

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»
(ВНИИ СХМ)

На правах рукописи

Сулима Антон Сергеевич

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

Специальность: 03.02.07 – генетика

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Жуков Владимир Александрович

Санкт-Петербург
2020

Оглавление

Список основных используемых сокращений	4
Введение	5
Глава 1. Особенности мутуалистических симбиозов растений и микроорганизмов (обзор литературы).....	9
1.1. Явление симбиоза.....	9
1.1.1. «Экономика» симбиоза.....	11
1.2. Растительно-микробные симбиотические системы как пример высокоинтегрированного эндосимбиоза	13
1.3. Контроль симбиоза со стороны участников	16
1.3.1. Клубеньковый симбиоз бобовых растений	19
1.4. Горох посевной (<i>Pisum sativum</i> L.) как модельный объект для изучения генетики клубенькового симбиоза.	40
1.4.1. «Неуловимый» ген <i>Sym2</i>	44
Глава 2. Материалы и методы	47
2.1. Растительный материал	47
2.1.1. Условия вегетации растений.....	48
2.2. Бактериальный материал	50
2.2.1. Условия культивации бактерий	51
2.3. Молекулярно-биологические методы	53
2.3.1. Выделение ДНК из растительного материала.....	53
2.3.2. Выделение РНК из растительного материала	54
2.3.3. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)	54
2.3.4. Рестрикционный анализ	55
2.3.5. Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК.....	55
2.3.6. Синтез кДНК и проведение RACE ПЦР	56
2.3.7. Проведение ПЦР в реальном времени (rtПЦР).....	56
2.3.8. Анализ ВАС-библиотеки гороха посевного	57
2.3.9. Выделение ВАС-плазмиды из культуры бактерий.....	57
2.3.10. Поиск мутантов по гену <i>LykX</i> с помощью метода TILLING	57
2.4. Микроскопия.....	58

2.5. Компьютерный анализ данных	59
Глава 3. Результаты	61
3.1. Отбор новых генетических линий гороха, проявляющих признак «афганского» фенотипа	61
3.1.1. Тест на аллелизм детерминант симбиотического фенотипа у новых и ранее известных «афганских» линий.	62
3.2. Обнаружение нового гена <i>LysM-RLK</i> гороха.	64
3.3. Скрининг ВАС-библиотеки гороха посевного.....	67
3.4. Описание нового гена гороха <i>LykX</i> , кодирующего <i>LysM-RLK</i>	70
3.4.1. Вариабельность первого экзона гена <i>LykX</i> коррелирует с проявлением специфичности симбиоза.....	75
3.4.2. Исследование участка между генами <i>K1</i> и <i>LykX</i> у линий с разной специфичностью симбиоза.	78
3.5. Поиск мутантов по гену <i>LykX</i> с применением метода TILLING.....	80
3.6. Описание симбиотического фенотипа мутантов <i>lykX</i>	84
3.7. Тест на аллелизм индуцированной мутации в гене <i>LykX</i> и природных аллелей гена <i>Sym2</i>	90
3.8. Оценка полиморфизма первого экзона гена <i>LykX</i>	92
Глава 4. Обсуждение	95
Заключение	99
Выводы	103
Список литературы	104
Приложение	121

Список основных используемых сокращений

ANOVA – analysis of variance – дисперсионный анализ;

BAC – bacterial artificial chromosome – искусственная бактериальная хромосома;

CO – chitooligosaccharide – хито-олигосахарид;

CSP – common symbiotic pathway – общий симбиотический (сигнальный) путь;

EMS – ethyl methanesulfonate – этилметансульфонат;

LCO – lipochitooligosaccharide – липо-хито-олигосахарид;

LysM-RLK – LysM-containing receptor-like kinase – рецептор-подобная киназа с LysM-доменами;

RACE – rapid amplification of cDNA ends – быстрая амплификация концов кДНК;

Rlv – *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*;

SD – standard deviation – стандартное отклонение;

TILLING – targeting induced local lesions in genomes – поиск индуцированных локальных нарушений в геномах;

АМ – арбускулярная микориза;

гДНК – геномная ДНК;

кДНК – кодирующая ДНК;

КОЕ – колониеобразующие единицы;

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Введение

Будучи прикреплёнными организмами, растения вынуждены приспосабливаться к изменениям условий в месте произрастания. Существенное адаптивное преимущество растениям даёт кооперация (симбиоз) с микроорганизмами, обитающими в окружающей среде, в особенности в почве [Тихонович, Проворов, 2003]. Благодаря обилию рецепторов на поверхности клеток, в частности, уникальных рецепторных киназ из семейства LysM-RLK, растения имеют возможность воспринимать широкий спектр сигналов, поступающих от почвенной микрофлоры, отличать полезных симбионтов от патогенов и тонко регулировать свои биологические ответы, тем самым обеспечивая себе выживание [Shiu, Bleecker, 2001].

Бобовые растения (сем. Fabaceae), в числе которых множество ценных для сельского хозяйства видов, способны устанавливать широкий спектр мутуалистических симбиозов с представителями почвенного микробиома. Помимо арбускулярной микоризы и ассоциаций с бактериями ризосферы, для них характерен уникальный симбиоз с клубеньковыми бактериями из группы ризобий, которые снабжают растение азотом, фиксированным из атмосферы [Тихонович, Проворов, 2009].

Горох посевной (*Pisum sativum* L.), представитель семейства Fabaceae, является поистине уникальным модельным объектом, сочетающим в себе долгую историю изучения и большое практическое значение. Будучи одним из первых окультуренных растений в истории человечества, он до сих пор не утратил важности в качестве ключевого компонента мировой сельскохозяйственной практики [Borisov и др., 2004; Костерин, 2015a]. К сожалению, в настоящее время горох практически не затронут новейшими методами молекулярной биологии, что ставит его в один ряд с региональными «культурами-сиротами» (англ. orphan crops) [Kulaeva и др., 2017]. Так, несмотря на значительный прогресс в области выявления

симбиотических генов и наличие обширных коллекций мутантов, дефектных по различным стадиям симбиоза с ризобиями и/или грибами арбускулярной микоризы, объём знаний о протекании симбиотических процессов у гороха катастрофически уступает сведениям, накопленным для модельных бобовых растений. Геном гороха ввиду его большого размера и насыщенности протяжёнными повторяющимися последовательностями до сих пор не секвенирован в должном качестве, а имеющиеся на данный момент транскриптомные сборки в большинстве своём узкоспециализированы (касаются отдельных органов на определённых стадиях развития и в определённых условиях) [Alves-Carvalho и др., 2015; Franssen и др., 2011; Sudheesh и др., 2015; Zhukov и др., 2015]. При этом горох обладает рядом уникальных особенностей, которые попросту невозможно изучить на удобных моделях наподобие люцерны слабоусечённой (*Medicago truncatula* Gaertn.). Одной из таких особенностей является феномен «афганского» фенотипа: способность некоторых форм гороха, происходящих из Афганистана, вступать в симбиоз лишь с отдельными редкими штаммами ризобий, которые отличаются дополнительными модификациями симбиотической сигнальной молекулы [Davis, Evans, Johnston, 1988; Lie, 1978; Lie, 1984].

«Афганский» фенотип был впервые обнаружен у растений из Передней Азии, традиционно считающихся «примитивными» сортами, близкими к дикому предку культурного гороха [Говоров, 1928]. Учитывая этот факт, изучение данного явления может пролить свет на эволюцию гороха и его симбиотических отношений с ризобиями. С другой стороны, признак «афганской» специфичности может быть и поздним эволюционным приобретением, вызванным уникальными особенностями среды обитания. Как бы то ни было, изучение этого признака и его генетических основ представляется интересной и важной научной задачей, способной обогатить наши знания о фундаментальных принципах взаимодействия растений и бактерий.

История открытия «афганского» фенотипа насчитывает уже более 80-ти лет, но все попытки установить детерминант этого признака до сих пор не увенчались успехом, хотя определённый прогресс в этой области всё же был достигнут. Известно, что за проявление подобного фенотипа у гороха отвечает единственный ген *Sym2*, для которого установлена точка локализации в геноме [Kozik и др., 1995; Kozik, 1996; Lie, 1984]. К сожалению, данный регион содержит несколько весьма сходных по последовательности генов рецепторных киназ, возникших, очевидно, в процессе древней мультипликации предкового гена, и в отсутствие достаточных знаний о геноме работа с ними оказывается весьма затруднительной. Существенным препятствием на пути исследователей также стало отсутствие аналога «афганской» специфичности у других модельных бобовых растений.

Ранее обнаруженные у гороха гены-кандидаты на роль *Sym2* – *Sym37* и *K1*, кодирующие рецепторные киназы из семейства LysM-RLK, – не продемонстрировали связи с проявлением «афганского» фенотипа [Zhukov и др., 2008]. Однако в процессе работы с ними была выявлена последовательность, потенциально соответствующая ранее неизвестному гену LysM-RLK гороха. Изучение данного гена и проверка гипотезы о его тождественности гену *Sym2* является темой данного диссертационного исследования.

ЦЕЛЮ диссертационной работы является молекулярно-биологическая и генетическая характеристика ранее неизвестного гена гороха посевного *LycX*, 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 ранее неизвестного гена *LukX*, найденного в районе локализации *Sym2*.
4. Анализ аллельных вариантов гена *LukX* у серии линий, контрастных по проявлению признака образования клубеньков с *nodX⁻* штаммами ризобий (проявляющих широкую и узкую специфичность симбиоза).
5. Поиск мутантных линий, несущих замены в последовательности гена *LukX*, при помощи метода TILLING, и характеристика их симбиотического фенотипа.
6. Тест на аллелизм выявленных мутаций в гене *LukX* и природных аллелей *Sym2*, определяющих узкую специфичность симбиоза.

Глава 1. Особенности мутуалистических симбиозов растений и микроорганизмов (обзор литературы)

1.1. Явление симбиоза

Способность к адаптивно значимым взаимодействиям является неотъемлемым свойством всех живых организмов. Она обеспечивает выживание отдельных видов и формирование различных по сложности биологических сообществ. В результате подобных взаимодействий между организмами зачастую возникают тесные и стабильные ассоциации, получившие название симбиозов.

Явление симбиоза впервые было обнаружено швейцарским учёным Симоном Швенденером (Simon Schwendener) в 1877 г при изучении лишайников, которые представляют собой комплексные организмы, состоящие из водоросли и гриба [Яценко-Степанова, Немцева, Игнатенко, 2014]. Однако сам термин «симбиоз» ввёл в употребление в 1879 г немецкий ботаник и микробиолог Генрих Антон де Бари, который определил его как «совместную жизнь разноимённых (т.е. относящихся к разным видам) организмов» [Проворов, 2014]. Столь широкая трактовка термину была дана не случайно: таким образом де Бари постарался заострить внимание на том, что отношения между сожителями организмами могут быть очень разными по характеру, от взаимовыгодных до антагонистических. Де Бари подразделял симбиоз на три основные категории: мутуализм (симбиоз, выгодный для всех участников), комменсализм (симбиоз, выгодный для одних участников и нейтральный для других) и антагонизм, или паразитизм (симбиоз, выгодный для одних участников и невыгодный для других). При этом уже в его работах отмечается, что провести чёткую границу между этими категориями зачастую не удаётся.

Возможно, именно подобная неопределённость привела к тому, что в последующие столетия с лишним лет понятие симбиоза неоднократно пересматривалось, то сужаясь до одного лишь мутуализма, то, напротив,

расширяясь и включая в себя, в частности, кратковременные отношения (хищничество) [Martin, 2014; Martin, Schwab, 2012]. В настоящей работе под симбиозом будет пониматься совокупность явлений, предложенная де Бари.

Значение симбиоза в живой природе сложно переоценить. Это стало очевидно ещё в начале XX века, когда русские исследователи Андрей Сергеевич Фаминцын и Константин Сергеевич Мережковский заговорили о важности симбиотических отношений для прогрессивной эволюции органического мира, тем самым впервые выдвинув гипотезу о симбиогенезе как фундаментальном эволюционном механизме [Мережковский, 1909; Фаминцын, 1907]. Их идеи получили должное развитие лишь спустя почти 60 лет благодаря работам Линн Маргулис (Саган), которая представила убедительные цитологические и биохимические доказательства происхождения эукариотических пластид и митохондрий от древних симбиотических внутриклеточных бактерий (цианобактерий и протеобактерий, соответственно) [McFadden, 1999; Sagan, 1967]. В настоящее время известно, что в истории жизни на Земле подобные эндосимбиозы возникали неоднократно: так, пластиды, впервые появившиеся у общего предка глаукофитов, красных и зелёных водорослей, впоследствии приобретались и другими группами эукариот посредством вторичного, третичного и даже четвертичного эндосимбиоза [Bhattacharya, Yoon, Hackett, 2004].

Не менее важным, чем возникновение эукариотической клетки, эволюционным событием стал выход растений на сушу, фактически положивший начало освоения суши многоклеточными организмами. Показано, что самые ранние этапы приспособления растений к новым условиям обитания во многом зависели от их симбиоза с грибами арбускулярной микоризы, которую и в настоящее время формируют около 90% наземных растений [Parniske, 2008; Remy и др., 1994]. Микоризу также принято считать эволюционной предшественницей других, более

специфичных симбиозов с микроорганизмами, зачастую необходимых растению для выживания (см. раздел 1.3.1).

Широта распространения симбиозов обусловлена тем, что подавляющее большинство организмов не способно к длительному самостоятельному существованию в абиотической среде, и это вынуждает их взаимодействовать друг с другом [Тихонович, Проворов, 2009]. При этом наиболее предпочтительной формой взаимодействия оказывается мутуализм, так как он приносит выгоду всем партнёрам и тем самым нивелирует отрицательный эффект межвидовой и внутривидовой конкуренции. Неудивительно, что даже автотрофные цианобактерии, обладающие высокой степенью автономности, проявляют склонность к формированию симбиозов с весьма широким кругом хозяев [Douglas, 1994; Hirsch, 2004; Тихонович, Проворов, 2009]. Очевидно, что стратегия симбиотических адаптаций является не менее, а возможно, и более распространённой в живой природе, чем стратегия индивидуальных (автобиотических) адаптаций, и требует подробного и всестороннего изучения [Проворов, Мыльников, 2007].

1.1.1. «Экономика» симбиоза

Выше уже говорилось о том, что провести границу между разными типами симбиоза бывает непросто, из-за чего даже может возникать путаница в определениях. Американский альголог Ральф Льюин (Ralph Lewin) настаивал на применении количественного подхода для разграничения мутуалистических и антагонистических симбиозов; в частности, он предлагал сравнивать изменение численности популяций А (без симбионтов) и А_б (в ассоциации с симбионтом). При этом Льюин обращал внимание на то, что симбиотические системы следует рассматривать в динамике, поскольку в зависимости от условий равновесие в них может сдвигаться, в результате чего одна и та же ассоциация будет становиться либо муталистической, либо паразитической [Lewin, 1982]. Действительно, подобные сдвиги можно наблюдать даже в санитарном симбиозе у рыб, когда

чистильщики вместо паразитов начинают преимущественно поедать слизь и чешуйки клиента [Cheney, Côté, 2005], однако в столь неглубоко интегрированной системе это не приводит к серьёзному ущербу. В случае более тесного эндосимбиоза, когда один симбионт поселяется в тканях и клетках другого, сдвиг в сторону паразитизма способен нанести организму-хозяину существенный вред, особенно учитывая тот факт, что многие подобные симбиозы являются «экологически облигатными», т.е. жизненно важными в конкретных условиях обитания. Сам по себе мутуализм, согласно эволюционной теории, правильнее называть «взаимной эксплуатацией», при которой каждый партнёр стремится максимизировать собственную выгоду и минимизировать затраты [Herre и др., 1999]. Нередко в изначально мутуалистических эндосимбиозах возникают так называемые «жулики» (англ. cheaters) или «безбилетники» (англ. free-riders), которые «обманывают» партнёра, маскируясь под эффективных симбионтов, или сопровождая тех при проникновении в ткани или клетки хозяина, но в действительности выступают в роли комменсалов или даже паразитов [Ferriere и др., 2002; Porter, Simms, 2014; Sachs, Simms, 2006]; при этом с увеличением числа симбиотических партнёров в одной ассоциации вероятность возникновения «жуликов» также повышается [Kiers, Heijden Van Der, 2006]. По этой причине в эндосимбиотических ассоциациях наблюдается тенденция к ужесточению контроля симбиоза на всех стадиях взаимодействия и повышению специфичности при выборе партнёра с обеих сторон.

Эндосимбиотические ассоциации распространены повсеместно; в роли хозяев для микроскопических эндосимбионтов способны выступать представители всех эукариотических царств. Одними из наиболее изученных эндосимбиотических систем, имеющих важность как для биосферы в целом, так и для сельскохозяйственной деятельности человека, являются ассоциации растений с микроорганизмами.

1.2. Растительно-микробные симбиотические системы как пример высокоинтегрированного эндосимбиоза

Растения являются прикреплёнными неподвижными организмами, из-за чего они вынуждены приспосабливаться к условиям своего места произрастания. В норме растения одновременно испытывают множество разносторонних воздействий от различных абиотических и биотических факторов среды, поэтому в процессе эволюции у них развились сложные сигнальные системы для распознавания этих факторов и адекватного ответа на них. Микроорганизмы, постоянно присутствующие в среде, являются одним из важнейших факторов, влияющих на жизнь растения. Многие микроорганизмы, взаимодействующие с растениями, проявляют свойства патогенов, угнетая рост и снижая плодovitость. Однако существует немало полезных микроорганизмов, вступающих с растениями в мутуалистический симбиоз [Hirsch, 2004]. Бесспорным преимуществом растений является их способность к фотосинтезу (обусловленная органеллами симбиотического происхождения), поскольку продуцируемые ими соединения углерода служат существенным стимулом к кооперации для различных микробов, которые взамен обеспечивают партнёра недостающими питательными веществами, защищают от патогенов и фитофагов. Иногда такие симбиозы перерастают в очень тесные и долговременные ассоциации, при которых партнёры приобретают новые, не свойственные им ранее качества, помогающие в выживании и обеспечивающие преимущества в конкурентной борьбе. Подобные ассоциации требуют привлечения многостадийных программ развития, протекающих под совместным контролем симбионтов благодаря перекрёстной регуляции их генов.

История развития сухопутных растений с самого начала была неразрывно связана с грибами арбускулярной микоризы (АМ) из отдела *Glomeromycota* [Malloch, 1980]. В процессе арбускулярно-микоризного симбиоза грибные гифы проникают в клетки корня, образуя в них сложные древовидные структуры, – арбускулы, – которые служат для обмена питательными

веществами между симбионтами [Gutjahr, Parniske, 2013; Harrison, 1997]. Для АМ-грибов симбиоз является облигатным: вне растения они существуют лишь в форме покоящихся спор. Растениям, главным образом использующим АМ как источник фосфатов, симбиоз не требуется для успешного прохождения онтогенеза, однако он необходим для выживания в типичных для данного растения условиях обитания (пример «экологической облигатности») [Smith, Read, 2010]. Наиболее важна АМ для деревянистых и кустарниковых форм, а также для растений со слабо развитыми корневыми волосками и низкой поглотительной способностью корней [Gianinazzi-Pearson, 1996].

Анализ структуры 18S рРНК показал, что Glomeromycota представляют собой монофилетичную группу, произошедшую от общего предка около 450 млн. лет назад, что совпадает со временем выхода первых растений на сушу [Parniske, 2008; Remy и др., 1994]. Ископаемые находки из Шотландии, датируемые ранним девоном, свидетельствуют о том, что уже в то время строение микоризных грибов практически не отличалось от современного [Dotzler, Krings, Taylor, 2006; Remy и др., 1994]. Низкая специфичность, проявляемая гломеромикотами в отношении растений-хозяев, сделала арбускулярную микоризу универсальным источником преадаптаций для развития множества других типов растительно-микробного симбиоза, таких как клубеньковый симбиоз между бобовыми растениями (сем. Fabaceae) и азотфиксирующими бактериями (ризобиями) [Kistner, Parniske, 2002]. В настоящее время показано, что часть генов, задействованных в установлении симбиоза с грибами АМ, у бобовых дополнительно вовлечена в регуляцию клубенькового симбиоза, формируя так называемый общий симбиотический сигнальный путь (англ. Common Symbiotic Pathway или Common Symbiotic Signaling Pathway) [Gobbato, 2015; Limpens, Bisseling, 2003; Parniske, 2008]. Сходство процессов образования азотфиксирующих клубеньков и АМ выражается ещё и в том, что в обоих случаях первичной сигнальной молекулой выступает липо-хито-олигосахарид, выделяемый

микросимбионтом и воспринимаемый рецепторами растения (Мус-фактор в случае АМ и Nod-фактор в случае клубенькового симбиоза) [Geurts, Bisseling, 2002; Maillet и др., 2011; Oldroyd, 2001] (рис.1). Сигналы хитиновой природы распространены у грибов, но, как правило, не характерны для бактерий. Интересно, что для грибов АМ показано наличие собственных эндосимбионтов – грамположительных и грамотрицательных бактерий, колонизирующих грибные гифы [Artursson, Finlay, Jansson, 2006; Barea и др., 2005; Bianciotto и др., 2003; Bianciotto и др., 2004; Bonfante, Anca, 2009]. Таким образом, в прошлом грибы могли стать непосредственными поставщиками полезных бактерий в ткани корня растения-хозяина, а бактерии имели возможность получить необходимые для симбиоза с растениями гены от своих грибных партнёров путём горизонтального переноса [Проворов, Штарк, Долгих, 2016].

