутаций в гене *LykX* и природных аллелей *Sym2*, определяющих узкую специфичность симбиоза.

Научная новизна

В работе впервые идентифицированы 5 образцов гороха посевного, представляющих собой новые источники «афганской» аллели гена *Sym2*. В результате скрининга ВАС-библиотеки гороха посевного в районе локализации гена *Sym2* впервые выявлена полная последовательность ранее неизвестного, уникального для гороха гена рецепторной киназы из семейства LysM-RLK, названного *LykX*. Продемонстрировано, что данный ген имеет два аллельных состояния, коррелирующих с проявлением «афганского» фенотипа и влияющих на аминокислотный состав кодируемого белка. Впервые показано, что две группы гороха с узкой специфичностью к микросимбионту, различающиеся аллельным состоянием гена *LykX*, сформировались независимо друг от друга, и что признак широкой (т.н. «европейской») специфичности симбиоза является не менее древним, чем признак узкой специфичности. Впервые описан симбиотический фенотип мутантов по гену *LykX*; сделан вывод о важности гена *LykX* для успешного проникновения бактерий в клетки корневых волосков гороха. Тест на аллелизм мутаций *lykX* и природных аллелей *Sym2*, коррелирующих с широкой и узкой специфичностью симбиоза, подтвердил гипотезу о тождественности генов *LykX* и *Sym2*. Предложена модель, подразумевающая наличие у гороха сразу двух специфичных рецепторов к Nod-фактору (*Sym37* и *Sym2*), взаимодействующих с противоположными концами сигнальной молекулы.

Практическая значимость

Понимание молекулярно-генетических процессов, лежащих в основе специфичности клубенькового симбиоза, является основой для направленного конструирования комплементарных пар симбионтов, эффективно осуществляющих процесс биологической азотфиксации. В связи с этим выявление и описание гена *LykX* (*Sym2*) представляет важность для создания

новых сортов гороха. Благодаря тому, что его аллельное состояние определяет признак повышенной избирательности к ризобиям, знания о последовательности разных аллелей *LukX* (*Sym2*) могут помочь созданию молекулярного маркера для селекции по данному признаку.

Апробация работы

Основные результаты исследования были доложены на российских и зарубежных конференциях: на Европейской конференции по азотфиксации (ENFC) в 2012 и 2016 гг., на Всемирном конгрессе по азотфиксации (ICNF) в 2015 г., на Международной конференции PlantGen в 2015 г, на Международной конференции PLAMIC в 2018 г, а также на Международной Пушинской школе-конференции молодых учёных «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» в 2010 и 2012-2017 гг.

Результаты диссертационного исследования были получены, в частности, при поддержке следующих грантов:

РФФИ 12-04-32126 мол_а «"Неуловимый" ген *Sym2* гороха посевного (*Pisum sativum* L.), контролирующей специфичность взаимодействия с клубеньковыми бактериями» (2012-2013); руководитель – Жуков В.А.

РФФИ 14-04-32289 мол_а «Рецепторные киназы гороха и их роль в симбиозе и морфогенезе растения» (2014-2015); руководитель – Сулима А.С.

РФФИ 15-29-02737 офи_м «Биоразнообразие бобовых растений по рецепторам веществ, влияющих на эффективность симбиоза с ризобиями» (2015-2017); руководитель – Лутова Л.А.

Личный вклад автора

Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно в лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий ВНИИСХМ. Автор лично осуществлял анализ литературных данных по теме работы, планирование экспериментов, проведение полевых опытов и лабораторных исследований, обработку данных, подготовку материалов для публикации статей и докладов на конференциях. В случаях задействования в работе сторонних организаций (скрининг ВАС-библиотеки гороха, TILLING) автор принимал непосредственное участие в подготовке проб для анализа. Сборка последовательности вставки ВАС-клона была проведена совместно с аспирантом лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий ВНИИСХМ А.М. Афониним. Анализ экспрессии гена *LukX* был проведён совместно со с.н.с. той же лаборатории, к.б.н. О.А. Кулаевой.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 135 страницах, состоит из введения, 4 глав, заключения и выводов. Содержит 11 таблиц, 24 рисунка, 10 приложений. Список литературы включает 233 источника, в том числе 216 на иностранных языках.

Положения, выносимые на защиту

1. Обнаруженный в работе ген *LukX* кодирует один из ключевых элементов симбиотического сигнального каскада у гороха посевного, необходимый для успешного проникновения микросимбионта в клетки корня.

2. Ген *LukX* обладает всем комплексом необходимых признаков для признания его тождественным гену *Sym2* – первому описанному симбиотическому гену гороха, контролирующему признак повышенной избирательности к микросимбионту.

3. Повышенная избирательность к микросимбионту («афганский» фенотип) возникла в истории вида горох посевной неоднократно и независимо: обнаружены две аллели *Sym2*, связанные с проявлением «афганского» фенотипа.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В данной главе представлен анализ научной литературы, касающейся молекулярно-генетических и экологических аспектов мутуалистических растительно-микробных симбиозов. Основное внимание уделено клубеньковому симбиозу бобовых растений, который служит ярким примером высокоинтегрированной симбиотической системы. Описаны основные стадии развития азотфиксирующего клубенька и ключевые растительные гены, задействованные в данном процессе; в том числе изложена история открытия «афганского» фенотипа у гороха посевного, положившая начало глубокому изучению генетики бобово-ризобияльного симбиоза.

Глава 2. Материалы и методы

Растительный материал и условия вегетации. В работе использовали сорта и генетические линии гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и гороха красно-жёлтого (*Pisum fulvum* Sibth. & Sm.) из коллекции Лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий ВНИИСХМ (Санкт-Петербург, Россия), в том числе линии NGB2150 (= Л1357; = cv. Afghanistan), 84, К-6047-2 и cv. Iran, демонстрирующие «афганский» фенотип, и ряд линий с «европейским» фенотипом (широкой специфичностью симбиоза). В летний период растения выращивали в вегетационных домиках в условиях, соответствующих климату в данном регионе (Ленинградская обл., Санкт-Петербург, Пушкин). В осенне-зимний период, а также при необходимости соблюдения особой чистоты эксперимента, растения выращивали в фитотронах при заданных условиях: день/ночь – 16/8 часов; температура – 21°C; относительная влажность воздуха – 75%; освещённость – 38000 люкс.