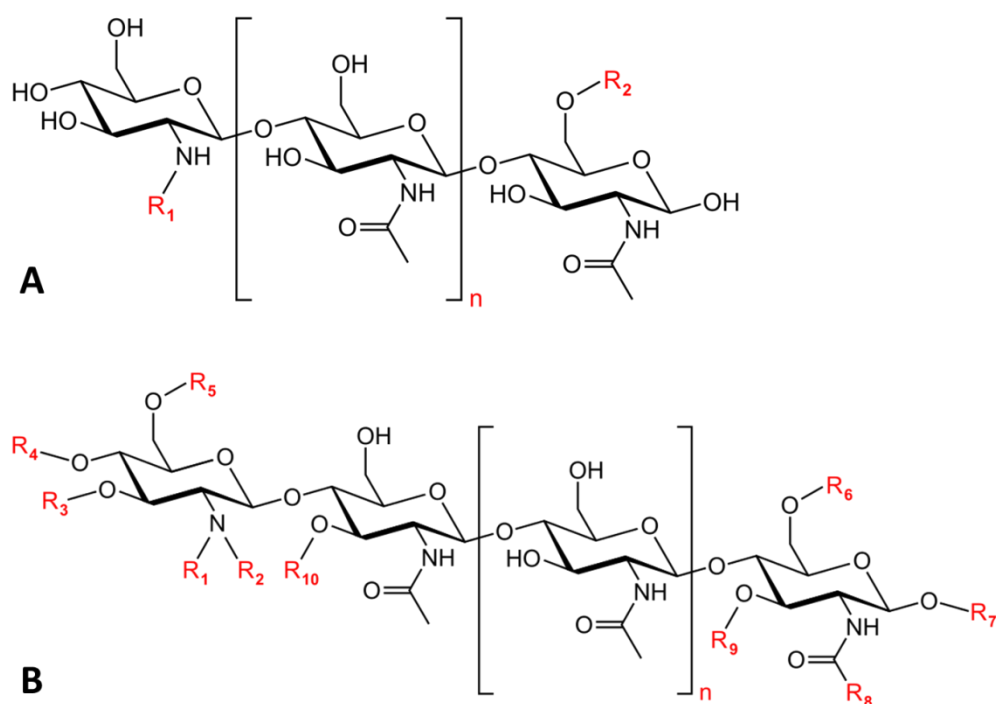


Рисунок 1. Базовая структура молекулы Мус-фактора (А) и Nod-фактора (В). Буквами R обозначены положения возможных заместителей.

В последнее время повышенный интерес исследователей во всём мире вызывают так называемые эндофитные микроорганизмы, или эндофиты,

которые проникают в ткани растения и существуют там длительное время, но не наносят хозяину видимого вреда (как патогены) и не формируют специализированных структур (как азотфиксирующие бактерии) [Comrant, Clément, Sessitsch, 2010; Partida-Martinez, Heil, 2011]. Показано, что многие эндифиты способны приносить растению определенную пользу, выделяя рост-стимулирующие и защитные молекулы, а также выступая в роли транспортёров питательных веществ из окружающей среды в клетки растения [Santoyo и др., 2016; White и др., 2018]. В отличие от симбиотических и некоторых патогенных бактерий, они, по-видимому, не имеют строгой специфичности к хозяину, но вступают с растениями в более стабильные ассоциации, чем свободноживущие ассоциативные микробы ризо– и филосферы [Partida-Martinez, Heil, 2011; Santoyo и др., 2016]. Генетические механизмы контроля проникновения, присутствия и передачи эндифитов ещё только предстоит расшифровать.

1.3. Контроль симбиоза со стороны участников

Длительная совместная эволюция привела к тому, что у растений возникли эффективные механизмы контроля присутствия микроорганизмов в клетках и тканях. Так, процесс развития древнейшего растительно-микробного симбиоза, арбускулярной микоризы, начинается с «молекулярного диалога» между симбионтами, целью которого является взаимное распознавание. Растение секретирует стриголактоны, – гормоны каротиноидной природы, – которые индуцируют прорастание грибных спор и ветвление гиф [Akiyama, Matsuzaki, Hayashi, 2005; Besserer и др., 2006]. В ответ гриб выделяет собственные сигнальные молекулы хито-олиго– и липо-хито-олигосахаридной природы, получившие общее название Мус-факторов (от англ. mycorrhization – образование микоризы) [Maillet и др., 2011] (рис.1). Мус-фактор воспринимается рецепторами растения из семейства рецептор-подобных киназ с LysM-доменами (LysM-RLK; от англ. LysM-containing receptor-like kinase). На сегодняшний день у ряда растений (томат, рис,

Parasponia, люцерна, лядвенец) выявлено несколько кандидатов на роль данных рецепторов, однако единой и общепризнанной схемы восприятия Мус-фактора пока что не существует [Buendia и др., 2016; Camp Den и др., 2011; Carotenuto и др., 2017; Miyata и др., 2014; Zhang и др., 2015]. Известно, что LysM-RLK принимают участие в рецепции бактериальных сигналов при установлении бобово-ризобияльного симбиоза (см. раздел 1.3.1), отвечая за специфичность симбиотического взаимодействия [Limpens и др., 2003]. Скорее всего, подобную роль они играют и при АМ симбиозе. Ещё одним фактором контроля специфичности АМ могут служить физико-химические свойства клеточной стенки растения, важные для образования аппрессориев – дифференцированной формы грибных гиф, предназначенной для прикрепления к поверхности корня. Показано, что в отсутствие корневых экссудатов АМ-грибы *Gigaspora gigantea* и *Gigaspora margarita* образуют аппрессории на изолированной клеточной стенке моркови дикой (*Daucus carota*), своего обычного растения-хозяина, но не свёклы (*Beta vulgaris*), не являющейся хозяином для данных грибов [Nagahashi, Douds, 1997]. Важную роль при индукции формирования аппрессориев также играют мономеры кутина, основного компонента растительных кутикул, причём это характерно не только для микоризных, но и для патогенных грибов и оомицетов [Wang и др., 2012b]; судя по всему, реакция на кутин относится к наиболее древним механизмам растительно-грибных взаимодействий [Gutjahr, Parniske, 2013].

Вслед за восприятием Мус-фактора и прикреплением гиф к клеточной стенке активируется сигнальный каскад Общего симбиотического пути, который у бобовых растений также вовлечён в развитие симбиоза бобовых растений с азотфиксирующими бактериями [Limpens, Bisseling, 2003]. Подробно этот путь будет рассмотрен в разделе, посвящённом клубеньковому симбиозу.

Микоризу принято считать классическим примером мутуалистического симбиоза, в котором растение строго контролирует поведение микросимбионта, регулируя рост грибных гиф в клетках эпидермиса,

переход к ветвлению, образование арбускул и их деградацию в соответствии со своим физиологическим состоянием (например, потребностью в фосфоре) и стадией развития [Gianinazzi-Pearson, 1996; Parniske, 2008; Smith, Smith, 2015]. Однако в литературе можно встретить сообщения о нейтральном или даже негативном эффекте микоризы на рост растения, при котором затраты растения на симбиоз не покрывают полученную выгоду [Bougher, Grove, Malajczuk, 1990; Jones, Smith, 2004; Koide, 1985; Modjo, Hendrix, 1986]. Как правило, такие отклонения носят случайный или временный характер; они связаны с особенностями развития растения и/или условиями обитания. К примеру, показано, что при раннем образовании микоризы на стадии проростка выгода от симбиоза зачастую не превышает затраты, поскольку основным поставщиком питательных веществ для растения в этот период всё ещё является запас из семени [Bethlenfalvay, Brown, Rasovsky, 1982; Koide, 1985]. В подобном случае углерод, потраченный на развитие гриба, выгоднее было бы пустить на повышение жизнеспособности самого растения, однако в долгосрочной перспективе этот временный негативный эффект, как правило, нивелируется.

Ещё одним фактором, сдвигающим муталистическое равновесие АМ в сторону паразитизма, могут быть условия среды, в частности, питательный состав почвы, что особенно важно для сельскохозяйственных растений. Внесение минеральных удобрений, в особенности фосфатов, делает микоризу избыточной, однако, несмотря на контроль колонизации со стороны растения, в отдельных случаях биомасса микоризы не уменьшается вплоть до очень высоких концентраций фосфора [Graham, Drouillard, Hodge, 1996; Johnson, 1993]. Кроме того, удобрения влияют на состав грибного почвенного сообщества: эксперименты показывают, что грибы, получающие преимущество в удобренных почвах, могут быть менее эффективными мутуалистическими симбионтами, чем грибы из обычных почв, куда не вносились удобрения [Johnson, 1993]. Эффективность микоризы зависит и от сочетания генотипов симбиотических партнёров; так, грибы *Rhizoctonia*

solani и *Armillaria mellea* выступают в роли мутуалистов при образовании орхидных микориз, но для многих древесных и травянистых растений являются опасными патогенами [Leake, 1994].

Несмотря на широкое распространение, симбиоз с грибами АМ до сих пор изучен сравнительно неполно, в отличие от более молодого и более специфичного клубенькового симбиоза бобовых растений и ризобий, возникшего на его основе [Kistner, Parniske, 2002; Parniske, 2008]. Его удобство для исследователей заключается в его факультативности, а также в легкости культивирования микросимбионтов – бактерий из семейства *Rhizobiaceae* – вне симбиотической системы. Для клубенькового симбиоза характерна относительно высокая специфичность, обусловленная необходимостью тесной генетической интеграции партнёров [Schultze, Kondorosi, 1998; Wang и др., 2012a]. В результате координированной экспрессии генов обоих симбионтов инициируется программа развития принципиально нового органа растения – азотфиксирующего клубенька. При этом синхронизируются биохимические процессы симбионтов, запускаются специализированные пути дифференцировки клеток растения и бактерий, а также модифицируются защитные реакции растения, в результате чего становится возможным более тесное взаимодействие с бактериями с одновременным сохранением контроля над микросимбионтом [Caetano-Anolles, Gresshoff, 1991; Limpens, Bisseling, 2003; Popp, Ott, 2011]. Ниже будет рассмотрен процесс установления клубенькового симбиоза и перечислены задействованные в нём гены.

1.3.1. Клубеньковый симбиоз бобовых растений

Азот, входящий в состав наиболее важных биологических молекул, – белков и нуклеиновых кислот, – необходим для всех живых систем на планете. Несмотря на то, что молекулярный азот (N_2) является основным компонентом атмосферы, чрезвычайная химическая инертность делает его недоступным для подавляющего большинства организмов [Downie, 2014].

Бобовые растения способны расти в субстрате без источников связанного азота благодаря симбиозу с клубеньковыми бактериями, которые осуществляют т.н. «фиксацию» атмосферного азота, переводя его в доступную для растений форму с помощью фермента нитрогеназы [Downie, 2014; Vance, 2001]. Существует и другой тип азотфиксирующего симбиоза – актиноризный симбиоз, формируемый азотфиксирующими актиномицетами рода *Frankia* и представителями 8 семейств «небобовых» двудольных растений (Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Coriariaceae, Datisceae) [Pawlowski, Bisseling, 1996; Pawlowski, Demchenko, 2012; Wall, 2000]. Структурно и функционально этот симбиоз во многом подобен клубеньковому, и также активно изучается [Pawlowski, Demchenko, 2012; Provorov, Borisov, Tikhonovich, 2002]. Однако основное внимание исследователей, интересующихся проблемой биологической азотфиксации, сосредоточено именно на бобово-ризобийном симбиозе, и на то есть ряд объективных причин. Во-первых, среди бобовых растений немало важных сельскохозяйственных культур, выращиваемых в различных климатических поясах. В настоящее время в мировом сельском хозяйстве наблюдается постепенный переход от «интенсивного» земледелия (англ. intensive agriculture), основанного на применении большого количества минеральных удобрений (в т.ч. азотных), к щадящему «адаптивному» (англ. sustainable agriculture) земледелию, предполагающему максимальное использование биологического потенциала почв с сохранением и даже повышением их плодородия [Bhardwaj и др., 2014; Celik, Ortas, Kilic, 2004]. Бобовые растения, способные к эффективному использованию полезной почвенной микрофлоры ввиду своей высокой и разносторонней симбиотической активности, уже сейчас в наибольшей степени отвечают требованиям адаптивного земледелия [Тихонович, Проворов, 2009]. В связи с этим понимание механизмов формирования бобовыми растениями взаимовыгодных симбиозов позволит создавать комплементарные пары симбионтов, при взаимодействии которых биологическая азотфиксация

будет наиболее эффективной, а в перспективе – даже внедрять подобные симбиотические системы в небобовые сельскохозяйственные культуры [Charpentier, Oldroyd, 2010; Oldroyd, Dixon, 2014; Rogers, Oldroyd, 2014].

Во-вторых, благодаря тесной взаимной интеграции партнёров бобово-ризобиальный симбиоз представляет собой уникальную модель для изучения взаимодействия между растениями и микроорганизмами на генетическом уровне. В пределах семейства бобовые можно обнаружить различные формы симбиотических структур, отражающих эволюционную историю группы: от примитивных замкнутых «нитей фиксации», производных инфекционных нитей (подсемейство *Ceasalpinioideae*), до продвинутых клубеньков, для которых характерна сложная топология, а также дифференциация бактерий в специализированные формы – бактериоиды (подсемейство *Papilionoidea*) [Sprent, 2007; Sprent, Ardley, James, 2013]. Именно эти клубеньки, как принципиально новые органы, образованные путём тесной интеграции двух самостоятельных организмов, представляют наибольший интерес с точки зрения генетики симбиоза.

1.3.1.1. Развитие симбиотического клубенька

Развитие клубенька представляет собой сложный процесс, который традиционно подразделяется на три главных стадии: преинфекцию, колонизацию корня/морфогенез клубенька и непосредственно азотфиксацию. На первой стадии происходит взаимное распознавание симбиотических партнёров. Под воздействием выделяемых растением флавоноидов активируются бактериальные *nod*-гены, отвечающие за синтез *Nod*-фактора – главной сигнальной молекулы ризобий, которая играет ключевую роль в идентификации микросимбионта [Geurts, Bisseling, 2002; Perret, Staehelin, Broughton, 2000; Schultze, Kondorosi, 1998; Spaink, 1995] (рис.1). После успешного восприятия *Nod*-фактора в растении запускается два параллельных процесса: проникновение бактерий в корневой волосок посредством так называемой инфекционной нити и дифференцировка

клубенька из клеток коры корня. Инфекционная нить представляет собой специализированную структуру, образованную впячиванием клеточной мембраны растения. Она выстлана растительной клеточной стенкой и заполнена матриксом, в синтезе которого принимают участие оба симбионта [Perret, Staehelin, Broughton, 2000]. Инфекционная нить постепенно прорастает в клетку корневого волоска и далее в клетки коры, где в это время формируется клубеньковый примордий. Именно на стадии роста инфекционной нити проявляется строгая специфичность клубенькового симбиоза: если бактерия, собирающаяся проникнуть в корень, будет расценена растением как «неподходящая», рост инфекционной нити прервётся, и клубенёк не образуется [Downie, Walker, 1999; Philip-Hollingsworth, Dazzo, Hollingsworth, 1997].

Важнейшим этапом развития клубенька является превращение бактерий во внутриклеточных симбионтов в ходе процесса, подобного эндоцитозу. Дистальный конец инфекционной нити образует структуры под названием инфекционные капли, которые высвобождают мембранные везикулы, содержащие бактерий, в цитоплазму клеток растения. Покинув инфекционную нить, ризобии спустя некоторое время трансформируются в бактериоиды [Oke, Long, 1999]. По сравнению со свободноживущими бактериями, бактериоиды имеют увеличенный размер (в 3-7 раз) и более сложную форму, которая может быть округлой, лопастной, грушевидной и Y-образной. После данной дифференцировки в клетках бактерий начинается активный синтез нитрогеназы и других ферментов, вовлечённых в процесс биологической азотфиксации [Brewin, 1998].

Бактериоиды заключены в мембранные органеллоподобные структуры, именуемые симбиосомами, которые являются производными везикул, отпочковывающихся от инфекционной нити. Перибактероидная мембрана, окружающая бактериоиды, служит активным «интерфейсом» клубенькового симбиоза, благодаря которому партнёры осуществляют взаимный обмен

метаболитами [Brewin, 1998; Mylona, Pawlowski, Bisseling, 1995]. Растительные клетки, содержащие симбиосомы, также подвергаются глубокой дифференцировке: в них повышается содержание мембранных структур (ЭПР и комплекса Гольджи), которые участвуют в синтезе перибактероидной мембраны. Многие белки, связанные с азотфиксацией, такие как леггемоглобин (легоглобин) и клубеньк-специфичные изоформы ферментов азотного и углеродного обмена, синтезируются в клетке *de novo* в ходе повышения транскрипционной активности, связанной с полиплоидизацией и деконденсацией хроматина [Brewin, 1991; Brewin, 1998; Mergaert и др., 2006].

Клубеньк способен к стабильному поддержанию своей структуры в течение длительного времени; вместе с тем, срок жизни отдельных клубеньков даже у однолетних бобовых обычно меньше, чем у всего растения. Деградация клубенька начинается с преобразования симбиосом в литические компартменты, что позволяет растениям утилизировать весь азот, накопленный в бактериоидах [Тихонович, Проворов, 2009]. На примере люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) показано, что перед деградацией в базальной части клубенька формируется особая зона, в которой недифференцированные бактерии выходят в растительную цитоплазму и активно размножаются в ней, не превращаясь при этом в бактериоиды и не фиксируя азот. Впоследствии при отмирании клубенька этот пул бактерий единовременно высвобождается в почву [Timmers и др., 2000]. Таким образом, деградация клубенька представляет собой контролируемый и чётко скоординированный процесс, что даёт основание выделить её в отдельную, завершающую стадию симбиоза.

Описанная выше программа развития клубенька характерна только для бобовых, относящихся к так называемой IRL-кладе, или «кладе без инвертированного повтора» (англ. *inverted repeat-lacking*) подсемейства *Papilionoidea*, таких как горох, люцерна и клевер. Они формируют так

называемые недетерминированные клубеньки, которые считаются наиболее эволюционно продвинутыми [Brewin, 1991; Mergaert и др., 2006; Remigi и др., 2016]. Для недетерминированных клубеньков характерно наличие стабильной апикальной меристемы, обеспечивающей постоянный рост, и чёткое подразделение на гистологические зоны, с отдельной, постоянно обновляемой зоной фиксации атмосферного азота. Ризобии в таких клубеньках претерпевают необратимую дифференцировку в бактериоиды и уже не способны вернуться к свободноживущему состоянию. Бобовые наподобие фасоли и лядвенца образуют более простые детерминированные клубеньки, у которых апикальная меристема существует лишь в течение нескольких дней, зона фиксации азота не имеет чётких гистологических границ, а клетки, содержащие бактериоиды, перемежаются неинфицированными клетками. Бактерии в детерминированных клубеньках претерпевают слабую обратимую дифференцировку, как правило, сохраняют свой обычный размер и способность к размножению [Franssen и др., 1992; Mergaert и др., 2006] (рис.2).