Штаммы бактерий и условия культивирования. Для анализа симбиотического фенотипа растения гороха инокулировали штаммами бактерий вида *Rhizobium leguminosarum* из коллекции лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий ВНИИСХМ. Штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 (= CIAM1026) и RCAM1026*gusA* имеют *nodX*⁻ генотип и не способны заражать «афганские» формы гороха. Штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* ТОМ и А1 эффективно заражают «афганские» формы

(имеют *nodX*⁺ генотип). Штаммы культивировали на твёрдых средах ТУ и № 79 при температуре 28°C. Инокуляцию растений производили водной суспензией бактерий с конечным содержанием КОЕ/мл не менее 10⁶. Культивирование штамма *Escherichia coli* DH10B, содержащего ВАС-плазмиду со вставкой Psa-B-Cam 446P4, производилось на твёрдой среде LB при температуре 37°C.

Исследование геномной ДНК. Выделение ДНК из растительных клеток осуществляли СТАВ-методом (Rogers, Bendich, 1985) с необходимыми модификациями. ПЦР осуществляли с использованием коммерческого набора ScreenMix-HS (Евроген, Москва) по рекомендациям производителя. Дизайн праймеров осуществляли в программе Primer Select из программного пакета DNASTar и на online-сервисе Oligonucleotide Properties Calculator.

Секвенирование продуктов ПЦР и участков плазмиды проводилось на приборе ABI Prism3500xL в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Анализ результатов секвенирования проводили в программе Vector NTI v.11.

Исследование РНК. РНК из растительных клеток выделяли с помощью коммерческого набора NucleoSpin miRNA по протоколу, рекомендованному производителем. ПЦР в режиме реального времени проводили на автоматическом амплификаторе C1000Thermal Cycler с оптическим модулем CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США) при помощи коммерческого набора qPCRmix-HS SYBR. Количественную оценку экспрессии генов проводили при помощи программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Для определения полной последовательности кДНК гена *LykX* методом RACE-ПЦР использовали наборы кДНК Mint (синтез первой цепи кДНК) и набор праймеров Mint RACE (амплификация концов кДНК) (Евроген, Россия).

Скрининг ВАС-библиотеки гороха посевного. В работе использовалась геномная библиотека гороха посевного Psa-B-Cam, предоставляемая на платной основе Центром геномных ресурсов растений (French Plant Genomic Resource Center, INRA – CNRGV), Франция. Информация о библиотеке доступна по ссылке: https://cnrgv.toulouse.inra.fr/library/genomic_resource/Psa-B-Cam.

Поиск и характеристика мутантов по гену *LykX* с помощью метода TILLING. Поиск мутантов по гену *LykX* осуществляли с применением метода TILLING на коллекции EMS-мутантов гороха сорта Caméor, доступной на платной основе в Отделе изучения геномики растений (Unite de Recherche en Genomique Vegetale), INRA, Франция. Для анализа фенотипа мутантов растения инокулировали штаммом RCAM1026*gusA*. Отрезки корней, собранные на сроке 4 недели после инокуляции, окрашивали по ранее опубликованной методике (Voroshilova *et al.*, 2009) и анализировали при 100-кратном увеличении на световом микроскопе Zeiss Axiovert 35.

Обработка результатов. Статистическую обработку количественных результатов экспериментов проводили в программе Sigma Plot v.12.0 с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), критерий Краскела-Уоллиса (ранговый ANOVA) или U-критерия Манна-Уитни в

случаях, когда данные не подчинялись нормальному распределению или объём выборки был ограничен.

Глава 3. Результаты

Отбор новых генетических линий гороха, проявляющих «афганский» фенотип. Был проанализирован симбиотический фенотип 124 образцов гороха из Передней Азии, полученных из Коллекции зерновых бобовых культур ВИР (Санкт-Петербург). Пять образцов после четырёх недель вегетации образовали клубеньки только со штаммом A1 (*nodX*⁺), но не с RCAM1026 (*nodX*⁻). Тест на аллелизм (скрещивание с типовой «афганской» линией NGB2150 и анализ клубенькообразования у гибридов в F₁ и F₂) подтвердил, что образцы К-1878, К-3374, К-3821, К-4901 и К-6559 являются новыми источниками аллелей гена *Sym2*, определяющих узкую специфичность взаимодействия с ризобиями.

Обнаружение нового гена *LykX* и скрининг ВАС-библиотеки гороха. В ходе исследования генов гороха, участвующих в рецепции Nod-фактора (Zhukov *et al.*, 2008), был случайно амплифицирован фрагмент неизвестного гена, имеющего высокое сходство с генами *LysM-RLK K1* и *Sym37*, которые расположены в регионе локализации *Sym2*, но не идентичны ему. Данный ген был назван *LykX* (от англ. *LysM Kinase eXclusive*). Генетическое картирование показало, что *LykX* находится в том же участке генома, что и *Sym2*, то есть является перспективным кандидатом на роль *Sym2*.

В результате проведённого скрининга ВАС-библиотеки гороха посевного *Psa-B-Cam* с использованием фрагмента *LykX* в качестве пробы был обнаружен единственный ВАС-клон *Psa-B-Cam 446P4*, содержащий сразу три гена рецепторных киназ – *Sym37*, *K1* и *LykX*. Секвенирование геномной вставки клона *Psa-B-Cam 446P4* с последующей сборкой позволило получить три контига общей протяжённостью около 120 kb (рис. 1). В полученных контигах выявлены полные последовательности трёх генов рецепторных киназ – *Sym37*, *K1* и *LykX*. Последовательности контигов размещены в базе данных NCBI под номером MF185734.

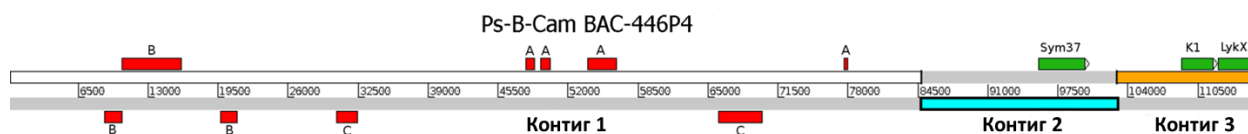


Рисунок 1. Геномная ВАС-вставка *Psa-B-Cam 446P4*.