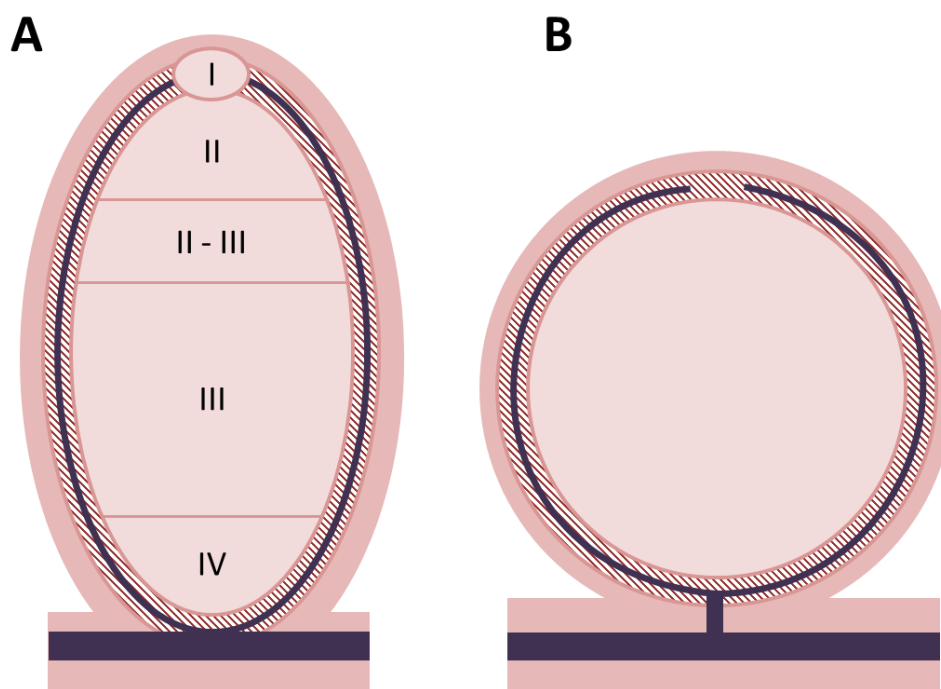


Рисунок 2. Схема строения недетерминированного (А) и детерминированного (В) клубенька бобовых растений. Римскими цифрами обозначены гистологические зоны недетерминированного клубенька: I – стабильная апикальная меристема; II – зона инфекции; II-III – промежуточная зона (интерзона); III – зона активной фиксации азота; IV – зона старения.

Столь сложная симбиотическая система, призванная осуществлять процесс биологической азотфиксации, требует координированного взаимодействия подходящих партнёров. Это взаимодействие становится возможным благодаря постоянному обмену специфическими молекулярными сигналами, механизм которого во многом до сих пор остаётся неизвестным. Дальнейшие разделы будут посвящены наиболее изученным ранним стадиям установления бобово-ризобияльного симбиоза, во время которых происходят ключевые события, обеспечивающие взаимное распознавание симбионтов.

1.3.1.2. Взаимное распознавание участников клубенькового симбиоза

Как и в случае с АМ, первым этапом установления клубенькового симбиоза является выделение растением молекул хемоаттрактантов, воспринимаемых микросимбионтом. Было показано, что клубеньковые бактерии проявляют положительный хемотаксис в ответ на сахара и органические кислоты, а также молекулы флавоноидной природы. Последние можно считать наиболее ранними факторами специфичности симбиоза, поскольку у разных видов бобовых набор секретируемых флавоноидов различен [Andrews, Andrews, 2017; Wang и др., 2012a]; в некоторых случаях флавоноиды не активируют, а, напротив, подавляют симбиотические реакции бактерий [Djordjevic и др., 1987; Firmin и др., 1986; Peters, Long, 1988].

Флавоноиды оказывают непосредственное влияние на регуляторный белок ризобий *nodD*, который приобретает способность активировать транскрипцию бактериального *nod*-оперона (от англ. *nodulation* – клубенькообразование) [Schultze, Kondorosi, 1998; Wang и др., 2012a]. Хотя в настоящее время нет прямых свидетельств взаимодействия между *nodD* и молекулами флавоноидов, известно, что перенос гена *nodD* между штаммами ризобий способен изменить хозяйскую специфичность штамма-реципиента, сделав его восприимчивым к новому составу флавоноидов [Broughton, Jabbouri, Perret, 2000; Peck, Fisher, Long, 2006]; так, ген *nodD1* из известного своей симбиотической «неразборчивостью» штамма *Rhizobium sp.* NGR234

позволил расширить круг потенциальных хозяев в норме узкоспециализированного штамма *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 [Bender, 1988]. Показано, что многие виды ризобий обладают сразу несколькими гомологичными вариантами гена *nodD*, которые, по-видимому, позволяют им воспринимать широкий спектр флавоноидов [Mulligan, Long, 1989; Schultze, Kondorosi, 1998].

В результате экспрессии *nod*-генов синтезируются липо-хито-олигосахаридные сигнальные молекулы, так называемые Nod-факторы, которые играют ключевую роль в специфическом узнавании микросимбионта растением-хозяином.

1.3.1.2.1. Nod-фактор

Молекула Nod-фактора представляет собой цепочку из 3-5 остатков N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных β -1,4-связью, с остатком жирной кислоты на передующем конце [Geurts, Bisseling, 2002; Oldroyd, 2001] (рис.1, рис.3). Биосинтез липо-хито-олигосахаридной основы Nod-фактора (LCO, от англ. lipochitooligosaccharide) катализируется продуктами генов *nodA*, *nodB* и *nodC*, общими для всех ризобий [Demont и др., 1993; Dénarié, Debelle, Promé, 1996]. Белок *nodC*, будучи N-ацетил-глюкозаминилтрансферазой, осуществляет синтез хитиновых олигомеров и контролирует длину основной цепи молекул (которая может иметь значение для специфичности взаимодействия с макросимбионтом) [Geremia и др., 1994]. Передующий конец олигосахаридной молекулы подвергается деацетилированию с помощью белка *nodB* [John и др., 1993], а затем ацилируется по соответствующему положению под воздействием белка *nodA* [Atkinson и др., 1994].

Различия между Nod-факторами разных видов и даже штаммов бактерий, влияющие на биологическую активность и хозяйскую специфичность, достигаются за счёт модификаций LCO-основы молекулы – так называемого «декора» [Broughton, Jabbouri, Perret, 2000; Perret, Staehelin, Broughton, 2000].

Так, остаток жирной кислоты может иметь различную длину и количество ненасыщенных связей, а оба конца LCO могут нести на себе различные заместители: сульфатные, фукозильные, О-ацетильные и другие функциональные группы [Ardourel и др., 1994] (рис.3). Для осуществления таких модификаций LCO у ризобий имеется уникальный набор дополнительных *nod*-генов, входящих в состав *nod*-оперона наряду с *nodABC* [Demont и др., 1993]. К примеру, гены *nodH*, *nodG*, *nodP* и *nodQ* имеются только у бактерий вида *Sinorhizobium meliloti* [Ehrhardt и др., 1995; Lerouge и др., 1990; Schwedock и др., 1994]. Гены *nodH*, *nodP* и *nodQ* осуществляют О-сульфатирование редуцирующего терминального конца LCO, а продукт гена *nodG*, являющийся гомологом дегидрогеназ и кетоацилредуктаз, предположительно вовлечён в синтез ацильной цепи на нередуцирующем конце. Как результат, Nod-фактор уникальной структуры, синтезируемый именно данным видом микроорганизма, является детерминантой специфичности в установлении симбиоза между *S. meliloti* и люцерной. Подобным же образом определяется специфичность взаимодействия ризобий, несущих ген *nodX*, с так называемыми «афганскими» формами гороха посевного [Davis, Evans, Johnston, 1988; Firmin и др., 1993] (см. раздел 1.4.1).

1.3.1.2.2. Восприятие Nod-фактора

Наиболее ранние физиологические и морфологические реакции растения, аналогичные реакциям на присутствие в ризосфере клубеньковых бактерий, можно вызвать путём добавления пикомолярных концентраций очищенного Nod-фактора [Ovtsyna и др., 2005]. При этом Nod-фактор может не иметь «декора», характерного для симбионтов данного вида бобовых, однако в этом случае развитие симбиоза будет прервано на начальных этапах [Ardourel и др., 1994; Walker, Viprey, Downie, 2000]. Всё это свидетельствует о наличии у бобовых сложной системы специфических рецепторов, воспринимающих сигнальную молекулу ризобий в несколько этапов.

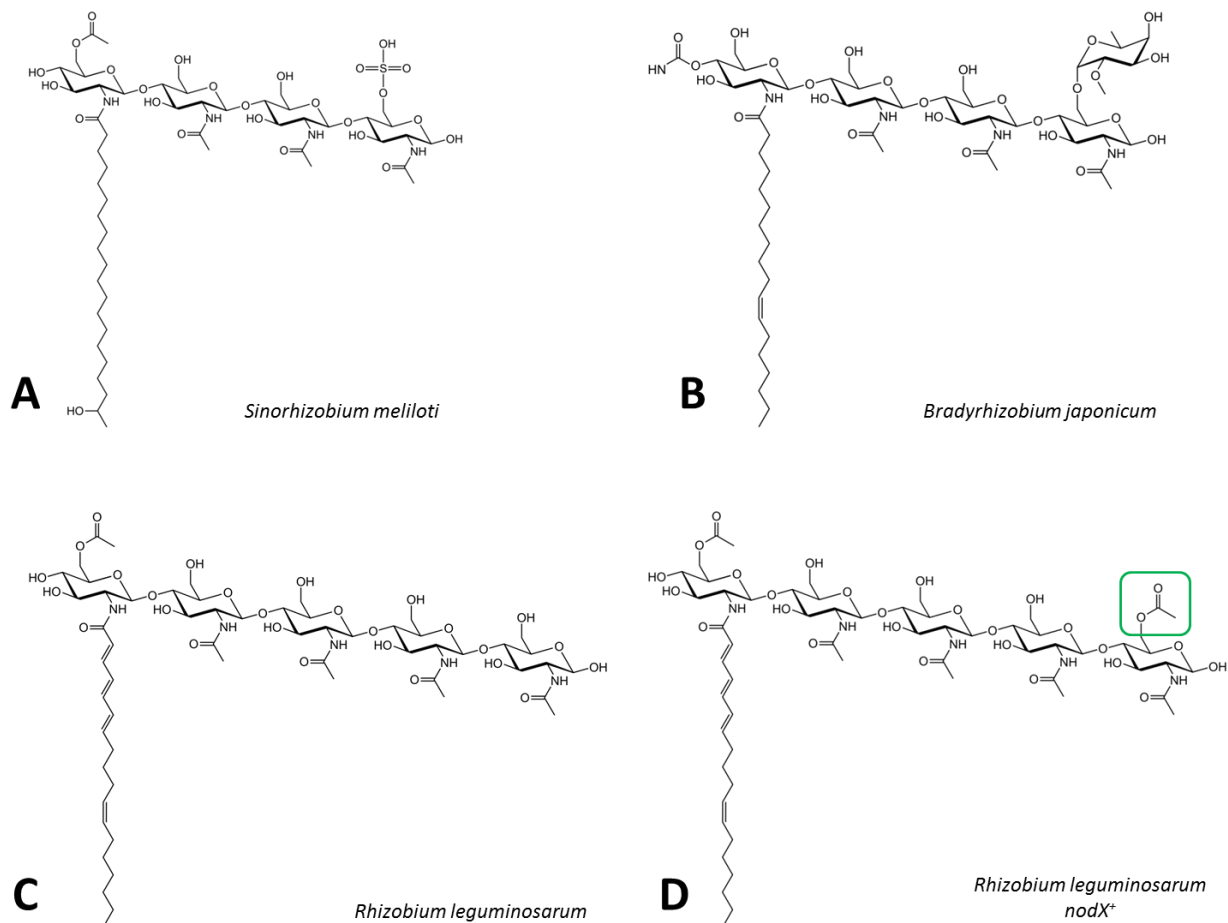


Рисунок 3. Варианты Nod-фактора, секретируемые разными видами и штаммами ризобий. Зелёной рамкой (**D**) выделена модификация (ацетилирование по редуцирующему концу), обусловленная наличием у бактерии гена *nodX*.

Более десяти лет назад путём исследования мутантов, дефектных по ранним стадиям симбиоза, у ряда модельных бобовых растений были выявлены ортологичные гены, кодирующие рецепторы к Nod-фактору: *NFR1* и *NFR5* у люцерны японского (*Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen), *NFP* и *LYK3* у гороха посевного (*Pisum sativum* L.) [Arrighi, 2006; Limpens и др., 2003; Madsen и др., 2003; Radutoiu, 2003; Smit и др., 2007; Zhukov и др., 2008]. Продуктами вышеперечисленных генов являются рецептор-подобные киназы с LysM-доменами, или LysM-RLK. LysM-домены встречаются во многих белках как эукариот, так и прокариот, и выполняют функцию связывания гликан-содержащих лигандов (таких, как хитин и его производные) [Ohnuma и др., 2008]. Они состоят из нескольких небольших мотивов, от 44 до 65

аминокислотных остатков – так называемых LysM-мотивов, или LysM-модулей (от англ. lysin motif – лизиновый мотив) [Bateman, Blycroft, 2000; Buist и др., 2008]. Каждый LysM-модуль имеет $\beta\alpha\alpha\beta$ -вторичную структуру, где две α -спирали расположены по одну сторону от антипараллельных β -слоёв. Как правило, в белке LysM-модули разделены короткими спейсерами, богатыми серином, треонином и аспарагином [Visweswaran и др., 2014].

Несмотря на довольно широкое распространение в живом мире, только у растений LysM-домены входят в структуру белков, обладающих киназной активностью – LysM-RLK [Bensmihen, Billy de, Gough, 2011]. Считается, что первоначальной функцией LysM-RLK было восприятие сигнальных молекул на основе хитина, производимых патогенными микроорганизмами, в первую очередь грибами (так называемых MAMP (англ. microbe-associated molecular pattern – молекулярный паттерн, характерный для микробов) или PAMP (англ. pathogen-associated molecular pattern – молекулярный паттерн, характерный для патогенов)) [Nakagawa и др., 2011]. В настоящее время эту функцию продолжает выполнять, например, киназа CERK1 у *Arabidopsis thaliana*. На основе анализа микросинтезии геномных участков, фланкирующих гены LysM-RLK у бобовых и небобовых растений, можно предполагать, что все эти гены имели единого общего предка [Zhu и др., 2006]. Считается, что у бобовых гены LysM-RLK претерпели дополнительные дубликации с последующей диверсификацией, что и привело к возникновению симбиотических рецепторных киназ, воспринимающих сигналы ризобий [Zhang и др., 2007].

Участие LysM-RLK в установлении клубенькового симбиоза впервые было установлено на примере генов лядвенца *NFR1* и *NFR5*, мутации в которых приводили к тому, что растение переставало реагировать на Nod-фактор [Madsen и др., 2003; Radutoiu, 2003]. Недавно было показано и непосредственное взаимодействие белков NFR1 и NFR5 с молекулами Nod-фактора [Broghammer и др., 2012]. Позднее гены, ортологичные *NFR1* и

NFR5, были обнаружены у *M. truncatula* (*LYK3* и *NFP*, соответственно) и *P. sativum* (*Sym37* и *Sym10*, соответственно). Анализ мутантов по этим генам показал, что восприятие Nod-фактора у гороха и люцерны, по-видимому, происходит сложнее, чем у лядвенца; так, для мутантов *lyk3* и *sym37* было характерно успешное проникновение бактерий в корневой волосок с последующим блоком роста инфекционной нити, в отличие от полного блока инфекции у мутантов лядвенца по гену *NFR1* – ортологу *LYK3* и *Sym37* [Smit и др., 2007; Zhukov и др., 2008]. Эти данные для гороха и люцерны говорят в пользу так называемой «двурецепторной модели» восприятия Nod-фактора, которая впервые была предложена более 20-ти лет назад [Albrecht, Geurts, Bisseling, 1999; Ardourel и др., 1994]. Согласно данной модели, у бобовых растений существует два разных типа рецепторов к Nod-фактору. «Рецептор узнавания» запускает самые ранние реакции растения на присутствие микросимбионта; он обладает высоким сродством к молекуле Nod-фактора, но не предъявляет особых требований к её структуре. «Рецептор проникновения» контролирует проникновение бактерий в клетки корневых волосков растения; он распознаёт «декор» Nod-фактора, отвечая, таким образом, за специфичность симбиоза.

Важно отметить, что у MtNFP и PsSym10, являющихся «рецепторами узнавания», отсутствует самостоятельная киназная активность, т.е. они способны функционировать только в комплексе с активной киназой, которая имеется, в частности, у MtLYK3 и PsSym37 [Broghammer и др., 2012; Nakagawa и др., 2011]. На основе всего вышесказанного можно предположить, что «рецепторы узнавания» воспринимают Nod-фактор, а затем образуют комплекс с активной киназой, формируя «рецептор проникновения»; действительно, образование подобного комплекса было продемонстрировано для белков MtNFP и MtLYK3 [Pietraszewska-Bogiel и др., 2013]. При этом, согласно данным секвенирования, геномы бобовых могут содержать более 10 генов LysM-RLK, обладающих высоким сходством с вышеописанными. Таким образом, общая схема рецепции Nod-фактора

может быть гораздо запутаннее, чем представлялось раньше, и иметь существенные различия у разных видов и даже подвидов бобовых.

Говоря о распознавании растением микробных сигналов, нельзя не упомянуть о важности отличия мутуалистических симбионтов от паразитов. Известно, что хитоолигосахариды (CO, от англ. chitooligosaccharide) и пептидогликаны, структурно сходные с симбиотическими Nod- и Мус-факторами, стимулируют защитные реакции растения, так как являются PAMP и свидетельствуют о присутствии в среде потенциально опасных бактерий и грибов [Carotenuto и др., 2017; Kelly, Radutoiu, Stougaard, 2017; Miyata и др., 2014; Nakagawa и др., 2011]. Таким образом, растение должно обладать способностью различать близкие по структуре молекулы для запуска принципиально разных биологических ответов. Мембранная LysM-RLK LYR3, обнаруженная у *M.truncatula*, проявляет крайне высокую специфичность к симбиотическим LCO (как Nod-, так и Мус-факторам), эффективно отличая их от CO; в экспериментах сродство данного белка к LCO было в 200 раз выше, чем к CO [Fliegmann и др., 2013; Malkov и др., 2016]. При этом, подобно NFP, LYR3 имеет неактивный киназный домен, и, следовательно, должна образовывать комплекс с нормально функционирующей киназой для успешной передачи сигнала. Было показано, что LYR3 физически взаимодействует с киназой LYK3, формируя мембранный комплекс, причём эффективность такого взаимодействия оказалось гораздо выше, чем при формировании аналогичного комплекса между LYK3 и NFP [Fliegmann и др., 2016]. Важно отметить, что формирование комплекса между LYK3 и LYR3 нарушается в присутствии LCO, т.е. имеет место негативная регуляция данного процесса лигандом LYR3. Всё вышесказанное позволяет предполагать, что LYR3 в норме мешает формированию стабильного комплекса NFP-LYK3, который способен провоцировать несвоевременные реакции растения в отсутствие симбиотического сигнала. Появление в среде LCO заставляет LYR3

связываться с ним, тем самым высвобождая киназу LYK3 из комплекса и позволяя ей взаимодействовать с NFP.

Приведённые данные указывают на то, что рецепторам к Nod-фактору необходимо осуществлять сложные взаимодействия друг с другом и с соответствующими лигандами для тонкой регуляции передачи симбиотических сигналов, что предполагает их особую пространственную организацию в мембране клетки. Известно, что в клетках млекопитающих ключевыми точками взаимодействия с микробами и вирусами являются так называемые липидные рафты (от англ. raft – плот) – структурированные и плотно упакованные участки мембраны, обогащённые сфинголипидами и стеролами [Lingwood, Simons, 2010; Pike, 2006]. Подобные образования были обнаружены и у растений, причём в растительных рафтах наблюдается аккумуляция особых белков-реморинов, уникальных для растительного царства [Bhat и др., 2005; Jarsch, Ott, 2011; Kierszniowska, Seiwert, Schulze, 2009]. Реморины встречаются у всех наземных растений, включая папоротники и мхи; они характеризуются консервативным С-терминальным регионом и крайне вариабельным N-терминальным регионом. Было показано, что реморины принимают непосредственное участие во взаимодействиях с микроорганизмами, в том числе симбиотическими [Jarsch, Ott, 2011; Raffaele и др., 2007]. Так, реморин SymREM1 *M.truncatula* специфично индуцируется в процессе установления клубенькового симбиоза, локализуясь в мембране инфекционной нити и симбиосом [Lefebvre и др., 2010]. Кроме того, SymREM1 взаимодействует по меньшей мере с тремя рецепторными киназами, участвующими в симбиозе: NFP, LYK3 и DMI2 (см. раздел 1.3.1.1). Роль реморинов, таким образом, может состоять в своеобразном «рекрутировании» симбиотических рецепторов и включении их в состав стабильных рафтов [Jarsch, Ott, 2011]. В ряде работ сообщается об участии в регуляции клубенькового симбиоза и других мембранных белков – флотилинов, в частности, MtFLOT4, который в процессе ризобиальной инфекции перемещается на кончик корневого волоска, локализуясь с

LYK3 [Haney, Long, 2010]; при этом происходит иммобилизация LYK3 [Fliegmann и др., 2016]. Согласно предложенной модели, первичная иммобилизация LYK3 в нескольких точечных сайтах корневого волоска негативно влияет на его функцию, после чего единичный LYK3 активируется для дальнейшей трансдукции сигнала; тем самым предотвращается множественная инфекция в одной клетке [Haney и др., 2011]. Эта гипотеза также хорошо согласуется с предполагаемой ролью LYR3 как блокатора LYK3.

После восприятия Nod-фактора ранним рецептором сигнал передаётся по так называемому Общему симбиотическому пути (англ. Common Symbiotic Pathway, CSP; см. рис.4), компоненты которого участвуют в образовании и клубенькового симбиоза, и ассоциации с микоризными грибами. Считается, что гены, изначально вовлечённые в формирование микоризы, у бобовых впоследствии были рекрутированы для взаимодействия с ризобиями. При этом ключевые компоненты CSP обнаруживаются уже у харовых водорослей (Charales), что свидетельствует о древности этого сигнального каскада и его неразрывной связи с историей развития сухопутных растений [Delaux и др., 2015].

1.3.1.3. Общий симбиотический сигнальный путь

Первым компонентом CSP является рецепторная LRR-киназа (от англ. Leucine-Rich Repeats – лейцин-богатые повторы). У *L. japonicus* её кодирует ген *SymRK* (Symbiotic Receptor Kinase – симбиотическая рецепторная киназа), у *M. truncatula* – *DMI2* (Doesn't Make Infection – «не образует инфекцию»), у *M. sativa* – *NORK* (NOdulation Receptor Kinase – рецепторная киназа клубенькообразования), у *P. sativum* – *Sym19* [Endre и др., 2002; Stracke и др., 2002]. Лиганд для этой рецепторной киназы в настоящее время остаётся неизвестным (вероятно, она выступает в роли ко-рецептора для одной или нескольких специфичных LysM-RLK), однако показано, что у *M. truncatula* её киназный домен взаимодействует с 3-гидрокси-3-метилглутарил CoA-

редуктазой 1 (HMGR1), участвующей в продукции мевалоната – предшественника многих вторичных мессенджеров [Keveі и др., 2007]. По-видимому, именно HMGR1 принадлежит основная роль в активации нижележащих этапов сигнального каскада, хотя известно, что SymRK/DMI2 способны взаимодействовать ещё с рядом белков, такими как ДНК-связывающий белок ARID, SymREM1 и SymRK-связанная E3-лигаза (SIE3) [Lefebvre и др., 2010; Yuan и др., 2012; Zhu и др., 2008]. Примечательно, что гомологи SymRK у покрытосеменных растений могут иметь укороченную форму, отличающуюся по длине и структуре внеклеточного домена. При этом укороченный вариант SymRK риса способен восстанавливать образование АМ у мутантов *symrk* лядвенца, однако для взаимодействия этих мутантов с ризобиями требуется форма с полноразмерным внеклеточным доменом [Markmann, Giczey, Parniske, 2008].

На следующем этапе развития клубенькового и микоризного симбиоза в перинуклеарной области клетки корневого волоска возникают так называемые кальциевые осцилляции («спайки»), связанные с периодичным высвобождением ионов Ca^{2+} из депо (эндоплазматической сети) [Wais и др., 2000]. Необходимыми участниками этого процесса у *L. japonicus* являются два катионных канала, CASTOR и POLLUX, находящихся во внутренней мембране ядра. У *M. truncatula* роль обоих каналов берёт на себя ортолог POLLUX, белок DMI1, а у *P. sativum* – белок Sym8 [Edwards и др., 2007; Imaizumi-Anraku и др., 2005; Oldroyd, Downie, 2008]. Данные каналы являются калий-специфичными, и, по-видимому, компенсируют деполяризацию ядерной мембраны, возникающую при движении кальция [Parniske, 2008]. Помимо них, в процессе генерации кальциевых осцилляций должны принимать участие непосредственно кальциевые каналы, высвобождающие кальций из ЭПР и ядерной оболочки в нуклеоплазму, и активные кальциевые насосы/симпортеры, способные закачать кальций обратно в депо. Природа симбиотических кальциевых каналов до сих пор остаётся неизвестной, однако предположительная локализация кальциевой

молекулярной машинерии позволила идентифицировать кальциевый насос как MCA8, кальциевую АТФ-азу из семейства SERCA [Сароен и др., 2011]. Согласно предложенной математической модели, DMI1/CASTOR-POLLUX могут выступать в роли активаторов гипотетических чувствительных к напряжению кальциевых каналов за счёт деполяризации мембраны ионами калия [Granqvist и др., 2012].

Показано, что для возникновения кальциевых осцилляций также необходимы три компонента ядерной поры, – нуклеопорины NUP85, NUP133 и NENA, – хотя механизм их участия в настоящее время неясен [Groth и др., 2010; Kanamori и др., 2006; Saito и др., 2007]. Возможно, они образуют комплекс, позволяющий передавать сигнал от клеточной мембраны к мембране ядра.

Кальциевые осцилляции служат сигналом, который воспринимается кальций/кальмодулин-зависимой серин-треониновой киназой (CCaMK у *L. japonicus*, DMI3 у *M. truncatula*). Данный белок является главным регулятором симбиотического сигнального каскада, активации которого достаточно для запуска процесса клубенькообразования или микоризации даже в отсутствие вышележащих сигналов [Gleason и др., 2006; Lévy и др., 2004; Mitra и др., 2004].

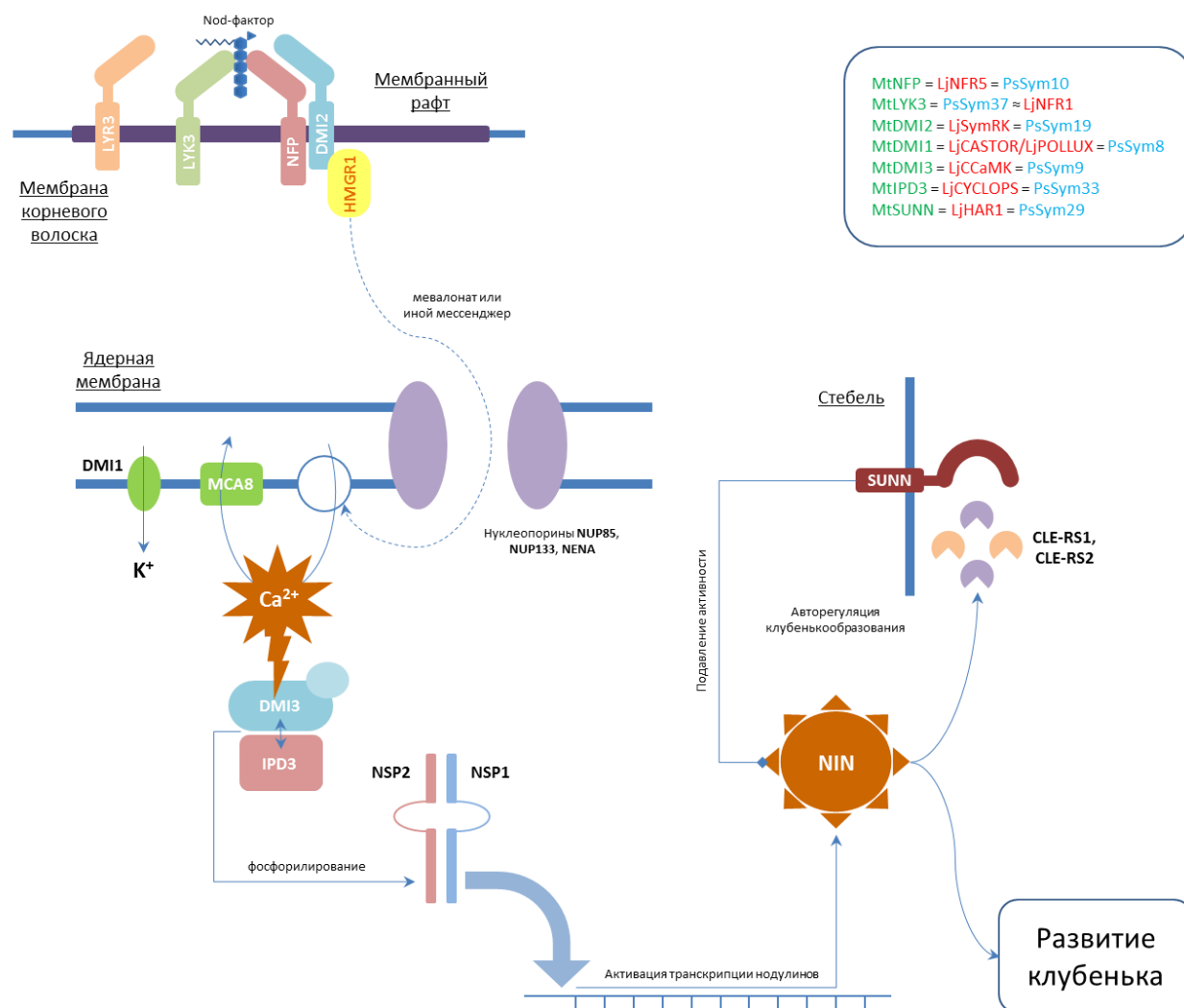


Рисунок 4. Схема Общего симбиотического сигнального пути (CSP) на примере люцерны слабоусечённой (*Medicago truncatula*). Во врезке приведены известные ортологи у лядвенца японского (*Lotus japonicus*; красный шрифт) и гороха посевного (*Pisum sativum*; синий шрифт). Дополнительную информацию см. в тексте.

CCaMK/DMI3 связывается с CYCLOPS/IPD3 – субстратом для фосфорилирования, чья точная функция неизвестна. Мутанты *cyclops* у *L. japonicus* демонстрируют блок развития инфекционной нити и аппарата проникновения при клубеньковом и микоризном симбиозе, соответственно [Parniske, 2008; Yano и др., 2008]. При этом начальные этапы органогенеза клубенька у таких мутантов не страдают, что делает CYCLOPS своеобразной «точкой бифуркации», в которой расходятся сигнальные пути, ответственные за контроль бактериальной инфекции и клубенькообразования. Важно отметить, что у мутантов *ipd3* *M. truncatula* степень проявления фенотипа зависит от генетического фона, что свидетельствует о частичной

избыточности IPD3 и наличии дополнительного участника сигнального пути со схожей функцией [Horváth и др., 2011].

Комплекс CCaMK/DMI3 + CYCLOPS/IPD3 предположительно фосфорилирует NSP2 (от англ. Nodulation Signalling Pathway – сигнальный путь клубенькообразования), транскрипционный фактор семейства GRAS [Kaló и др., 2005; Smit и др., 2005]. Прежде считалось, что NSP2 является клубенёк-специфичным фактором, однако впоследствии было показано его участие и в АМ-симбиозе. Мутанты *nsp2* демонстрируют сниженные темпы микоризации корня из-за нарушений в АМ-ассоциированном сигнальном каскаде [Lauressergues и др., 2012; Maillet и др., 2011]. Известно, что NSP2 и NSP1, ещё один клубенёк-специфичный транскрипционный фактор, участвуют в регуляции синтеза стриголактонов, которые могут выступать в роли растительных сигналов, воспринимаемых грибом [Liu и др., 2011]. При этом NSP1, по-видимому, не оказывает влияния на АМ-симбиоз и необходим исключительно для клубенькообразования и Nod-факторного сигналинга [Catoira и др., 2000].

NSP1 и NSP2 образуют гетеродуплекс, способный связываться с промоторами Nod-фактор-индуцируемых генов. Благодаря активности комплекса NSP1 + NSP2 повышается экспрессия генов ранних нодулинов ENOD40, ENOD11, ENOD12, ENOD5, регулирующих рост инфекционной нити и формирование клубенькового примордия [Albrecht, Geurts, Bisseling, 1999; Kaló и др., 2005; Smit и др., 2005]. Помимо этого, индуцируется транскрипция генов *NIN* и *ERN1*, кодирующих дополнительные транскрипционные факторы, которые отвечают за временную и пространственную координацию этапов развития клубенька [Borisov и др., 2003; Marsh и др., 2007; Middleton и др., 2007; Schauser и др., 1999]. Особую важность имеет фактор NIN (от англ. Nodule Inception – зарождение клубенька), который является вторым (после CCaMK) центральным регулятором клубенькообразования, играя ключевую роль как в

эпидермальных (инфекции), так и в кортикальных (органогенезе клубенька) процессах.

Специфичные транскрипционные факторы были обнаружены и для АМ-симбиоза. *RAM1* необходим уже на самых ранних стадиях колонизации корня грибом, поскольку при взаимодействии с мутантами по данному гену грибок плохо формирует гифоподии – органы прикрепления к растительному эпидермису [Gobbato и др., 2012]. Можно сказать, что функции *RAM1* и *NSP1* параллельны при установлении, соответственно, микоризного или клубенькового симбиоза. *RAM1* активирует экспрессию *RAM2*, участвующего в синтезе кутина, который способствует формированию гифоподий (Wang *et al.*, 2012). Интересно, что для *RAM1*, как и для *NSP1*, показано взаимодействие с *NSP2*. Таким образом, именно *NSP2* может быть последним компонентом *CSP*, определяющим дальнейшее развитие симбиотического ответа [Oldroyd, 2013]. Не исключено, что *NSP2* способен воспринимать сигнал от «поздних» симбиотических рецепторов наподобие *LYK3*.

Ещё одним важным сигнальным процессом при формировании клубенькового симбиоза является так называемая авторегуляция клубенькообразования. Считается, что растение регулирует количество клубеньков, воспринимая внешние и внутренние сигналы. Основным внешним сигналом служит информация о содержании нитратов в почве, в то время как внутренние сигналы представляют собой систему «обратной связи» между корнем и побегом, направленную на подавление роста избыточных клубеньков. Она состоит из двух сигналов – «восходящего», направленного из корня в побег и передающего информацию о бактериальной инфекции, и «нисходящего», который системно блокирует дальнейшее клубенькообразование при достижении оптимального количества клубеньков [Caetano-Anolles, Gresshoff, 1991; Ferguson и др., 2010]. Показано, что роль восходящего сигнала играют короткие пептиды

семейства CLE, CLE-RS1 и CLE-RS2, воспринимаемые специфичной LRR-киназой (HAR1 у *L. japonicus*, SUNN у *M. truncatula*, Sym29 у *P. sativum*) в стебле [Krusell и др., 2002; Mortier и др., 2010; Nishimura и др., 2002; Okamoto и др., 2009; Schnabel и др., 2005]. Транскрипционный фактор NIN, один из важнейших регуляторов клубенькового симбиоза, повышает экспрессию генов *CLE*, тем самым усиливая восходящий сигнал по мере образования новых клубеньков. За счёт нисходящего сигнала активность *NIN* подавляется, что приводит к системному блоку клубенькообразования и позволяет сохранять количество клубеньков на необходимом уровне [Soyano и др., 2014].

Хотя восприятие бактериальных сигналов является самой ранней стадией симбиоза, и все дальнейшие этапы сигнального каскада на первый взгляд лишены специфичности в отношении симбиотического партнёра, показано, что рецепторные киназы, обеспечивающие распознавание микросимбионтов, играют важную роль и на поздних этапах клубенькообразования. Так, ген *DMI2*, помимо участия в восприятии ранних симбиотических сигналов, необходим ещё и для нормального формирования симбиосом [Limpen и др., 2005]. Показано, что при снижении его экспрессии у люцерны образуются структуры, сходные с симбиотическими структурами примитивных бобовых: рост инфекционной нити не прекращается внутри клубенька, и бактерии не высвобождаются из неё в цитоплазму растительных клеток. При этом фиксации азота также не происходит. Для гена *NFP* также была продемонстрирована экспрессия как на ранних этапах симбиоза, в клетках эпидермиса, так и на поздних, в зоне клубенькового примордия [Rival и др., 2012]. Экспрессия *NFP* не прекращается и в зрелом клубеньке, где она сосредоточена в зоне инфекции [Bensmihen, Billy de, Gough, 2011]. Таким образом, специфические сигналы, сообщающие растению важную информацию о микросимбионтах, могут поступать от бактерий на протяжении всего процесса симбиоза.

1.4. Горох посевной (*Pisum sativum* L.) как модельный объект для изучения генетики клубенькового симбиоза.

Горох относится к древней группе культурных растений, происходящих из ближневосточного центра доместикации, и по сей день входит в число важнейших мировых сельскохозяйственных культур. Горох был окультурен приблизительно 10000 лет назад, и совместно с другими бобовыми стал важной составляющей рациона ранних цивилизаций Ближнего Востока и Средиземноморья [Smýkal и др., 2011].

Раннее окультурирование, широкое распространение, способность к гибридизации и разнообразие форм затрудняют систематику гороха, и в настоящее время на эту проблему не существует единого взгляда [Костерин, 2015b]. Согласно одной из последних опубликованных классификаций, род *Pisum* состоит из двух видов, *P. fulvum* Sibth. & Sm., и *P. sativum* L., при этом последний подразделяется на два подвида: культурный горох *P. sativum* subsp. *sativum* и дикую форму *P. sativum* subsp. *elatus* (M. Bieb.) Asch. & Graebn [Nesbitt, 2003]. Популяции *P. elatus* в настоящее время встречаются по всему Средиземноморскому бассейну, в то время как распространение *P. fulvum* ограничено Ближним Востоком (Левант). Нередко в качестве третьего самостоятельного вида выделяется также *P. abyssinicum* A. Br. – независимо окультуренный эндемик Йемена и Эфиопии, который ранее описывался как подвид *P. sativum* [Костерин, 2015b].

Со времён открытия законов наследственности Грегором Менделем в 1866 году горох считается классическим модельным объектом генетики, в том числе и генетики симбиозов. Преимуществами гороха являются однолетний жизненный цикл, самоопыление и относительно небольшое число хромосом, однако ему также присущ и ряд недостатков, которые существенно затормозили темпы генетических исследований данного объекта. Первым серьёзным препятствием для генетиков стало то, что хромосомы гороха имеют довольно мелкий размер и бедны морфологическими особенностями [Hall, Parker, Ellis, 1997; Костерин, 2015a]. При этом размер генома гороха

весьма велик: он составляет приблизительно 4.3 – 4.45 Гб, и существенную его часть (50-60%) занимают протяжённые мобильные элементы (транспозоны), в основном из семейств Ty3/gypsy и Ogre [Macas, Neumann, Navrátilová, 2007; Stacey и др., 2006]. Вкупе с низкой способностью гороха к генетической трансформации это побудило исследователей в начале 90-х годов XX века обратиться к более удобным модельным объектам: лядвенцу японскому [Handberg, Stougaard, 1992] и люцерне слабоусечённой [Barker и др., 1990]. Тем не менее, благодаря сельскохозяйственной ценности гороха исследования на нём продолжают проводиться и по сей день.

Изучение генетики сельскохозяйственных культур неразрывно связано с именем выдающегося российского учёного Николая Ивановича Вавилова. В 20-х годах XX века он первым в мире заговорил о необходимости принципиально новых, научно обоснованных подходов к селекции, направленных на ускоренное создание сверхпроизводительных сортов. Одним из важнейших шагов в данном направлении Вавилов считал изучение мировых генетических ресурсов культурных растений и их диких родственников [Вишнякова, 2012]. В 1920-40х годах под руководством Вавилова (и зачастую с его непосредственным участием) были организованы многочисленные экспедиции в различные точки земного шара с целью изучения и сбора селекционного материала, а также поиска центров генетического разнообразия культурных растений (которые Вавилов отождествлял с центрами окультуривания) [Гончаров, 2014; Костерин, 2015b]. Обнаруженные генетические вариации, связанные с различными условиями произрастания и способами возделывания, должны были стать ценным источником полезных признаков для будущей селекции.