Гены *Sym37*, *K1* и *LykX* обозначены зелёными прямоугольниками. Красные прямоугольники обозначают расположение мобильных генетических элементов: А – фрагменты транспозонов типа OGRE, В – фрагменты транспозонов типа *Cyclops-2*, С – фрагменты ретротранспозонов типа *Tu3* (иллюстрация из Sulima *et al.*, 2017).

Описание нового гена гороха *LykX*, кодирующего *LysM-RLK*. Ген *LykX* является экспрессирующимся геном, что было доказано с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Показан высокий уровень экспрессии *LykX* в неинокулированных корнях, а также наличие экспрессии в клубеньках возраста 4 недели (рис. 2). Дополнительно было отмечено наличие

последовательности транскрипта *LykX* в сборках транскриптомов клубеньков гороха, доступных на NCBI.

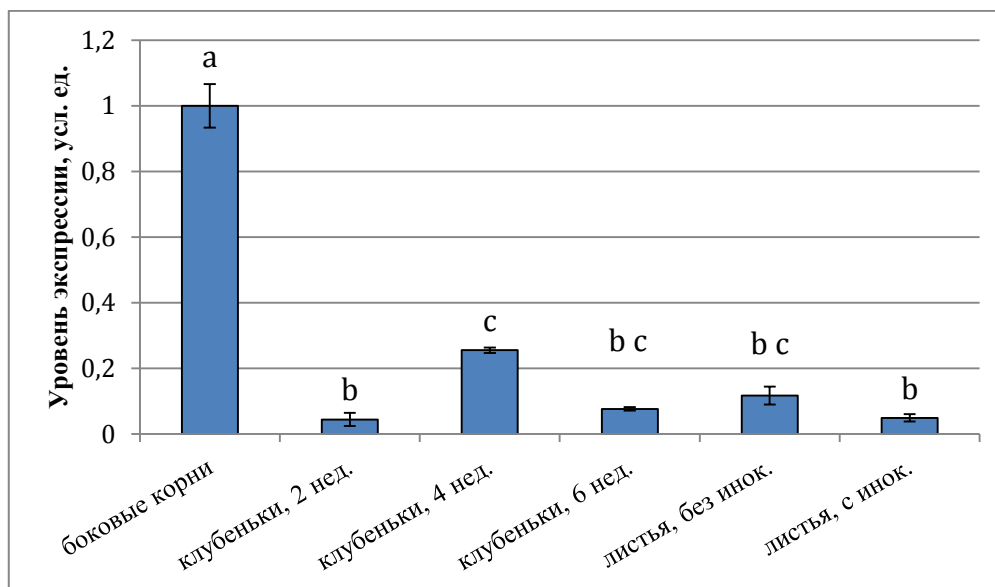


Рисунок 2. Экспрессия гена *LykX* в корнях, клубеньках и листьях гороха.

Уровень экспрессии измерялся относительно референсных генов *GAPDH* и *Actin2*. Одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий в уровнях экспрессии (однофакторный ANOVA, $P < 0,05$). Интервалы показывают стандартное отклонение.

С помощью RACE-ПЦР были установлены последовательности 5' и 3'-некодирующих областей кДНК *LykX*, затем полная последовательность транскрипта была амплифицирована с использованием праймеров к этим участкам. Сравнение кодирующей части транскрипта с последовательностью геномной копии позволило установить экзон-интронную структуру *LykX* (рис. 3, А). Полная последовательность гена *LykX* линии Caméог депонирована в базу данных GenBank под номером MF135533.

Предполагаемый белок, кодируемый геном *LykX*, состоит из рецепторного домена, включающего три LysM-модуля, трансмембранного домена и киназного домена (рис. 3, В). Белок *LykX* обладает наибольшим сходством с LysM-RLK *M. truncatula* LYK4, а также LYK1 и LYK5, при этом его киназный домен не содержит YAQ-модуля, характерного для всех ранее известных симбиотических LysM-RLK бобовых растений. Однозначно определить ортолог гена *LykX* у *M. truncatula* оказалось невозможным, поскольку различные фрагменты *LykX* демонстрируют максимальное сходство с разными генами люцерны, включая транскрибируемую последовательность Mtr.51442.1.S1_at с неизвестной функцией. По этой причине справедливо рассматривать *LykX* как ген, уникальный для гороха.

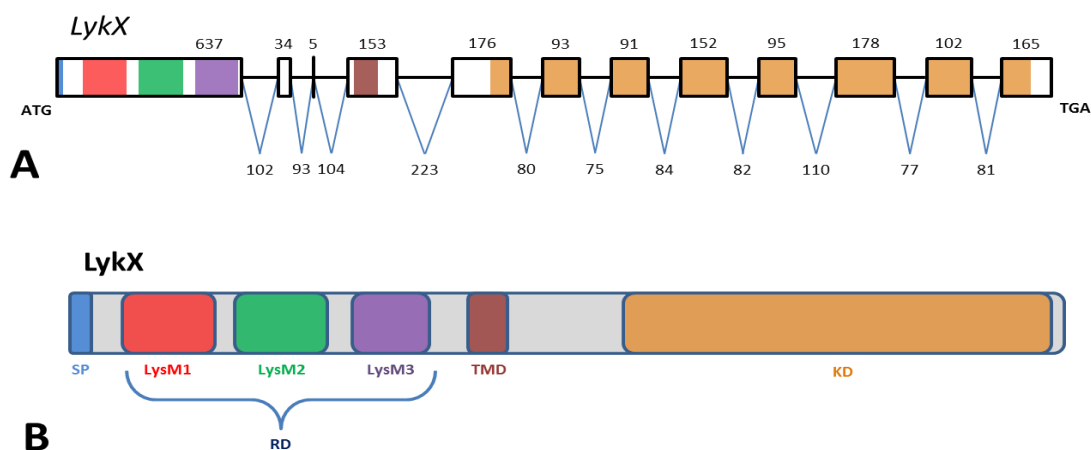


Рисунок 3. Экзон-интронная структура гена *LykX* (А) и доменная структура соответствующего ему белка (В).