Одним из многочисленных соратников и последователей Вавилова был Леонид Ипатьевич Говоров, долгое время занимавший должность заведующего отделом зернобобовых культур Всесоюзного Института Растениеводства (ВИР). Идеи Вавилова Говоров активно применял к

бобовым культурам, выделяя среди них основную для СССР – горох. Обобщая материалы, собранные в экспедициях Вавилова по Ближнему Востоку, Говоров пишет статью «Горох Афганистана. К проблеме происхождения культурного гороха», материалы которой вошли в сборник «Земледельческий Афганистан», вышедший в 1929 году [Вавилов, Букинич, 1929; Говоров, 1928]. В данной статье Говоров даёт исчерпывающее ботаническое, морфологическое и географическое описание переднеазиатских форм гороха, отмечая высокое разнообразие признаков, сконцентрированных в этом регионе. В числе прочего Говоров также впервые обращает внимание на особый характер взаимодействия с клубеньковыми бактериями, присущий некоторым горохам Афганистана [Говоров, 1928]. Впоследствии эта тема получила развитие в работе З.Г. Разумовской. Проанализировав порядка 30-ти образцов из коллекции ВИР, Разумовская обнаружила ряд генотипов гороха, преимущественно из Афганистана, демонстрирующих полную или частичную неспособность образовывать симбиоз с бактериями в почвах Ленинградской области [Разумовская, 1937]. К сожалению, в дальнейшем это направление не получило в СССР должного развития, отчасти из-за установления «Мичуринской агробиологии» в качестве доминирующей парадигмы советской биологической науки.

Интерес к горохам, «устойчивым к заражению» клубеньковыми бактериями, был возрождён в 1970-х – 1980-х годах Т.А. Lie, который начал изучать горох из Афганистана и других стран центра генетического разнообразия в поисках природных вариаций генов, вовлечённых в симбиоз [Lie, 1971; Lie, 1978; Lie, Timmermans, Ladizinski, 1982; Lie, Timmermans, 1983]. Он обнаружил несколько генотипов, проявляющих дефекты клубенькообразования или азотфиксации при взаимодействии со штаммами ризобий, распространёнными в Европе. При этом они вступали в нормальный симбиоз со штаммами, выделенными из почв Турции, Израиля и ряда других ближневосточных стран. Генетические детерминанты, отвечающие за

проявление этих признаков, получили название *Sym1* (температурозависимое клубенькообразование со штаммами из Европы у гороха линии Iran) и *Sym2* (общая устойчивость к заражению штаммами из Европы). В скрещиваниях оба детерминанта вели себя как менделевские гены, при этом *Sym1* проявлял доминантные, а *Sym2* – рецессивные свойства. Эти гены стали первыми симбиотическими генами, описанными у бобовых [Lie, 1984].

Ген *Sym2* впоследствии был картирован в группе сцепления I генома гороха, рядом с локусом леггемоглобина, в составе кластера, содержащего ряд других *sym*-генов [Kozik и др., 1996]. Картирование *Sym1* не предпринималось; выяснилось, что он представляет собой аллельную вариацию гена *Sym2*. Кажущиеся противоречия в характере проявления признаков *Sym1* и *Sym2* в фенотипе были объяснены тем, что *Sym2* ведёт себя как доминантный или рецессивный детерминант в зависимости от свойств штамма бактерий, с которым взаимодействует растение [Kozik и др., 1995].

В литературе феномен устойчивости отдельных линий гороха из Передней Азии к заражению ризобиями иногда называют «афганским» фенотипом, а аллель гена *Sym2*, контролирующую данный признак, – «афганской» аллелью (*Sym2^A*) [Geurts и др., 1997; Жуков и др., 2008]. Большая часть известных линий с «афганским» фенотипом действительно происходит из Афганистана, однако следует иметь в виду, что признак не имеет строгой географической привязки: горох, произрастающий на территории Афганистана, не обязательно будет иметь «афганский» фенотип, и наоборот, образцы с «афганским» фенотипом обнаруживаются в том числе и за пределами Афганистана.

У штаммов бактерий, способных к взаимодействию как с «европейскими», так и с более избирательными «афганскими» линиями гороха, был обнаружен дополнительный *nod*-ген, получивший название *nodX* [Davis, Evans, Johnston, 1988; Firmin и др., 1993]. Данный ген кодирует фермент ацетилтрансферазу, которая осуществляет специфичное ацетилирование молекулы Nod-фактора

по редуцирующему концу в положении С-6 (рис.3, D). Типовым штаммом, вступающим в симбиоз с «афганскими» формами гороха, считается штамм *Rhizobium leguminosarum* TOM, выделенный из почв Турции [Firmin и др., 1993]. Стоит отметить, что ген *nodX* может быть функционально замещён на ген *nodZ* от *Bradirhizobium japonicus*. Ген *nodZ* кодирует фукозилтрансферазу, которая фукозилирует редуцированный конец липохитоолигосахарида. При этом достоверных отличий в количестве, морфологии и функциональности между клубеньками, образованными *nodX*-штаммами и *nodZ*-штаммами, не наблюдается [Ovtsyna и др., 1998; Ovtsyna и др., 2000]. Таким образом, фукозильная группа в процессе инфекции и клубенькообразования компенсирует отличную от неё ацетильную группу, а, следовательно, требования к структуре Nod-фактора у «афганского» гороха не являются абсолютно строгими.

1.4.1. «Неуловимый» ген *Sym2*

Поскольку для успешного взаимодействия с «афганским» горохом ризобиям требуется особая модификация молекулы Nod-фактора, опосредованная геном *nodX* или *nodZ*, справедливо было предположить, что ген *Sym2* каким-то образом связан с рецепцией бактериального сигнала, а его изучение способно пролить свет на механизмы специфичности клубенькового симбиоза. В 2003 году на модельном растении *M. truncatula* был изучен геномный регион, синтенированный региону *Sym2* у гороха [Limpens и др., 2003]. Выяснилось, что данный регион содержит кластер генов LysM-RLK, названных *MtLYK1-MtLYK7*. Для продукта гена *LYK3* было показано непосредственное участие в процессе восприятия Nod-фактора и последующем формировании инфекционной нити [Smit и др., 2007]. Впоследствии универсальность механизма рецепции Nod-фактора посредством симбиотических LysM-RLK была подтверждена на примере люцерны японского и гороха (см. раздел 1.3.1.2.2). При этом отсутствие у других видов бобовых фенотипа, подобного «афганскому», не позволило обнаружить у них истинный ортолог *Sym2*.

В 2008 году В.А.Жуков с соавторами описал у гороха первые реальные гены-кандидаты на роль *Sym2* [Zhukov и др., 2008]. Скрининг библиотеки кДНК корней гороха с использованием зонда на основе последовательности *LjNFR1* позволил выявить два транскрипта, относящихся к разным, хотя и гомологичным генам, обозначенным *K10* и *K1*. Данные гены были локализованы в группе сцепления I генома гороха (регион *Sym2*), продемонстрировав при этом тесное сцепление друг с другом. Выяснилось, что ген *K10* тождественен гену *PsSym37*, который ранее был описан по двум мутантам, полученным на разном генетическом фоне: *RisNod4* на линии *Finale* и *K24* на линии *Rondo* [Borisov и др., 2007; Jacobsen, 1984; Postma, Jacobsen, Feenstra, 1988]. При этом было показано, что у линии *RisNod4* мутация приводит к замене аминокислоты в рецепторном домене белка *Sym37*, а у *K24* – в киназном домене. Интересно, что мутантный фенотип линии *RisNod4* оказалось возможным супрессировать *nodX*-содержащим штаммом ризобий, что на тот момент сделало *Sym37* наиболее вероятным кандидатом на роль *Sym2* (рис. 5). К сожалению, при анализе последовательности данного гена у ряда «афганских» линий гороха не было выявлено никаких характерных черт, однозначно отличающих её от последовательности *Sym37* «европейских» линий; то же самое было справедливо и для гена *K1*. Позже Li с соавторами связали наблюдаемый полиморфизм *Sym37* со способностью растения воспринимать Nod-факторы с разной структурой остатка жирной кислоты на нередуцирующем конце молекулы, в синтезе которого участвует ген *nodE* [Li и др., 2011]. Это свидетельствует о том, что у гороха должно быть как минимум два «поздних» рецептора к Nod-фактору: *Sym37* и *Sym2*, взаимодействующих, соответственно, с нередуцирующим и редуцирующим концами сигнальной молекулы. Функции гена *K1* на данный момент окончательно не определены, хотя предполагается, что его продукт может работать на самых ранних этапах восприятия Nod-фактора, до вовлечения *Sym10* или параллельно с ним, возможно, выполняя функцию *MtLYR3* [Kirienko и др., 2018]. Таким

образом, механизм распознавания азотфиксирующего микросимбионта у гороха, по-видимому, является более сложным и включает больше генов, чем у других модельных бобовых, и представляет интерес для исследования. Данная диссертационная работа посвящена обнаружению и изучению неизвестного ранее гена LysM-RLK гороха, названного *LykX* (от LysM Kinase eXclusive). В ходе проведённого исследования удалось показать, что *LykX* принимает участие в клубеньковом симбиозе, демонстрируя при этом весь комплекс признаков, характерный для «неуловимого» гена *Sym2*.

Sym37

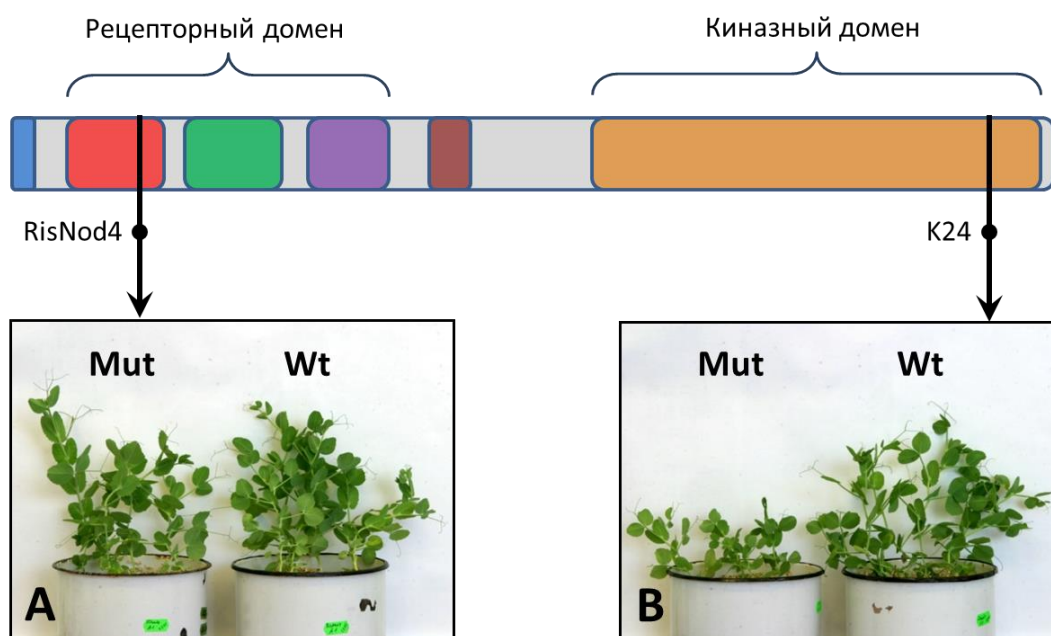


Рисунок 5. Фенотипы мутантов по гену *Sym37* (Mut) и исходных линий (Wt) после инокуляции *nodX*⁺ штаммом ризобий. Чёрными стрелками отмечены места вызванных мутацией аминокислотных замен в белке Sym37 у линии RisNod4 (рецепторный домен белка) и K24 (киназный домен белка). **А** – супрессия мутантного фенотипа линии RisNod4 при взаимодействии с *nodX*⁺ штаммом ризобий. **В** – отсутствие супрессии мутантного фенотипа линии K24 при взаимодействии с *nodX*⁺ штаммом ризобий. Фотографии любезно предоставлены Жуковым В.А.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Растительный материал

В работе использовался ряд сортов и генетических линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) из коллекции лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург, Россия) (табл. 1). Поиск дополнительных линий гороха, проявляющих «афганский» фенотип, проводился на материале Коллекции мировых генетических ресурсов культурных растений ВИР (Санкт-Петербург, Россия), любезно предоставленном д.б.н. Маргаритой Афанасьевной Вишняковой, зав. Отделом генетических ресурсов зернобобовых культур ВИР, и к.б.н. Еленой Викторовной Семёновой, куратором коллекции гороха (табл. 1 Приложения). Сорт Caméog был любезно предоставлен доктором Абдельхафидом Бендахмани (Abdelhafid Bendahmane), зам. директора URGV (Unité de Recherche en Génétique Végétale; Тулуза, Франция). Линии гороха *P. fulvum* 701 и *P. sativum* ssp. *elatius* WL2123 любезно предоставлены д.б.н. Олегом Энгельсовичем Костериным (ИЦиГ, Новосибирск, Россия).

Таблица 1. Линии гороха посевного, использованные в работе.

Название по каталогу ВНИИСХМ	Страна происхождения	Проявляемый симбиотический фенотип
84	Узбекистан	«афганский»
cv. Iran	Иран	«афганский»
K-6047-2	-	«афганский»
NGB2150	Афганистан	«афганский»
Caméor	Франция	«европейский»
Finale	Канада	«европейский»
Frisson	Франция	«европейский»
NGB1238	-	«европейский»
Rondo	Нидерланды	«европейский»
SGE	-	«европейский»
Sparkle	США	«европейский»

2.1.1. Условия вегетации растений

В летний период растения выращивались в вегетационных домиках в условиях, соответствующих климату в данном регионе (Санкт-Петербург, Ленинградская область). В осенне-зимний период, а также при необходимости соблюдения особой чистоты эксперимента, растения выращивались в фитотронах Vötsch Industrietechnik VB 1014 (Германия) при заданных условиях:

- день/ночь – 16/8 часов;
- температура – 21°C;
- относительная влажность воздуха – 75%;
- освещённость – 38000 люкс.

Семена предварительно стерилизовались концентрированной серной кислотой (H_2SO_4) в течение 10-15 мин., после чего пятикратно промывались дистиллированной водой. Стерилизованные семена проращивались на чашках Петри, заполненных стерильным вермикулитом, в течение 3-х суток при 28°C, затем проростки высаживались в сосуды. Для крупномасштабных опытов в вегетационных домиках стерилизация и предварительное проращивание семян не проводились.

Растения выращивались в сосудах объемом 2 л, заполненных стерильным песком. Для достижения стерильности песок вместе с сосудами прокаливался в сушильном шкафу в течение 2-х часов при 200°C. При посадке семян в субстрат вносилось минеральное питание (табл.2), по 150 мл раствора на один сосуд. Если требовалось провести анализ симбиотических признаков и эффективности клубенькообразования, азот в виде нитрата аммония к питательному раствору не добавлялся.

Таблица 2. Состав минерального питания для растений.

Компонент раствора	Концентрация мг/л	Компонент раствора	Концентрация, мг/л
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1000	KI	0,5
K ₂ HPO ₄	1000	CuSO ₄	0,4
Ca ₃ (PO ₄) ₂	200	Al ₂ (SO ₄) ₃ * 18H ₂ O	0,3
NH ₄ NO ₃	600	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,2
NaFe-EDTA	10	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,2
микроэлементы		NaCl	0,2
H ₃ BO ₃	5	NiSO ₄	0,2
(NH ₄) ₂ MoO ₄	5	MnSO ₄	0,2
KBr	0,6	Li ₂ SO ₄	0,2

Для получения гибридов F₁ семена родительских линий высаживались в сосуды, заполненные коммерческим грунтом Terra Vitae (производитель – ЗАО «МНПП «Фарт», Россия). Скрещивания осуществлялись на стадии бутонизации. Манипуляции производились пинцетами, стерилизованными этиловым спиртом. Из материнских цветков, препарированных на стадии бутонов, удалялись незрелые тычинки. Затем пыльца отцовских цветков наносилась на рыльце пестика материнских цветков.

2.2. Бактериальный материал

В экспериментах, предполагающих анализ клубенькообразования, для инокуляции растений гороха использовались штаммы вида *Rhizobium leguminosarum* из коллекции лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург, Россия):

- Штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (= CIAM1026), впервые выделенный в Кустанайском районе Казахстана из клубеньков гороха сорта «Раменский 77». Отличается высокой

конкурентоспособностью и эффективностью колонизации растения. Используется во ВНИИСХМ в качестве модельного штамма. Не способен заражать «афганские» формы гороха. Обладает устойчивостью к стрептомицину.

- Штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 *gusA*, являющийся дериватом штамма *Rlv* RCAM1026 с конститутивной экспрессией репортерного гена *gusA* (бета-глюкуронидаза). Получен во ВНИИСХМ.
- Штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* A1, впервые выделенный в Ленинградской области из клубеньков «афганской» линии гороха. Характеризуется наличием гена *nodX* и повышенной продукцией Nod-фактора.
- Штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* ТОМ, модельный штамм, имеющий ген *nodX*. Впервые был выделен из почв Турции и описан как эффективный симбионт «афганских» форм гороха.

2.2.1. Условия культивации бактерий

Штаммы культивировались на твёрдых средах ТУ и № 79 (табл. 3,4) в термостате при температуре 28°C в течение трех дней. В случае штамма RCAM1026 в среду добавлялся стрептомицин (100 мкг/мл); в случае штаммов A1 и ТОМ антибиотики в среду не добавлялись. Инокуляция растений производилась водной суспензией бактерий: культура («газон») с одной чашки Петри ресуспендировалась в 1 л стерильной дистиллированной воды (конечное содержание КОЕ/мл – не менее 10⁶) и полученный раствор вносился при посадке растений параллельно с минеральным питанием, по 100 мл на сосуд объемом 2 л.

Таблица 3. Состав питательной среды ТУ.

Компоненты среды	Концентрация, г/л
Триптон	5
Дрожжевой экстракт	3
CaCl ₂	0.5
Агар	15

pH 7.0-7.2

Таблица 4. Состав питательной среды №79.

Компоненты среды	Концентрация, г/л
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
CaCO ₃	следы
Дрожжевой экстракт	0.4
Маннит	10
Агар	15

pH 7.0-7.2

При работе со штаммом *Escherichia coli* DH10B, содержащим ВАС-плазмиду со вставкой Psa-B-Sam 446P4, культивация проводилась на твёрдой среде LB (табл. 5) в термостате при температуре 37°C (см. раздел 3.3).

Таблица 5. Состав питательной среды LB.

Компоненты среды	Концентрация, г/л
Триптон	10
Дрожжевой экстракт	5
NaCl	10
Агар	15

pH 7.0-7.2

2.3. Молекулярно-биологические методы

2.3.1. Выделение ДНК из растительного материала

Геномная ДНК гороха выделялась с помощью буфера СТАВ (по [Rogers, Bendich, 1985]; модифицировано). В пробирку с плоским дном объёмом 1,5 мл вносился биологический материал (один лист или прилистник массой ~ 30 мг), добавлялось 700 мкл 2х буфера СТАВ и 3-4 стерильных стеклянных шарика. Материал гомогенизировался на установке Fastprep-24 (MP Biomedicals, США), после чего инкубировался на водяной бане при 65°C в течение 1-1,5 часов. Затем в пробирку добавлялось 700 мкл хлороформа, вся смесь перемешивалась на вортексе и центрифугировалась в течение 10 минут при 16,873 g. Верхняя фракция переносилась в чистую пробирку, и предыдущий этап повторялся ещё 1-2 раза. После очередного переноса верхней фракции в новую пробирку туда же добавлялось 750 мкл 96% этанола и 20 мкл 5M NaCl. Содержимое пробирки перемешивалось переворачиванием, после чего смесь центрифугировалась в течение 10 минут при 16,873 g. Супернатант сливался, а к осадку добавлялось 500 мкл 70% этанола. Проба перемешивалась на вортексе, центрифугировалась (10 минут, 16,873 g), и спирт сливался. Затем проба инкубировалась при 37°C до полного испарения остатков спирта (~ 30 минут), и осадок ДНК растворялся в 20-30 мкл буфера TE (pH = 8.0). Качество выделения ДНК оценивалось при помощи электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого

этидия. В зависимости от концентрации исходной пробы, для последующих молекулярно-биологических операций ДНК разводилась очищенной деионизированной водой в 5-10 раз.

2.3.2. Выделение РНК из растительного материала

Для выделения РНК гороха растительный материал (инокулированные корни) предварительно подвергался заморозке в жидком азоте, после чего растирался пестиком в ступке в присутствии жидкого азота. Перед работой все инструменты были простерилизованы прокаливанием при 200°C в сушильном шкафу в течение двух часов. Процедура выделения осуществлялась при помощи набора NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel, Германия) по протоколу, рекомендованному производителем. Выделенная РНК дополнительно подвергалась обработке ДНКазой (RQ1 DNase, Promega, США) для удаления из проб остатков ДНК. Концентрация полученной РНК определялась на флуориметре Qubit 3 (Thermo Fisher Scientific, США). Краткосрочное хранение проб РНК осуществлялось при -20 °C, долгосрочное – при -70 °C.

2.3.3. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Аmplification целевых фрагментов ДНК осуществлялась в термоциклерах iCycler (Bio-Rad, США), Dyad (Bio-Rad, США) и Personal Cycler Biotron1999 (Biometra, Германия). В реакции использовался набор ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), все компоненты смешивались в соотношении, рекомендуемом производителем. Стандартные условия реакции были следующими:

1. Предварительная денатурация: 95°C, 5 мин.
2. Амплификация в течение 35 циклов:
 - а) денатурация – 95°C, 30 сек.
 - б) отжиг праймеров – $t^{\circ}\text{отж}$ (температура отжига, определяемая в зависимости от пары праймеров), 30 сек.

с) элонгация (синтез целевого фрагмента ДНК) – 72°C, t элонгации (время элонгации рассчитывалось исходя из длины целевого фрагмента; 45 сек. на 1000 bp)

3. Окончание синтеза ДНК: 72°C, 5 мин.

Праймеры, использованные в работе, приведены в табл. 2 Приложения. Дизайн праймеров осуществлялся в программе PrimerSelect (DNASTAR, США). Качество праймеров дополнительно проверялось на онлайн-сервисе OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводилось при помощи электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Визуализация результата электрофореза проводилась на автоматическом трансиллюминаторе Universal hood II (Bio-Rad, США) и программы документирования гелей Quantity One (Bio-Rad, США).

2.3.4. Рестрикционный анализ

Для определения локализации гена *LykX* производился косегрегационный анализ маркеров типа CAPS, представляющих собой участки генов *LykX* и *Sym37*, на выборке растений F2 (SGE Fix⁻-1×1238). Аллельные состояния маркеров определялись путем обработки амплифицированных фрагментов ДНК специфичной эндонуклеазой рестрикции BsuRI(HaeIII) производства Fermentas (Литва).

Для осуществления рестрикции реакционная смесь выдерживалась при температуре 37°C в течение 1,5 часов. Результаты визуализировались при помощи электрофоретического разделения в 3% агарозном геле.

2.3.5. Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК

Амплифицированные фрагменты ДНК подвергались очистке при помощи смеси ферментов экзонуклеазы I (ExoI) и щелочной фосфатазы креветки (Shrimp alkaline phosphatase, SAP) (Thermo Scientific, США) по протоколу, рекомендуемому производителем. Очищенные фрагменты секвенировались

на приборе ABI Prism3500xL (Applied Biosystems, США) в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ВНИИСХМ. Визуализация и обработка данных секвенирования осуществлялась с помощью программ Vector NTI Advance 11 (Thermofisher Scientific, США) и MEGA v.7 [Kumar и др., 2008].

2.3.6. Синтез кДНК и проведение RACE ПЦР

Первая цепь кДНК синтезировалась на матрице тотальной РНК (см. раздел 2.3.2) с использованием набора кДНК Mint (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Амплификация концов кДНК гена *LukX* осуществлялась с использованием набора праймеров Mint RACE (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Геноспецифичные праймеры, сконструированные для nested-ПЦР («вложенной» ПЦР), приведены в табл. 2 Приложения.

2.3.7. Проведение ПЦР в реальном времени (rtПЦР)

РНК (см. раздел 2.3.2) была предварительно обработана дезоксирибонуклеазой (RQ1 DNase, Promega, США) для удаления из проб остатков ДНК. Определение концентрации РНК проводилось на флюориметре Qubit 3 (Thermo Fisher Scientific, США). Первая цепь кДНК была синтезирована с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР в режиме реального времени проводилась в автоматическом амплификаторе C1000Thermal Cycler, совмещённом с оптическим модулем CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, США), с использованием коммерческого набора qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Анализ экспрессии генов осуществлялся в трёх технических и трёх биологических повторностях. Условия амплификации (см. раздел 2.3.3) были следующими:

- а) денатурация – 95°C, 30 сек.
- б) отжиг праймеров – 58°C, 30 сек.

с) элонгация – 72°C, 30 сек.

Флуоресценция интеркалирующего красителя SYBR Green I регистрировалась в конце каждого цикла при 72°C. Количественная оценка экспрессии анализируемого гена проводилась с использованием программного обеспечения Bio–Rad CFX Manager 3.1. В качестве референсных генов были использованы гены *GAPDH* (*GapC1*) и *Actin2* [Czechowski и др., 2005].

2.3.8. Анализ ВАС-библиотеки гороха посевного

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

Для скрининга ВАС-библиотеки были сконструированы пары праймеров к последовательностям генов *K1*, *Sym37* и *LykX* (табл. 2 Приложения). Скрининг осуществлялся поставщиком услуги методом количественной ПЦР (qPCR) с использованием пулов ВАС-ДНК, амплифицированных при помощи ДНК-полимеразы Phi29, и праймеров к генам интереса.

2.3.9. Выделение ВАС-плазмиды из культуры бактерий

Для выделения ВАС-плазмиды из клона Psa-B-Cam 446P4 бактерии выращивались на среде LB (см. раздел 2.2.1) с добавлением антибиотика хлорамфеникола (36 мкг/мл) в течение 16 часов. Выделение проводилось с помощью набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Германия) по протоколу, рекомендованному производителем.

2.3.10. Поиск мутантов по гену *LykX* с помощью метода TILLING

Поиск мутантов по гену *LykX* осуществлялся с применением методики TILLING (от англ. Targeting Induced Local Lesions in Genomes – поиск индуцированных локальных нарушений в геномах), совмещающей классический мутационный анализ с современными способами точного

выявления нуклеотидных замен в определённом локусе. Была использована коллекция EMS-мутантов гороха сорта Caméor, доступная на коммерческой основе в Отделе изучения геномики растений (Unité de Recherche en Génomique Végétale, URGV) Национального института сельскохозяйственных исследований (INRA), Эври, Франция. Для скрининга коллекции к последовательности гена *LukX* были подобраны пары праймеров, охватывающие участки с наибольшей вероятностью возникновения стоп-кодонов (UAG, UGA, UAA). Основное внимание было сосредоточено на участке гена, кодирующем рецепторную часть белка; см. табл. 2 Приложения.

Из выявленных мутантных семей в дальнейшую работу были взяты те, у которых вызванная мутацией замена аминокислоты имела наибольшие шансы повлиять на функцию белка (согласно предсказаниям алгоритма SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>)).

Наличие мутации у растений отобранных мутантных семей подтверждалось путём ПЦР-амплификации нужного фрагмента гена с помощью тех же праймеров, что использовались для TILLING-скрининга, и последующего секвенирование амплифицированных фрагментов. Выделение ДНК и секвенирование фрагмента интереса осуществлялись методами, описанными в разделах 2.3.1 и 2.3.5, соответственно. Анализ симбиотического фенотипа подвергались потомки растений, несущих мутантную аллель *LukX* в гомозиготном состоянии.

2.4. Микроскопия

Для анализа фенотипа мутантов по гену *LukX* растения выращивались в песке, как описано в разделе 2.1.1, с добавлением суспензии культуры ризобий штамма RCAM1026 *gusA*. На сроке 4 недели после инокуляции с каждого растения собиралось по 5 отрезков корней длиной 2-2,5 см, отступив примерно 2 см от основания корня и по 2 см от кончиков (если это было

возможно). Отрезки корней окрашивались в течение 18 часов в растворе, представляющем собой 50mM Na-фосфатный буфер (pH 7.0), содержащий 0.1% Тритона, 5mM $K_3Fe(CN_6)$ (красной кровяной соли), 5mM $K_4Fe(CN_6)$ (жёлтой кровяной соли) и 0.02% 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-b-D-глюкуроновой кислоты (X-glc). Затем окрашенные отрезки раскладывались на предметные стёкла (по 5 отрезков на стекло), и проводился подсчёт т.н. инфекционных событий (случаев формирования микроколоний в изгибе корневого волоска и начальных этапов проникновения бактерий в корневой волосок) в 20-ти полях зрения при 100-кратном увеличении. Отдельно проводилась фотосъёмка корней при 40-кратном увеличении (от 15 до 20 полей зрения на корень, в зависимости от длины и качества корня) для последующего подсчёта скрученных корневых волосков.

2.5. Компьютерный анализ данных

В работе применялись следующие программы и online-сервисы:

Программа MEGA v. 6, v.7 (<https://www.megasoftware.net/>) и online-сервисы Multalignment (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) и Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) применялись для множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Программа MEGA v. 6, v.7 и online-сервис EMBOSSTranseq (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>) применялись для трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* и построения филогенетических деревьев на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Утилита Primer Select из программного пакета DNASTar (<https://www.dnastar.com/>) и online-сервис Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) применялись для конструирования праймеров, использованных при амплификации различных фрагментов генов гороха и их последующего секвенирования.

Online-сервис NCBI BLAST использовался для поиска известных последовательностей внутри геномной вставки ВАС-клона Psa-B-Cam 446P4.

Online-сервис Promoter 2.0 Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) использовался для поиска возможного промотора гена *LykX*.

Программа SigmaStat 2.0 применялась для обработки данных при анализе количественных признаков у различных линий гороха, как то: количество клубеньков, образовавшихся при инокуляции теми или иными штаммами ризобий, уровень экспрессии генов, количество инфекционных событий, количество скрученных корневых волосков. Использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), Критерий Краскела-Уоллиса (ранговый ANOVA) или U-критерий Манна-Уитни (в случаях, когда данные не подчинялись нормальному распределению или объём выборки был слишком мал).

Программный пакет VectorNTI Advance 11 (Invitrogen, США) использовался для анализа данных секвенирования.

Для обработки данных секвенирования ВАС-вставки Psa-B-Cam 446P4 использовался алгоритм SPAdes 3.9.1 [Bankevich и др., 2012].

Глава 3. Результаты

3.1. Отбор новых генетических линий гороха, проявляющих признак «афганского» фенотипа

Одним из недостатков предыдущих работ, направленных на поиск гена *Sym2*, было использование ограниченного числа «афганских» линий с высокой генетической однородностью; к примеру, все они обладали одинаковым аллельным состоянием генов рецепторных киназ *Sym37* и *K1*. Это может быть связано с тем, что использованные линии являются близкими родственниками или даже потомками одной исходной генетической линии. Для увеличения размера выборки «афганских» линий из Коллекции зерновых бобовых культур ВИР (Санкт-Петербург) было заказано 124 образца гороха, происходящих из различных регионов Передней Азии (линии любезно предоставлены к.б.н. Е.В. Семёновой) (см. табл. 1 Приложения). В летний период 2011 года был поставлен полевой вегетационный опыт, призванный определить симбиотический фенотип данных образцов. Семена были высажены в сосуды с песком в двух вариантах и инокулированы либо *nodX*⁺ (A1), либо *nodX*⁻ (RCAM1026) штаммом ризобий. После четырёх недель вегетации для каждого образца проводилась визуальная качественная оценка клубенькообразования с *nodX*⁺ и *nodX*⁻ штаммом. По результатам опыта было отобрано 5 образцов, не образовавших клубеньки при взаимодействии с *nodX*⁻ штаммом RCAM1026, но продемонстрировавших нормальное клубенькообразование со штаммом A1 (табл. 6).

Таблица 6. Образцы из коллекции ВИР, не образовавшие клубеньки при инокуляции *nodX*⁻ штаммом ризобий

№ в каталоге ВИР	Кол-во клубеньков, образованных со штаммом <i>R. leguminosarum</i> RCAM1026 (<i>nodX</i> ⁻)	Кол-во клубеньков, образованных со штаммом <i>R. leguminosarum</i> A1 (<i>nodX</i> ⁺), $m \pm SD$	Место происхождения
К-1878	0	58,0 $\pm$ 5,8	Афганистан
К-3374	0	61,6 $\pm$ 7,9	Туркмения
К-3821	0	65,6 $\pm$ 4,9	Таджикистан
К-4901	0	50,8 $\pm$ 3,5	Узбекистан
К-6559	0	75,4 $\pm$ 8,9	Афганистан
К-6566	0	94,2 $\pm$ 6,2	Афганистан

3.1.1. Тест на аллелизм детерминант симбиотического фенотипа у новых и ранее известных «афганских» линий.

Чтобы доказать, что симбиотический фенотип образцов, отобранных из коллекции ВИР, определяется тем же генетическим детерминантом, что и у ранее известных «афганских» линий, был проведён тест на аллелизм. Семена F₁, полученные от скрещивания известных «афганских» линий с образцами ВИР, отобранными в вышеописанном вегетационном опыте, высаживали в сосуды со стерильным песком и инокулировали ризобиями штамма RCAM1026 (см. раздел 2.2). Наряду с гибридами в тех же условиях были посажены семена родительских линий. В каждый сосуд с гибридами дополнительно высаживалось два семени линии Finale (характеризуется «европейским» фенотипом) для подтверждения успешности инокуляции. Согласно гипотезе, симбиотические фенотипы гибридов и родительских линий не должны были различаться, если они обусловлены изменением последовательности одного и того же гена.

После 4-х недель вегетации у всех растений был произведён подсчёт образовавшихся клубеньков. Было показано, что гибриды F₁, как и растения

родительских линий, не образуют клубеньков при взаимодействии с *nodX* штаммом RCAM1026. В то же время растения линии Finale образовывали в этих условиях в среднем около 40 клубеньков на растение; см. табл. 7.

Таблица 7. Результаты теста на аллелизм детерминант симбиотического фенотипа у ранее известных «афганских» линий и образцов из коллекции ВИР

	1	2	3	4	5	Ср	К1	К2	СрК, m±SD
NGB2150	0	0	0	0	0	0	43	40	41,5±2,121
6047-2	0	0	0	0	0	0	17	49	33±22,627
К-1878	0	0	0	0	–	0	57	–	57
К-4901	0	0	0	0	0	0	36	41	38,5±3,536
К-6559	0	0	0	0	–	0	59	–	59
К-3374	0	0	0	0	0	0	51	–	51
К-3821	0	0	0	0	0	0	54	–	54
Гибриды F₁									
2150xК-6559	0	0	0	0	–	0	40	39	39,5±0,707
6047-2xК-6559	0	0	0	0	–	0	49	47	48±1,414
6047-2xК-1878	0	0	0	0	–	0	56	16	36±28,284
К-4901x6047-2	0	0	–	–	–	0	60	39	49,5±14,849
К-6559xК-1878	0	0	0	0	0	0	43	44	43,5±0,707
К-3821x2150	0	0	0	–	–	0	34	20	27±9,899
К-3374x2150	0	0	0	0	–	0	16	62	39±32,527

Пояснения к Таблице 7: цифры 1-5 в шапке таблицы обозначают номер растения в сосуде; К – контрольные растения линии Finale; Ср и СрК – средние значения образованных клубеньков для анализируемых и контрольных растений, соответственно.

Из результатов теста на аллелизм следует, что фенотип новых и ранее известных «афганских» линий гороха определяется одним и тем же генетическим детерминантом. Таким образом, нам удалось идентифицировать новые источники «афганской» аллели гена *Sym2*: образцы

К-1878, К-3374, К-3821, К-4901, К-6559 (далее 1878, 3374, 3821, 4901, 6559, соответственно). Выявленные образцы были включены в дальнейшую работу наряду с ранее известными линиями.

3.2. Обнаружение нового гена *LysM-RLK* гороха.

Ранее в работе, посвящённой исследованию генов *LysM-RLK* гороха, принимающих участие в рецепции Nod-фактора [Zhukov и др., 2008], был обнаружен фрагмент неизвестного гена, предположительно также кодирующего RLK. Данный фрагмент, обозначенный как *LykX* (от англ. *LysM kinase eXclusive*) [Sulima и др., 2017], был случайно амплифицирован у линии гороха Frisson с помощью специфичных праймеров, подобранных к последовательности первого экзона гена *K1*, в ходе ПЦР с более мягкими условиями. По-видимому, ген *K1* линии Frisson имеет уникальную нуклеотидную замену в сайте отжига одного из праймеров, и это воспрепятствовало его нормальной амплификации. Снижение температуры отжига привело к образованию продукта, соответствующего другому гену, не являющемуся *K1*, но похожему на него. Секвенирование показало, что на уровне первого экзона фрагмент *LykX* действительно демонстрирует высокое сходство с генами *K1* и *Sym37*, однако в последовательности интрона, следующего за этим экзоном, наблюдаются существенные отличия (рис. 6). Чтобы выяснить, соответствует ли положение гена *LykX* в геноме гороха ранее установленному положению *Sym2* [Kozik и др., 1996], был проведён косегрегационный анализ генов *LykX* и *Sym37* (ранее уже локализованного в регионе *Sym2*) на выборке F_2 (SGE Fix⁻¹×NGB1238), использовавшейся в лаборатории для картирования других симбиотических генов гороха. В пределах 40 проанализированных растений F_2 гены *LykX* и *Sym37* продемонстрировали полное сцепление друг с другом (табл. 8.), что согласуется с гипотезой о расположении *LykX* в районе локализации *Sym2*.