Вверху (А) экзоны обозначены прямоугольниками, интроны – отрезками. Цифрами указан размер участков в п.н. Цвета соответствуют цветам белковых доменов на рисунке внизу (В). SP – сигнальный пептид; LysM1-3 – LysM-модули рецепторного домена; RD – рецепторный домен; TMD – трансмембранный домен; KD – киназный домен (иллюстрация из Sulima *et al.*, 2017).

Вариабельность первого экзона гена *LykX* коррелирует с проявлением специфичности симбиоза. Если ген *Sym2* действительно кодирует белок-рецептор, воспринимающий структуру молекулы Nod-фактора, последовательность его рецепторного домена должна иметь различия, свойственные разновидностям гороха с широкой или узкой специфичностью (т.е. «европейским» и «афганским»). Чтобы узнать, удовлетворяет ли *LykX* этому условию, последовательность его первого экзона (кодирующая рецепторный домен) была секвенирована у ряда линий гороха с «европейским» и «афганским» фенотипом, включая выявленные в рамках данного исследования. Были обнаружены гаплотипы *LykX*, характерные исключительно для линий с узкой специфичностью, включая типовую линию NGB2150 (табл. 1). Кроме того, у двух линий с узкой специфичностью, выявленных в данном исследовании, были обнаружены уникальные точечные замены, не характерные ни для «европейских», ни для других «афганских» линий (табл. 1). Новое аллельное состояние *LykX* было названо «таджикским», по месту происхождения линии К-3821, у которой оно было показано впервые.

Выявленные нуклеотидные замены приводят к замене одной («таджикская» аллель) либо трёх («афганская» аллель) аминокислот относительно «европейского» варианта. При этом в случае «таджикской» аллели аргинин (R) замещён пролином (P), который характеризуется повышенной конформационной жёсткостью, способной влиять на вторичную структуру белка. Важно отметить, что все эти характерные замены сосредоточены в первом LysM-модуле, что косвенно указывает на важность именно этого модуля для функционирования белка LykX.

Таблица 1. Аминокислотные замены в белке *LykX*, характерные для линий гороха с разной специфичностью симбиоза

Линия гороха*	Позиция замены в белке			
	44	45	75	76
NGB2150	R	Y	R	D
K-6883 (84)	R	Y	R	D
6047-2	R	Y	R	D
cv. Iran	R	Y	R	D
K-1878	R	Y	R	D
K-4901	R	Y	R	D
K-6559	R	Y	R	D
K-3374	Q	N	P	A
K-3821	Q	N	P	A
Caméor	Q	N	R	A
Finale	Q	N	R	A
SGE	Q	N	R	A
<i>P.fulvum</i> 701	Q	N	R	A

*: зелёным цветом выделены линии с «афганской» аллелью *LykX*, красным – с «европейской» аллелью, синим – с «таджикской» аллелью, жёлтым – линия *P. fulvum* 701 (с «европейской» аллелью *LykX*). Рамкой выделены линии с узкой специфичностью симбиоза («афганским» фенотипом) (таблица из Sulima *et al.*, 2019).

Значительные отличия между «афганской» и «таджикской» аллелями *LykX* указывают на их независимое происхождение. Секвенирование первого экзона *LykX* у дикого родственника гороха посевного *P. fulvum* 701 показало, что он обладает типичной «европейской» аллелью данного гена. Таким образом, признак широкой («европейской») специфичности является столь же древним, что и признак узкой специфичности, которая возникала как минимум дважды: у «афганских» и «таджикских» форм.

Поиск мутантов по гену *LykX* с применением метода TILLING и описание их симбиотического фенотипа. Для установления биологической роли гена *LykX* был проведён отбор мутантов с использованием метода TILLING (поиск генетических линий, несущих мутации в пределах известной последовательности). В результате скрининга были выявлены 23 мутантные семьи (табл. 2). Из них было отобрано 8 семей с такими мутациями в гене *LykX*, которые с наибольшей вероятностью приводят к нарушению функции кодируемого белка (согласно предсказанию алгоритма SIFT (Kumar, Henikoff and Ng, 2009)). Растения этих восьми семей были размножены во ВНИИСХМ, и в дальнейшей работе были использованы растения, у которых подтвердилось наличие мутантной аллели гена *LykX* в гомозиготном состоянии.

Таблица 2. Результаты поиска мутантов по гену *LukX* методом TILLING

	WT	Mut	Позиция, гДНК	Позиция, кДНК	Позиция, белок	Семья*	Тип мутации	Прогноз SIFT**
Til 1	C	T	266	266	P89L	1427	миссенс	damaging
	G	A	286	286	E96K	1955	миссенс	tolerated
	G	A	296	296	G99E	1645	миссенс	damaging
	G	A	346	346	A116T	1212	миссенс	tolerated
	G	A	361	361	A121T	539	миссенс	damaging
	G	A	369	369	L123L	2520	синоним.	-
Til 6	C	T	660	интрон	-	2287	интронная	-
	C	T	769	667	P223S	2251	миссенс	tolerated
	G	A	484	484	D162N	1043	миссенс	tolerated
	G	A	515	515	R172K	1870	миссенс	tolerated
	G	A	541	541	A181T	810	миссенс	tolerated
	G	A	565	565	G189R	1631	миссенс	tolerated
	G	A	607	607	G203R	1215	миссенс	damaging
	G	A	637	637	D213N	1263	сплайсинг	tolerated
Til 2	G	A	1468	945	L315L	2266	синоним.	-
	C	T	1216	интрон	-	841	интронная	-
Til 5	C	T	1512	989	A330V	1480	миссенс	damaging
	C	T	1640	1037	A346V	998	миссенс	damaging
	C	T	1658	1055	A352V	832	миссенс	tolerated
	G	A	1514	991	E331K	676	миссенс	tolerated
	G	A	1542	интрон	-	963	интронная	-
	G	A	1639	1036	A346T	2543	миссенс	damaging
	G	A	1822	1144	E382K	1362	миссенс	damaging

*: жирным выделены семьи, вовлечённые в дальнейшую работу.

** : предполагаемый эффект мутации на функцию кодируемого белка: вредный (damaging) или нейтральный (tolerated).

Во всех мутантных семьях выявлялись растения с различными внешними дефектами надземной части (карликовость, хлороз, аномалии развития цветков и бобов). Проявление данных признаков не коррелировало с аллельным состоянием гена *LukX*, и, по-видимому, было вызвано иными мутациями. Таким образом, было установлено, что ген *LukX* напрямую не влияет на развитие надземной части растения.

Анализ клубенькообразования у мутантов по гену *LukX* выявил симбиотическую роль изучаемого гена. Все мутанты *lukX* на сроках 2 и 4 недели после инокуляции характеризовались сниженным количеством клубеньков по сравнению с исходной линией Caméog, хотя выраженность различий варьировала в зависимости от мутантной семьи (рис. 4). Среди растений одной мутантной семьи зачастую также наблюдалось значительное варьирование количества образованных клубеньков (рис. 4).

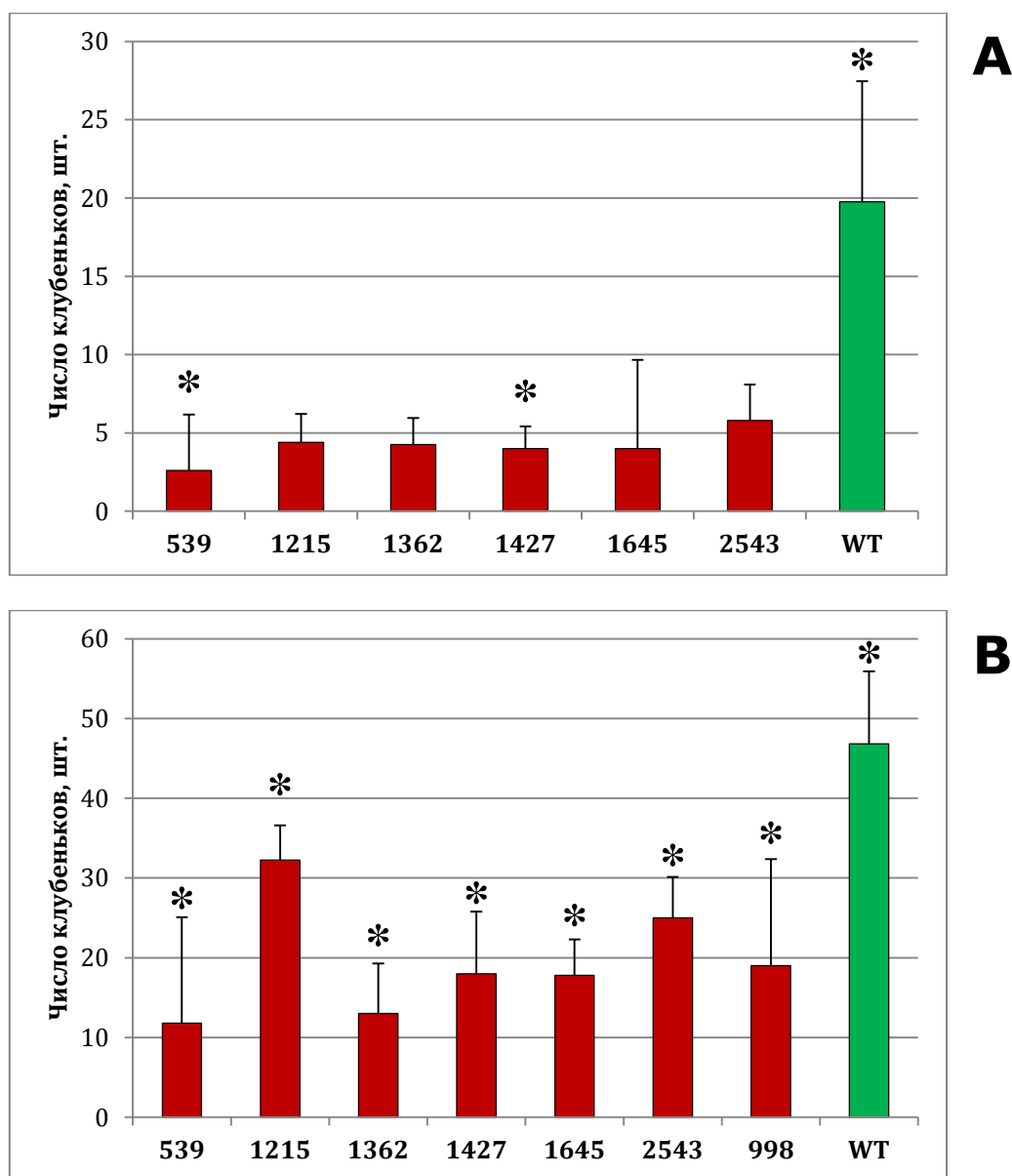


Рисунок 4. Количество клубеньков, образованных мутантами по гену *LykX* при инокуляции штаммом RCAM1026 на сроке 2 недели (А) и 4 недели (В).

Интервалы показывают стандартное отклонение. На сроке 2 недели достоверны различия между диким типом (WT, сорт Caméor) и мутантами 539 и 1427 (ранговый ANOVA, $P < 0,05$). На сроке 4 недели различия между диким типом и каждым из мутантов статистически достоверны (однофакторный ANOVA, $P < 0,05$).

Для проверки влияния мутации в гене *LykX* на самые ранние этапы развития симбиоза был проведён микроскопический анализ инфекционных событий. Для каждого растения было определено общее количество корневых волосков, нормализованное по количеству полей зрения, и доля скрученных корневых волосков (скручивание корневых волосков является ранним ответом растения на присутствие ризобий) (рис. 5). Было выяснено, что растения мутантных семей 998, 1362, 1427 и 1215 по относительному количеству скрученных волосков не отличаются от растений дикого типа. Растения остальных семей характеризуются различными нарушениями морфологии

корней и корневых волосков, не связанными с мутациями в гене *LykX* (семья 2543 – повышенное количество корневых волосков при сниженном проценте скручиваний на фоне дефектов в морфологии корневых волосков; семья 1645 – повышение общего количества корневых волосков на фоне уменьшенной длины корней; семья 539 – увеличение и общего количества корневых волосков, и процента скручиваний при ярко выраженных дефектах надземной части). Таким образом, мутации в гене *LykX* не приводят к нарушению начальных этапов установления клубенькового симбиоза, а отличия некоторых мутантов от растений дикого типа обусловлены присутствием в их геноме дополнительных мутаций, как и в случае с дефектами надземной части.