K1_2150	CATGTGAATGTATTGGAGGTGAGTTCTTAGGACATGTGTTTGAATATACAACAAAGAAAG	60
K1_Finale	CATGTGAATGTATTGGAGGTGAGTTCTTAGGACATGTGTTTGAATATACAACAAAGAAAG	60
LykX_Frisson	CATGTGACTGTATTGGAGGTGAATTTCTTGGGACATGTGTTTGAATACACAGCAAAATGAAA	60
Sym37_2150	CATGTGAATGTATTGGAGGTGAATTTCTTGGGCATGTGTTTGAATACACTGCAAAATGAAG	60
Sym37_Finale	CATGTGAATGTATTGGAGGTGAATTTCTTGGGCATGTGTTTGAATACACTGCAAAATGAAG	60

K1_2150	GAGATACTTATGATTTGATTGCAAATAATTATTATGTAAGTTTGACAACTGTTGAGCTTT	120
K1_Finale	GAGATACTTATGATTTGATTGCAAATAATTATTATGTAAGTTTGACTAGTGTGAGCTTT	120
LykX_Frisson	GAGATACTTATGATTTGATTGCAAATTTCTTATTATGCAAGTTTGACTTCAGTTCAAGTTT	120
Sym37_2150	GTGATACTTATGATTTAATTGCAAATACCTATTATGCAAGCTTAACAACCTGTTGAGGTTT	120
Sym37_Finale	GCGATACTTATGATTTAATTGCAAATACCTATTATGCAAGCTTAACAACCTGTTGAGGTTT	120

K1_2150	TGAAGAAGTTTAAACAGCTATGATCCAAATCATATACCTGCTAAGGCTAAGGTTAATGTTA	180
K1_Finale	TGAAGAAGTTTAAACAGCTATGATCCAAATCATATACCTGCTAAGGCTAAGGTTAATGTTA	180
LykX_Frisson	TGCAAAAGTTCAATAGTTATCATCCAAATCATATACCTGCTAAAGCTAAGGTTAATGTCA	180
Sym37_2150	TGAAAAAGTACAACAGCTATGATCCAAATCATATACCTGTCAAAGCTAAGGTTAATGTCA	180
Sym37_Finale	TGAAAAAGTACAACAGCTATGATCCAAATCATATACCTGTCAAAGCTAAGGTTAATGTCA	180

K1_2150	CTGTCAATTGTTCTTGTGGGAATAGCCAGATTTCAAAGATTATGGCTTGTGTTGTTACTT	240
K1_Finale	CTGTGAATTGTTCTTGTGGGAATAGCCAGATTTCAAAGATTATGGCTTGTGTTGTTACTT	240
LykX_Frisson	CTGTGAATTGTTCTTGTGGGAATAGCCAGATTTCAAAGGATTATGGCTTGTGTTGTTACTT	240
Sym37_2150	CTGTTAATTGTTCTTGTGGGAACAGCCAGATTTCAAAGACTATGGGCTATTTATCACCT	240
Sym37_Finale	CTGTTAATTGTTCTTGTGGGAACAGCCAGATTTCAAAGACTATGGGCTATTTATCACCT	240

K1_2150	ATCCGTTAAGGTCTACGGATTCTCTTGAGAAGATTGCGAACGAGTCGAAACTTGATGAAG	300
K1_Finale	ATCCGTTAAGGTCTACGGATTCTCTTGAGAAGATTGCGAACGAGTCGAAACTTGATGAAG	300
LykX_Frisson	ATCCGTTAAGGTCTACGGATTCTCTTGAAAAGATTGCGAACGCGTTAAACTTGATGAAG	300
Sym37_2150	ATCCACTTAGGCCTAGGGATACTCTTGAGAAGATTGCAAGACATTCTAAACTTGATGAAG	300
Sym37_Finale	ATCCACTTAGGCCTAGGGATACTCTTGAGAAGATTGCAAGACATTCTAATCTTGATGAAG	300

K1_2150	GTTTGATACAGAATTTCAACCCTGATGTCAATTTCAAGTAGAGGAAGTGGGATAGTGTTC	360
K1_Finale	GGTTGATACAGAATTTCAACCCTGATGTCAATTTCAAGTAGAGGAAGTGGGATAGTGTTC	360
LykX_Frisson	GGTTGATACAGAATTTCAATCCTGACGTCTATTTTCAGCAAAGGGAGTGGGATAGTGTTC	360
Sym37_2150	GAGTAATACAAAGTTACAATTTGGGTGTCAATTTCAAGCAAGGCAGCGGGGTAGTGTCT	360
Sym37_Finale	GAGTAATACAAAGTTACAATTTGGGTGTCAATTTCAAGCAAGGCAGCGGGGTAGTGTCT	360

K1_2150	TTCCAGGAAGAGGTATGAATGTTCT-----TTTCA--AAGTAT--ATAT-----	400
K1_Finale	TTCCAGGAAGAGGTATGAATGTTCT-----TTTCA--AAGTAT--AT-----	398
LykX_Frisson	TTCCAGGAAGAGGTATGAATTTTCTACTTTTCTCCATCAACTTTTCGATCTTCTGCTCAA	420
Sym37_2150	TTCCCGGAAGAGGTATGTATGTTTT-----TCTTCA-----TTCCACCA-----CC	402
Sym37_Finale	TTCCCGGAAGAGGTATGTATGTTTT-----TCTTCA-----TTCCACC-----CC	401

K1_2150	CTATG----GTATGAATTGTGACGGCTT-CGCTTAAAAGC-TATTTTAACTTTGCAGAT	454
K1_Finale	CTATG----GTATGAATTGTGACGACTT-CGCTTAAAAGT-TATTTTAACTTTGCAGAT	452
LykX_Frisson	CTGTGTTTGATACAAATGGTTGGATCTTACGCT--GACGCATGTGTCA--CTTACAGAT	476
Sym37_2150	CTTTGAT--GTACAGATCA-AAAGTATTGGGTATAAATATAT-CTGTTAG--AGTATAT	455
Sym37_Finale	CTTTGAT--GTACAGATCA-GAAGTATTGGGTATAAATATAT-CTGTTAG--AGTATAT	454

K1_2150	AAAAATGGAGAATATGTTTCCTTTGTATCCTA-AGTAAGTA--ACT--TTGATTATCTCAC	509
K1_Finale	AAAAATGGAGAATATGTTTCCTTTGTATCCTA-AGTAAGTA--ACT--TTGATTATCTCAC	507
LykX_Frisson	CAAAATGGACATTATGTTTCCTTTGTATCCTA-GTTGGTA--ACT--TTGAATGTCTCAC	531
Sym37_2150	TCAA-TG---AATAAATTACTCTACCAACTGCGATTGGCACAATGGTTGGGCATTCCAC	511
Sym37_Finale	TCAA-TG---AATAAATTACTCTACCAACTGCGATTGGCACAATGGTTGGGCATTCCAC	510

Рисунок 6. Сравнение последовательности **LykX_Frisson** с последовательностями генов **K1** и **Sym37** линий **NGB2150** и **Finale**. Чёрными прямоугольниками выделены последовательности, соответствующие экзонам.

Таблица 8. Косегрегация маркеров *Sym37* и *LykX*

№ растения	<i>Sym37</i>	<i>LykX</i>	№ растения	<i>Sym37</i>	<i>LykX</i>	№ растения	<i>Sym37</i>	<i>LykX</i>
1	A	A	14	C	C	27	C	C
2	C	C	15	C	C	28	A	A
3	C	C	16	A	A	29	B	B
4	A	A	17	C	C	30	A	A
5	A	A	18	C	C	31	C	C
6	B	B	19	A	A	32	B	B
7	A	A	20	A	A	33	A	A
8	C	C	21	B	B	34	A	A
9	B	B	22	C	C	35	C	C
10	C	C	23	C	C	36	C	C
11	A	A	24	C	C	37	C	C
12	C	C	25	C	C	38	C	C
13	B	B	26	C	C	39	B	B

Пояснения к Таблице 8: А – обозначение аллели, принадлежащей линии SGE Fix⁻¹; В – обозначение аллели, принадлежащей линии NGB1238; С – обозначение гетерозиготы.

Таким образом, полученные данные явились основанием для рассмотрения *LykX* в качестве нового перспективного кандидата на роль *Sym2*. Вместе с тем стало очевидно, что геномный регион *Sym2*, подобно синтенному региону *LYK1-LYK7* у люцерны слабоусечённой (*Medicago truncatula*), включает в себя несколько (по крайней мере, три) ортологичных генов LysM-RLK. Для установления полной последовательности гена *LykX*, а также вероятного обнаружения других генов-кандидатов на роль *Sym2*, было решено обратиться к скринингу ВАС-библиотеки гороха посевного.

3.3. Скрининг ВАС-библиотеки гороха посевного

ВАС-плазмида (от англ. Bacterial Artificial Chromosome – искусственная бактериальная хромосома) представляет собой вектор на основе F-плазмиды (плазмиды фертильности) *Escherichia coli*, содержащий крупную (150–350 kbp) вставку чужеродной ДНК [Shizuya, Kouros-Mehr, 2001]. Бактерия с внедрённой ВАС-плазмидой является саморегулирующейся системой амплификации, позволяющей поддерживать, нарабатывать и изучать фрагменты ДНК, клонированные в плазмиду. ВАС-библиотеки – это коллекции бактериальных клонов, несущих ВАС-плазмиды с фрагментами генома эукариотического организма.

В настоящее время скрининг геномных ВАС-библиотек с целью физического картирования, позиционного клонирования или геномного секвенирования для высших эукариот превратился в рутинную процедуру, ставшую доступной благодаря широкому распространению методов секвенирования «нового поколения» (англ. Next-Generation Sequencing, NGS). В данной работе использовалась геномная библиотека гороха посевного Psa-B-Cam, предоставляемая на платной основе Центром геномных ресурсов растений (French Plant Genomic Resource Center, INRA – CNRGV), Тулуза, Франция (см. раздел 2.3.8).

Для скрининга ВАС-библиотеки методом ПЦР в реальном времени были сконструированы пары праймеров к последовательностям генов *K1* и *Sym37*, а также к последовательности известного участка гена *LysX* (табл. 2 Приложения). Анализ каждой из этих пар праймеров указал на единственный ВАС-клон Psa-B-Cam 446P4, содержащий, таким образом, сразу три гена *LysM-RLK*.

Границы геномной вставки ВАС-клона Psa-B-Cam 446P4 были секвенированы с использованием стандартных праймеров T7 и M13rev. Сравнение полученных последовательностей с базой нуклеотидных последовательностей NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) по алгоритму BLASTN

позволило выявить, что с одной стороны вставка ограничена фрагментом крупного транспозона из семейства OGRE, а с другой – последовательностью гена *LysM-RLK* (после полного секвенирования вставки выяснилось, что она принадлежит гену *LykX*). Полное секвенирование геномной вставки клона Psa-B-Cam 446P4 осуществлялось в INRA – CNRGV на геномном секвенаторе GS Junior (Roche), работающем по принципу пиросеквенирования; в общей сложности было получено 11697 прочтений со средней длиной 500 bp. Первоначальная сборка, осуществлённая поставщиком услуги при помощи программы-ассемблера Newbler 2.6 (Roche), дала шесть контигов общей длиной около 120 000 bp. Для поиска известных последовательностей гороха посевного полученные контиги сравнивались с базой данных последовательностей гороха, доступной на сервере NCBI, по алгоритму BLASTN. Было выявлено наличие транспозонов, относящихся преимущественно к классам OGRE, Ty3-type, Ty1-like и Ty3/Gypsy-like, а также полных последовательностей трёх генов рецепторных киназ – *Sym37*, *K1* и *LykX*. Позже развитие инструментов биоинформатики позволило собрать «сырые» прочтения более качественно. С помощью алгоритма SPAdes 3.9.1 было получено три контига (рис. 7), покрывающих практически всю геномную вставку Psa-B-Cam 446P4. Последовательности контигов сейчас находятся в публичном доступе в базе данных NCBI под номером MF185734.

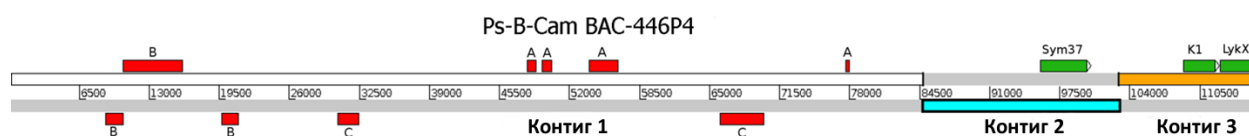


Рисунок 7. Геномная BAC-вставка Psa-B-Cam 446P4. Гены *Sym37*, *K1* и *LykX* обозначены зелёными прямоугольниками. Красные прямоугольники обозначают расположение мобильных генетических элементов: А – фрагменты транспозонов типа OGRE, В – фрагменты транспозонов типа Cyclops-2, С – фрагменты ретротранспозонов типа Ty3 (иллюстрация из Sulima *et al.*, 2017).

С помощью программы ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) была выявлена позиция наиболее вероятного стартового кодона гена *LykX*, а также определено отсутствие

преждевременных стоп-кодонов, препятствующих синтезу полноразмерного функционального продукта. Оказалось, что гены *K1* и *LukX* расположены очень близко друг к другу, и расстояние между стоп-кодоном *K1* и вероятным стартовым кодоном ATG гена *LukX* составляет всего 531 бп (по данным для линии гороха Caméog, использовавшейся для приготовления ВАС-библиотеки). Тем не менее, online-программа Promoter 2.0 Prediction Server показала возможность существования в пределах данной области функционального эукариотического промотора, позволяющего осуществлять экспрессию нижележащего гена. Позже последовательность, соответствующая кДНК *LukX*, была обнаружена среди данных нескольких транскриптомных сборок, полученных для азотфиксирующих клубеньков гороха [Alves-Carvalho и др., 2015; Sudheesh и др., 2015; Zhukov и др., 2015]. При этом в сборках транскриптомов, соответствующих другим тканям растения, последовательность *LukX* не обнаруживается.

Окончательное подтверждение факта наличия экспрессии гена *LukX* была получено с помощью метода количественной ПЦР. Для анализа использовался материал растений линии Frisson: боковые корни, собранные с неинокулированных растений возраста 2 недели; клубеньки, собранные на сроках 2, 4 и 6 недель после инокуляции штаммом ризобий RCAM1026; и листья, собранные с инокулированных и неинокулированных растений возраста 2 недели. Результаты представлены на рис. 8: видно, что сильнее всего *LukX* экспрессируется в неинокулированных корнях, в то время как в клубеньках уровень его экспрессии снижается до близких к нулю значений, немного повышаясь на сроке 4 недели. В надземной части растения (листья) транскрипция *LukX* практически не детектируется. Паттерн экспрессии, таким образом, указывает на вероятное участие гена *LukX* в ранних этапах установления клубенькового симбиоза.

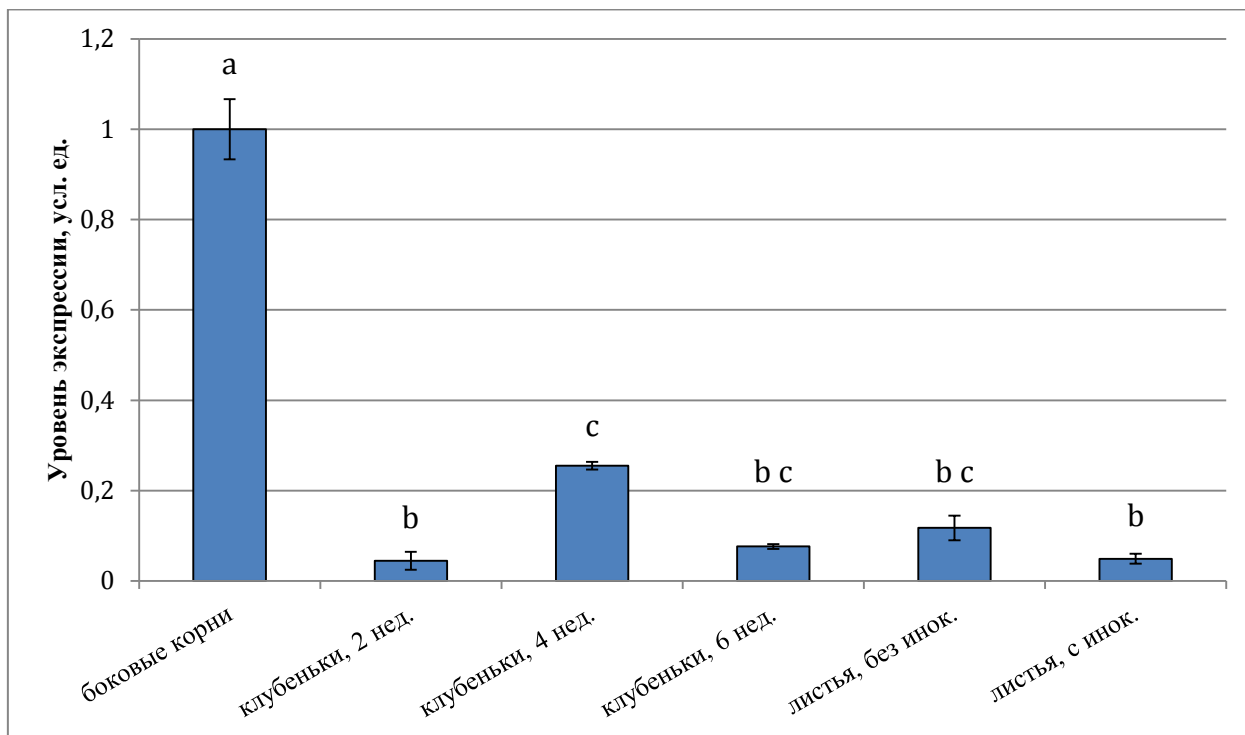


Рисунок 8. Экспрессия гена *LukX* в корнях, клубеньках и листьях гороха. Уровень экспрессии измерялся относительно референсных генов *GAPDH* и *Actin2*. Одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий в уровнях экспрессии (однофакторный ANOVA, $P < 0,05$). Интервалы показывают стандартное отклонение.

3.4. Описание нового гена гороха *LukX*, кодирующего LysM-RLK

Поскольку последовательности всех трёх генов LysM-RLK, находящихся в регионе *Sym2*, демонстрируют очевидное сходство между собой, вначале экзон-интронная структура гена *LukX* была размечена по аналогии с ранее установленными структурами генов *Sym37* и *K1*. На основе этой черновой разметки были сконструированы праймеры для амплификации последовательности *LukX* на кДНК линии Caméor. С помощью ПЦР и секвенирования удалось идентифицировать полную кодирующую последовательность гена *LukX*; 5'– и 3'– некодирующие области кДНК *LukX* были получены методом RACE-ПЦР. Сравнение кодирующей последовательности с последовательностью геномной копии, выявленной при секвенировании вставки ВАС-клона, позволило окончательно установить экзон-интронную структуру гена *LukX*, которая больше всего напоминает таковую у гена *Sym37*, с 12-ю экзонами и 11-ю интронами (рис 9, А). Полная

последовательность гена *LykX* линии Caméor депонирована в базу данных GenBank под номером MF135533.

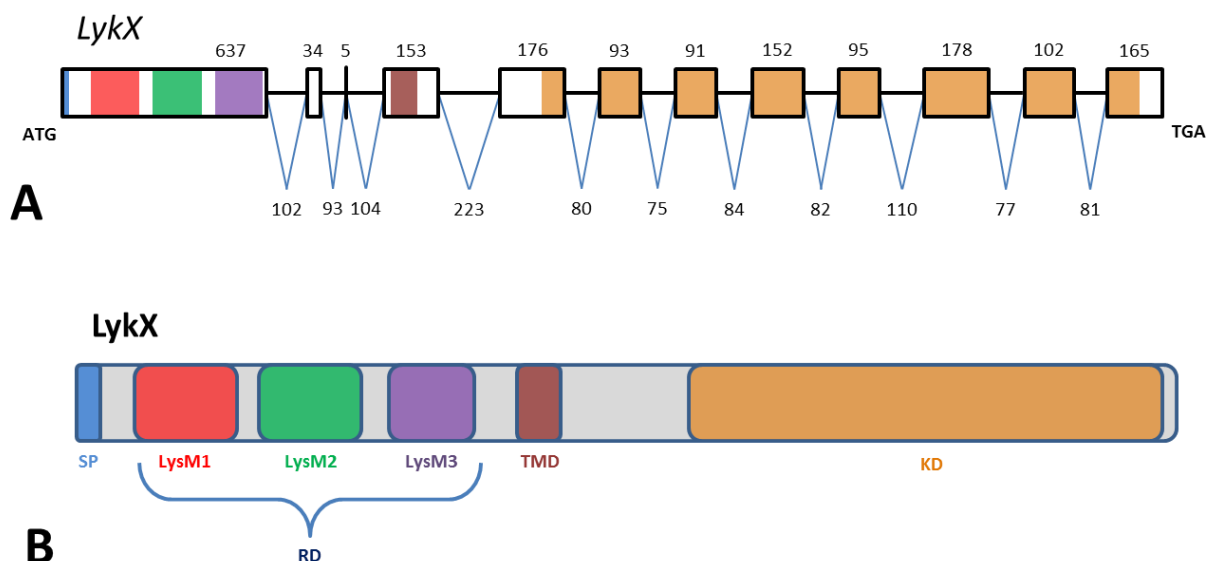


Рисунок 9. Экзон-интронная структура гена *LykX* (А) и доменная структура соответствующего ему белка (В). В части А экзоны обозначены прямоугольниками, интроны – отрезками. Цифрами указан размер участков в bp. Цвета соответствуют цветам белковых доменов в части В. SP – сигнальный пептид (signal peptide); LysM1-3 – LysM-модули рецепторного домена; RD – рецепторный домен (receptor domain); TMD – трансмембранный домен (transmembrane domain); KD – киназный домен (kinase domain) (иллюстрация из Sulima *et al.*, 2017).

Белок *LykX* состоит из рецепторного домена, включающего три т.н. LysM-модуля, трансмембранного домена и киназного домена (рис 9, В). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей *LykX* и LysM-RLK других организмов (в частности, киназ группы LYK *M. truncatula*) показало, что *LykX* обладает наибольшим сходством с белками *M. truncatula* LYK4, LYK1 и LYK5. При построении филогенетического древа по методу присоединения соседей (neighbor-joining) *LykX* и LYK4 попали в группу, отдельную от K1 и Sym37, которые, в свою очередь, оказались сгруппированными с LYK2 и LYK3 *M. truncatula* и NFR1 лядвеца японского *Lotus japonicus* (рис. 10). Интересно, что при независимом сравнении доменов рецепторная часть предполагаемого белка *LykX* продемонстрировала сходство с рецепторными частями симбиотических киназ *M. truncatula* и *L. japonicus*, в то время как киназный домен оказался

более похож на «несимбиотические» киназы, играющие роль в защитных реакциях растения (рис. 11). Возможно, функция гена *LykX* связана с активацией и/или подавлением механизмов, сходных с защитными реакциями растения в ответ на присутствие патогенов.