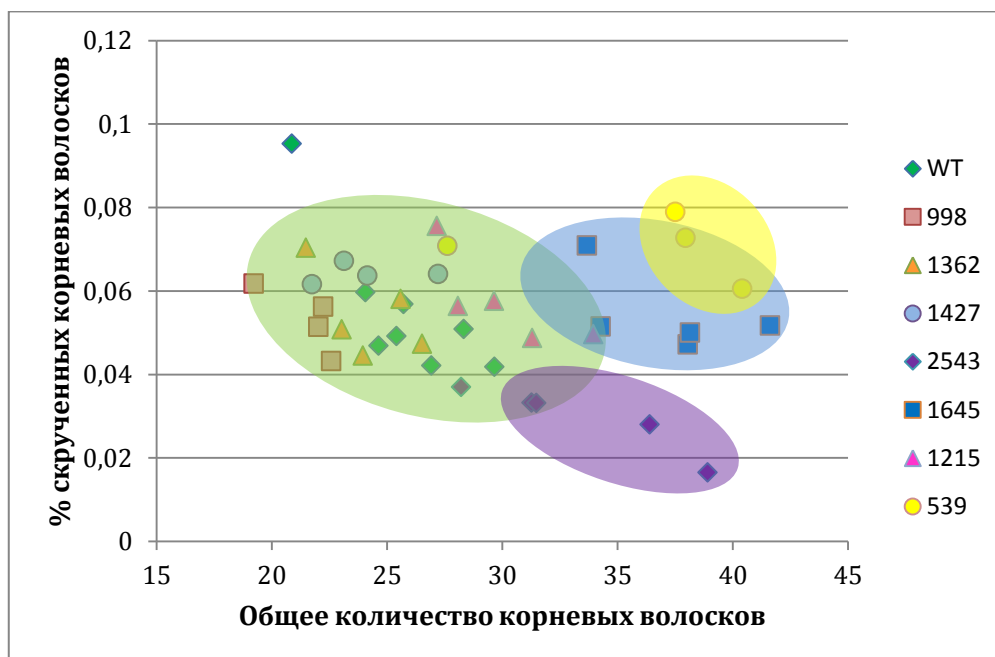


Рисунок 5. Соотношение общего количества корневых волосков к проценту (%) скрученных корневых волосков у мутантов по гену *LykX*.

Для каждой мутантной семьи была определена частота инфекционных событий – ранних этапов инфекции, начиная от образования микроколонии в изгибе скрученного корневого волоска и заканчивая проникновением инфекционной нити в клетки коры корня. Все мутанты, за исключением представителей семьи 2543 (с нарушением морфологии корневых волосков), продемонстрировали достоверно повышенное число инфекционных событий по сравнению с растениями дикого типа (рис. 6). При этом инфекционные нити имели многочисленные аномалии (утолщения, вздутия, «мешковидные структуры»), что свидетельствует о нарушении нормального протекания процесса инфекции (рис. 7). В тех редких случаях, когда инфекционная нить развивалась нормально, формировались зрелые функциональные клубеньки.

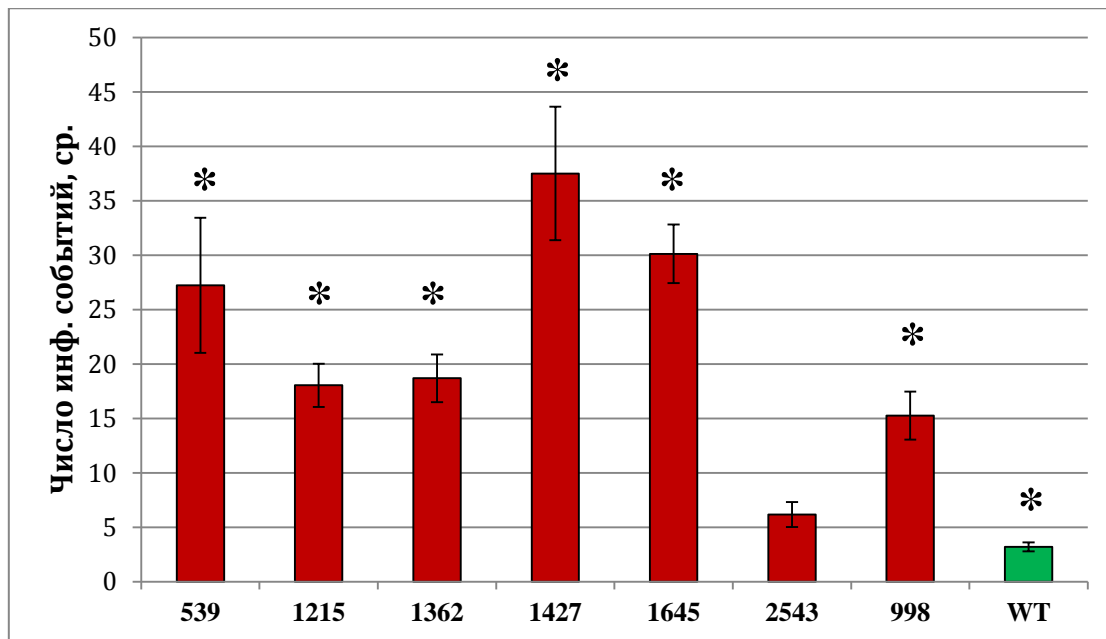


Рисунок 6. Количество инфекционных событий у мутантов по гену *LykX* по сравнению с диким типом (WT) на сроке 4 недели после инокуляции штаммом RCAM1026.

Интервалы обозначают стандартное отклонение. Различия достоверны между диким типом и всеми мутантами, за исключением семьи 2543 (ранговый ANOVA, $P < 0,05$). В качестве дикого типа использовалась линия Caméog.

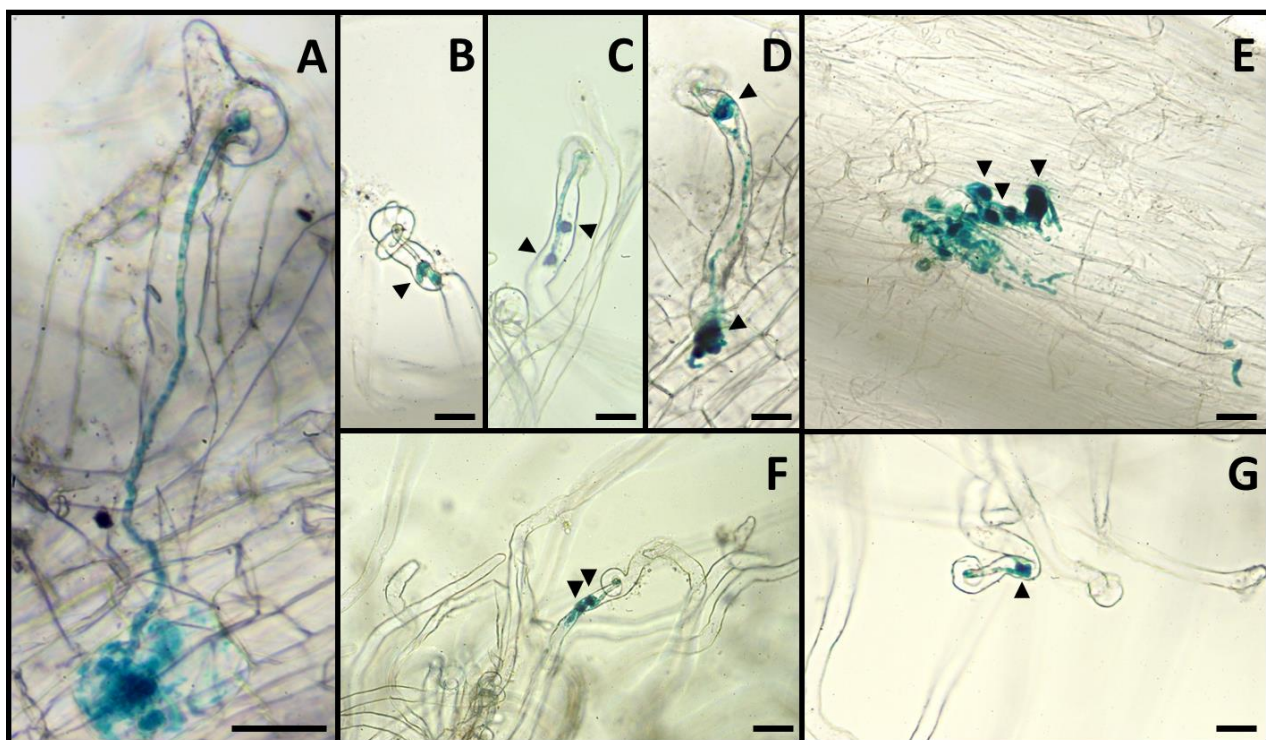


Рисунок 7. Аномалии развития инфекционных нитей (ИИ) у мутантов по гену *LykX*.

А – ИИ дикого типа, В-Г – ИИ мутантов. Чёрными стрелками отмечены утолщения и «мешковидные структуры» на инфекционных нитях. Масштабная линейка: А,В,С,Д,Ф,Г – 0,1 мм, Е – 0,05мм.

Полученные данные позволяют заключить, что мутация в гене *LykX* не влияет на самые начальные этапы клубенькового симбиоза. В то же время характерные особенности фенотипа, общие для большинства мутантов,

проявляются лишь на более поздних стадиях. Блок развития инфекции у «афганских» разновидностей гороха при взаимодействии с несовместимыми штаммами ризобий также наблюдается на стадии развития инфекционной нити; таким образом, фенотип мутантов по гену *LykX* соответствует гипотезе о тождественности *LykX* и *Sym2*.

Тест на аллелизм индуцированной мутации в гене *LykX* и природных аллелей гена *Sym2*. Были проведены скрещивания мутантов *lykX* и растений с узкой и широкой специфичностью симбиоза («афганских» – NGB1238, «таджикских» – K-3821 и «европейских» – Caméor). Клубенькообразование гибридов и исходных родительских линий оценили на сроке 4 недели после инокуляции штаммом RCAM1026 (*nodX*⁻). Гибриды F₁ (1645×Caméor) продемонстрировали нормальное клубенькообразование, гибриды F₁ (1645×K-3821) и F₁ (1645×NGB2150) образовали значительно сниженное число клубеньков (рис. 8). Таким образом, полученные данные подтверждают выдвинутую гипотезу о тождественности *Sym2* и *LykX*.

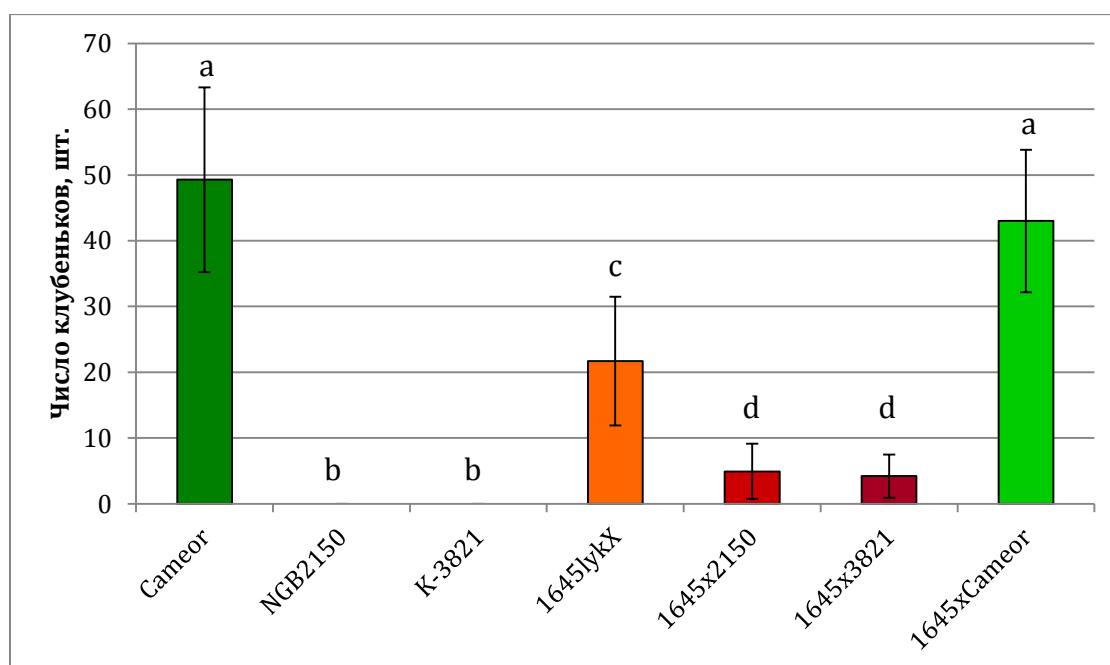


Рисунок 8. Клубенькообразование гибридов F₁ от скрещивания растений семьи 1645 (*lykX*) с растениями линий гороха с различной специфичностью симбиоза

Интервалы показывают стандартное отклонение. Одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий (ранговый ANOVA, P<0,05).

Оценка полиморфизма первого экзона гена *LykX*. Полиморфизм первого экзона гена *LykX* был оценен на выборке линий гороха с разным географическим происхождением из коллекции ВИР. Были обнаружены 16 несинонимичных полиморфных сайтов, на основе которых вся выборка делится на 13 групп, причём 7 из них представлены единичными последовательностями с уникальными заменами. Две линии с идентичными «афганскими» аллелями *LykX* выделились в собственную гаплогруппу, а две линии с аллелями, напоминающими «таджикские» – в уникальные гаплогруппы из-за наличия дополнительных замен.

Заключение

Обнаружение и описание нового гена рецепторной киназы *LykX* стало важнейшим этапом восьмидесятилетней истории исследования «афганского» фенотипа: теперь можно с уверенностью утверждать, что «неуловимый» ген *Sym2*, определяющий узкую специфичность клубенькового симбиоза, наконец, идентифицирован. С учётом данных, полученных Li с коллегами (Li *et al.*, 2011), в настоящей работе предложена модель, предполагающая наличие у гороха двух рецепторов, распознающих структуру Nod-фактора. Рецепторные киназы *Sym37* и *Sym2* взаимодействуют с противоположными концами молекулы, проявляя специфичность к соответствующему декору: остатку жирной кислоты (*Sym37*) либо ацетильной группе (*Sym2*). За счёт этого осуществляется более строгий отбор симбиотических партнёров. Вероятно, столь сложная система переменных рецепторов возникла в ходе эволюции гороха в качестве ответа на высокие темпы изменчивости геномов клубеньковых бактерий.

Выводы

1. Аллели гена *Sym2*, определяющие узкую специфичность взаимодействия гороха посевного с ризобиями, обнаружены у ряда линий, происходящих из Таджикистана, Узбекистана, Ирана, Туркменистана и Афганистана.
2. Ген *LykX* является новым геном LysM-RLK гороха, который расположен в непосредственной близости от ранее выявленных симбиотических генов *Sym37* и *K1* в регионе *Sym2*.
3. Ген *LykX* экспрессируется в корнях и клубеньках на разных сроках развития (2, 4, 6 недель после инокуляции).
4. Линии гороха, проявляющие признак узкой специфичности симбиоза, имеют один из двух редких аллельных вариантов *LykX* – «афганский» или «таджикский» – с несинонимичными заменами относительно распространённой «европейской» аллели.
5. Мутации в гене *LykX* приводят к нарушению клубенькового симбиоза на стадии проникновения бактерий в корневую волосок и не затрагивают более ранние и поздние стадии.
6. На основании теста на аллелизм природных аллелей *Sym2*, определяющих узкую специфичность симбиоза, и индуцированной мутации в гене *LykX*, установлена тождественность генов *LykX* и *Sym2*.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Сулима А.С., Жуков В.А. TILLING—современная технология «обратной» генетики растений // **Сельскохозяйственная биология**. – 2015. – Т. 50. – №. 3. – С. 288-297. doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.288rus
2. **Sulima, A. S.**, Zhukov, V. A., Afonin, A. A., Zhernakov, A. I., Tikhonovich, I. A., & Lutova, L. A.. Selection signatures in the first exon of paralogous receptor kinase genes from the *Sym2* region of the *Pisum sativum* L. genome // **Frontiers in plant science**. – 2017. – V. 8. – P. 1957. doi: 10.3389/fpls.2017.01957
3. **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. – P. e8070. <https://doi.org/10.7717/peerj.8070>

Участие в международных конференциях

1. **Sulima A.**, Zhukov V., Borisov A., Tikhonovich I. Search for the genetic determinant of specificity in the interaction of "Afghan" pea cultivars with nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Book of Abstracts of 10th European Nitrogen Fixation Congress (ENFC) (September 2-5, 2012, Munich, Germany). PP 8-14.
2. **Sulima A.S.**, Zhukov V.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Genetic control of specificity of symbiosis between "Afghan" varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and nodule bacteria. Book of Abstracts of the 3rd International Conference "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology" PlantGen 2015 (June 17-21, 2015, Novosibirsk, Russia).P 55.
3. **Sulima A.**, Zhukov V., Tikhonovich I.A. Identification of Pea (*Pisum sativum* L.) gene *Sym2* which determines the increased selectivity for bacterial symbionts. Book of Abstracts of 19th International Congress on Nitrogen Fixation (ICNF) (October 4-9, 2015, Pacific Grove, CA, USA). P 128.
4. **A. Sulima**, V. Zhukov, A. Borisov, I. Tikhonovich. The pea (*Pisum sativum* L.) receptor-like kinase gene *Lykx*, the most prominent candidate for *Sym2*, is required for successful penetration of rhizobia into the root hair. Book of Abstracts of 12th European Nitrogen Fixation Conference (August 25-28, 2016, Budapest, Hungary). P. 175.
5. **Сулима А.С.**, Жуков В.А., Афонин А.М., Тихонович И.А. Генетические основы конструирования высокоспецифичных симбиотических систем гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (13-17 июня, 2018, Уфа, Россия). С. 232.