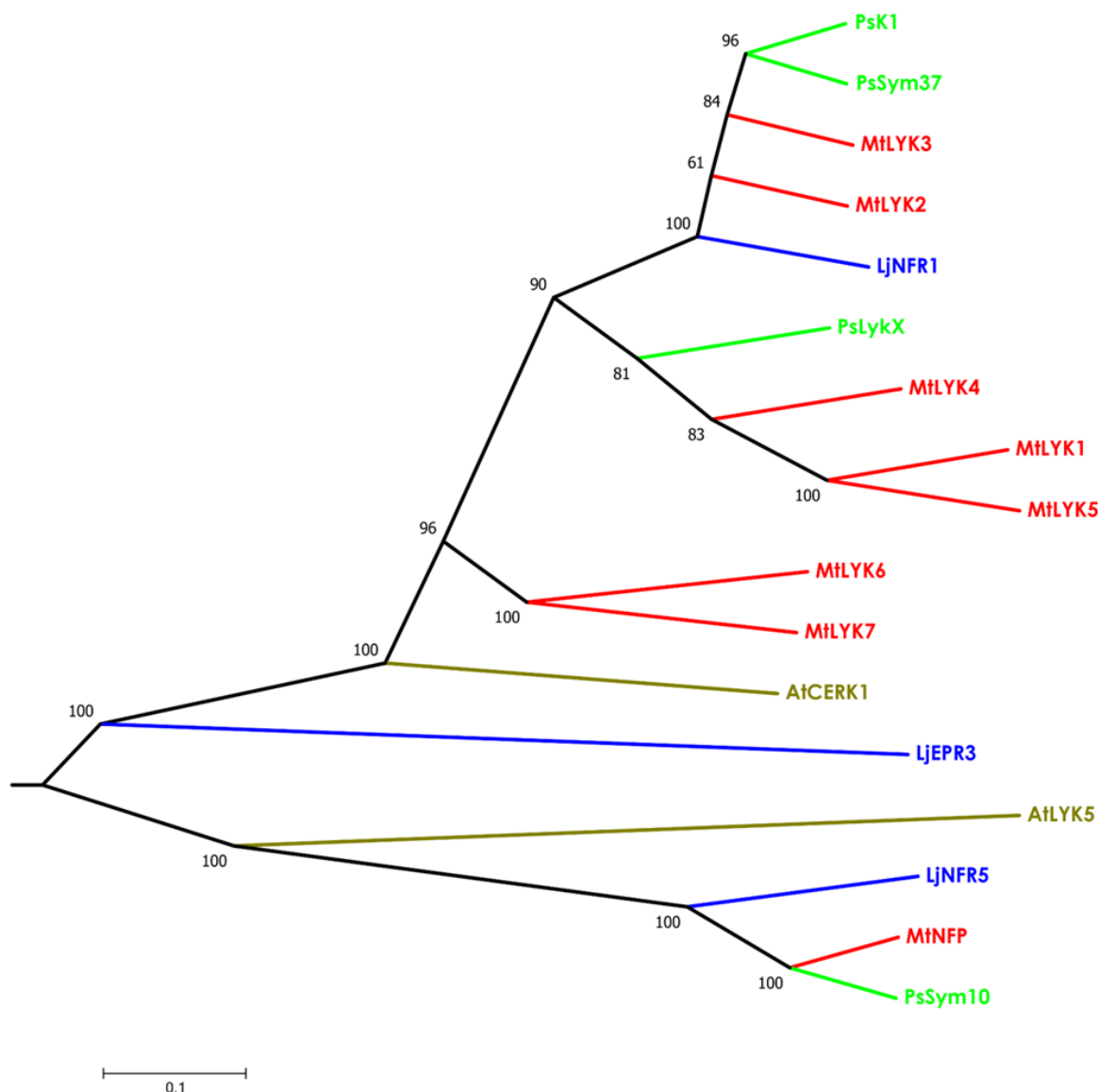
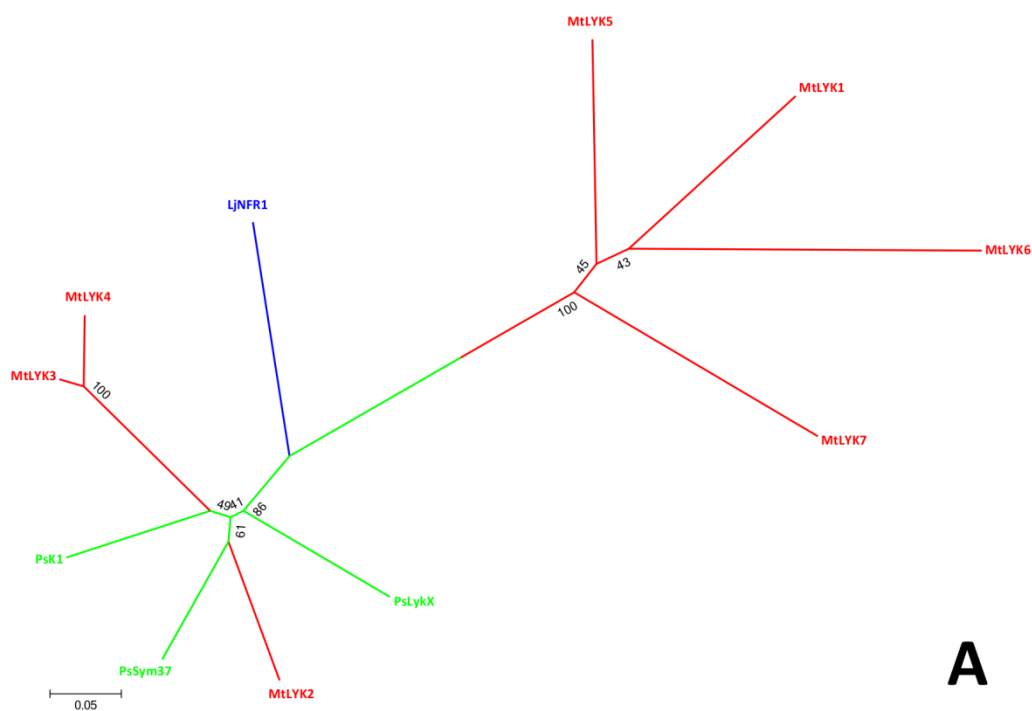
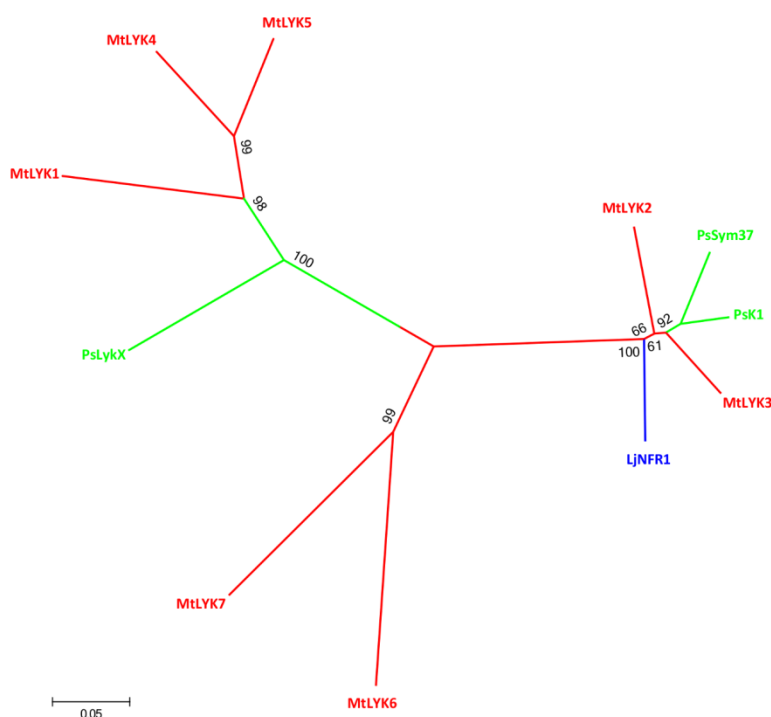


Рисунок 10. Филогенетическое древо, построенное по результатам сравнения полных аминокислотных последовательностей LysM-RLK гороха из региона *Sym2*, LysM-RLK из синтенного LYK-региона генома *M.truncatula* и гомологичных LysM-RLK *L.japonicus* и *Arabidopsis thaliana*. Цвета ветвей соответствуют: зелёный – гороху посевному (*Ps*), красный – *M.truncatula* (*Mt*), синий – *L.japonicus* (*Lj*), оливковый – *A.thaliana* (*At*). Древо построено по методу присоединения соседей (neighbor-joining), предполагая, что нуклеотидные замены подчиняются модели Джукса-Кантора. Бутстрэп проводился при 500 повторениях (иллюстрация из Sulima *et al.*, 2017).



A



B

Рисунок 11. Филогенетическое древо, построенное по результатам сравнения рецепторных (А) и киназных (В) доменов LysM-RLK гороха из региона *Sym2*, LysM-RLK из синтенного LYK-региона генома *M.truncatula* и гомологичных LysM-RLK *L.japonicus* и *Arabidopsis thaliana*. Для пояснений см. рис.10.

Дополнительно полная последовательность Psa-B-Cam 446P4 сравнивалась с LUK-регионом *M.truncatula* (MtGEA v. 3.0; <https://mtgea.noble.org/v3/>) по алгоритму BLAST. Было показано, что ген *Sym37* в целом действительно обладает наибольшим сходством с геном *LYK3* люцерны, в том числе на уровне вышележащего участка, предположительно содержащего промотор. При этом его экзоны 2, 3 и 6-8 также демонстрируют сходство с соответствующими экзонами *LYK2* (см. рис. 1 Приложения). Для *LukX* и *K1* паттерн сходства с генами люцерны оказался более мозаичным: так, у *K1* экзоны 6-8 и 10 похожи одновременно на соответствующие экзоны *LYK2* и *LYK3*, а экзон 9 похож исключительно на экзон 9 *LYK2*. Экзоны 6-8, 10 и 11 *LukX* похожи на соответствующие экзоны *LYK4*, однако наибольшим сходством с *LukX* на уровне семи экзонов (6-11) обладает транскрибируемая последовательность люцерны с неизвестной функцией, обозначенная Mtr.51442.1.S1_at, которая также находится в LUK-регионе (рис. 12). Важно отметить, что первый экзон (соответствующий рецепторному домену белка) продемонстрировал высокое единообразие (не ниже 80% сходства) как среди генов одного вида (гороха или люцерны), так и между генами разных видов.

Данные наблюдения подтвердили ранее установленную ортологию между *Sym37* и *LYK3* [Zhukov и др., 2008]. При этом для *K1* и *LukX* однозначно определить ортологи у люцерны оказалось невозможно. Таким образом, справедливо считать эти гены уникальными генами гороха.

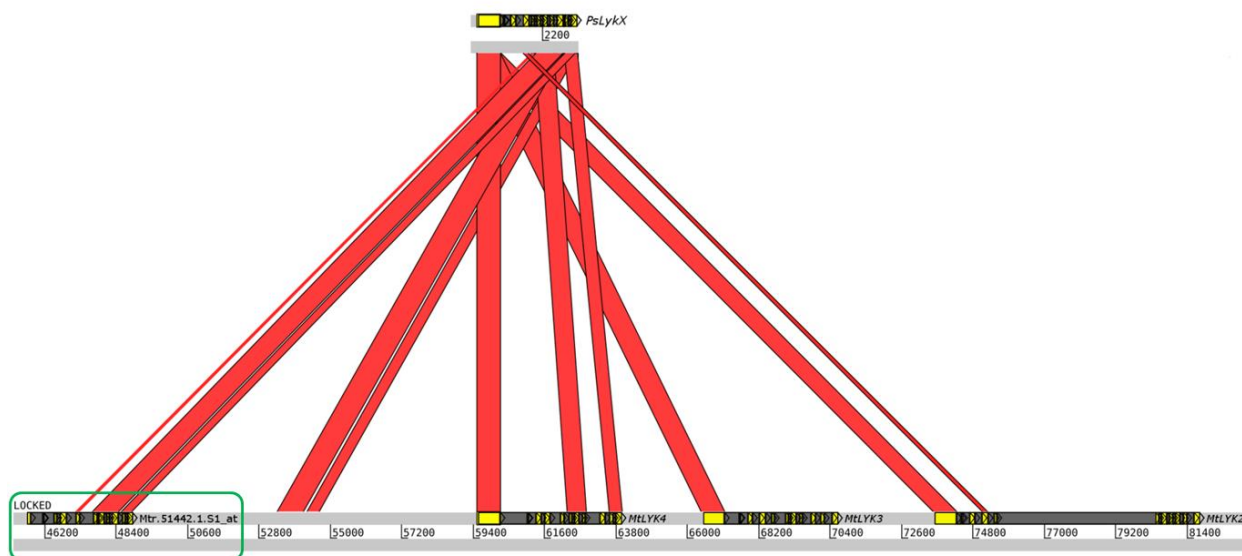


Рисунок 12. Сравнение последовательности гена *LykX* с последовательностью LYK-региона в геноме *M.truncatula*. Зелёной рамкой отмечена транскрибируемая последовательность Mtr.51442.1.S1_at, демонстрирующая наибольшее сходство с *LykX*.

3.4.1. Вариабельность первого экзона гена *LykX* коррелирует с проявлением специфичности симбиоза.

Согласно имеющейся гипотезе, нуклеотидные замены в гене *Sym2* у «афганских» разновидностей гороха приводят к изменению структуры кодируемого белка, которая отражается на его функции. Поскольку речь идёт о различных реакциях растения на структуру Nod-фактора, белок *Sym2*, скорее всего, участвует в непосредственном связывании бактериальной сигнальной молекулы и передаче сигнала нижележащим компонентам сигнального каскада, т.е. является симбиотической рецепторной киназой. В таком случае наиболее целесообразно искать значащие замены в участке, кодирующем рецепторный домен белка. У генов симбиотических LysM-RLK бобовых такой участок соответствует первому экзону.

Для проверки данной гипотезы последовательности первого экзона *LykX* были секвенированы у линий гороха с «афганским» фенотипом, а также у ряда линий с «европейским» фенотипом (не предъявляющих повышенных требований к структуре Nod-фактора), имеющих в коллекции лаборатории. В результате выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей

были обнаружены точковые замены, характерные исключительно для линий с «афганским» фенотипом (коррелирующие с проявлением «афганского» фенотипа). Подобной корреляции между аллельным состоянием и проявлением «афганского» фенотипа не было выявлено для генов *Sym37* и *K1*, рассматривавшихся в качестве кандидатов на роль *Sym2* прежде.

При добавлении в выборку «афганских» линий¹, отобранных в ходе полевого опыта 2011 г. (см. раздел 3.1), оказалось, что у двух из них первый экзон гена *LukX* несёт уникальные точковые замены, не характерные ни для «европейских», ни для других «афганских» линий (табл.9). Эти линии были названы «таджикскими», по месту происхождения линии 3821, которая была обнаружена первой.

¹ Поскольку во всех проведённых экспериментах образцы ВИР продемонстрировали гомозиготность по изучаемым генам, автор счёл возможным для удобства изложения называть их «линиями», имея, однако, в виду, что для них не проводилось целенаправленного выведения в чистую линию путём инцукта.

Таблица 9. 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

Пояснения к Таблице 9: 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).

Выявленные нуклеотидные замены приводят к замене одной (в случае «таджикских» линий) либо трёх (в случае остальных «афганских» линий) аминокислот на уровне кодируемого белка (табл.9). При этом у «таджикских» линий происходит замена R75P – аргинин замещается пролином, который характеризуется повышенной конформационной жёсткостью, способной оказывать существенное влияние 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 у гороха.

Таким образом, выяснилось, что в пределах линий гороха, проявляющих повышенные требования к структуре Nod-фактора, ген *LykX* принимает два

характерных аллельных состояния, отражающихся на аминокислотном составе кодируемого белка.

3.4.2. Исследование участка между генами *K1* и *LukX* у линий с разной специфичностью симбиоза.

Небольшой размер участка, разделяющего гены *K1* и *LukX*, натолкнул нас на мысль о вероятной ошибке сборки контига. Для подтверждения длины и последовательности данного участка он был амплифицирован и секвенирован с помощью праймеров, подобранных к 3'-концу гена *K1* (прямой) и 5'-концу гена *LukX* (обратный). При визуализации продуктов амплификации в агарозном геле оказалось, что у «афганских» линий данный участок заметно длиннее, чем у «таджикских» и «европейских». Секвенирование показало, что участок между стоп-кодоном *K1* и стартовым кодоном *LukX* обладает особенностями, уникальными для каждой из трёх групп – «афганской», «европейской» и «таджикской» (рис.13).

Наибольшую длину (748 bp) данный участок имеет у растений «афганской» группы. При этом он не несёт в себе никаких осмысленных последовательностей, за исключением фрагментов кДНК генов *K1* и *LukX*. У «европейских» линий длина данного участка меньше (531 bp); по-видимому, здесь имела место делеция центрального фрагмента. Наконец, у «таджикских» линий данный участок достигает в длину 592 bp и несёт в себе последовательности, похожие на последовательности из синтенного региона 5 хромосомы *M. truncatula* (по данным MtGEA v. 3.0). Важно отметить, что он существенно отличается от соответствующих участков «европейских» и «афганских» линий, которые, за исключением делеции у «европейских» линий, идентичны друг другу.

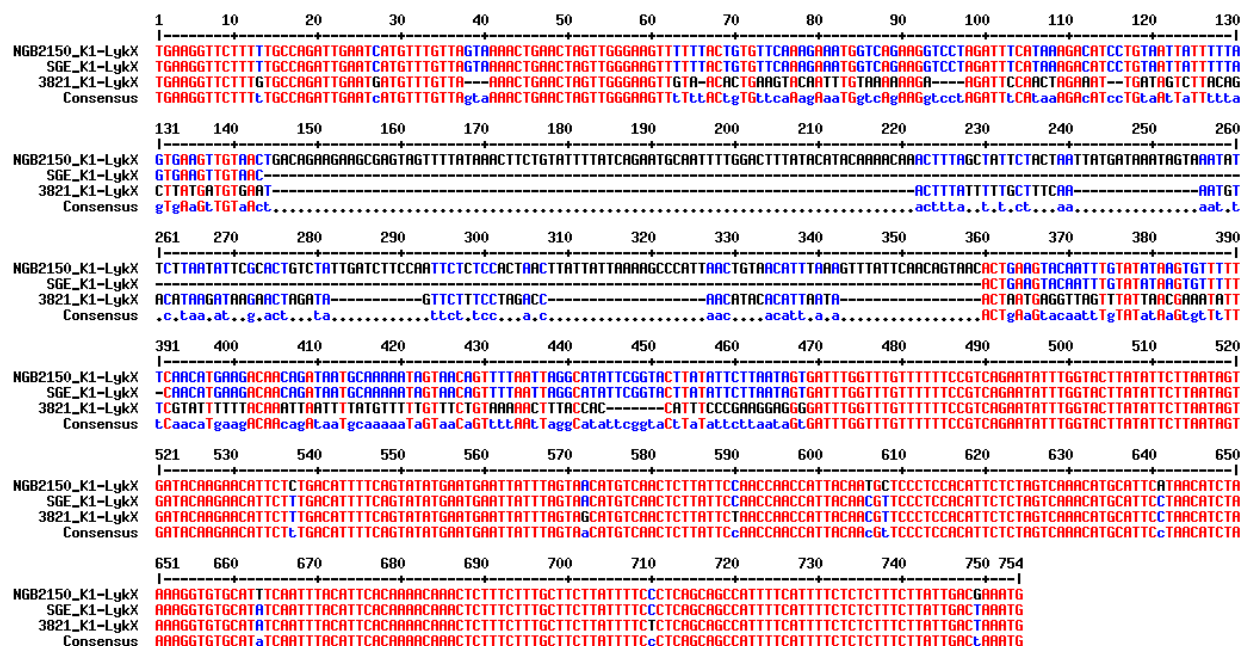


Рисунок 13. Выравнивание участков между стоп-кодоном гена *K1* (TGA) и стартовым кодоном гена *LykX* (ATG) у линий гороха с разной специфичностью симбиоза. NGB2150 – «афганская» линия, SGE – «европейская» линия, 3821 – «таджикская» линия.

Полученные данные свидетельствуют о том, что две группы с повышенной избирательностью к микросимбиоту – «афганская» и «таджикская» – сформировались независимо друг от друга. При этом неоднозначный характер данных, обусловленный, среди прочего, случайными гибридизационными событиями в ходе эволюции и распространения вида гороха посевной, не позволяет установить примерное время возникновения этих групп относительно друг друга и относительно широкоспецифичных «европейских» форм. Бесспорным является лишь то, что «европейскую» и «таджикскую» аллели *LykX* отличается друг от друга меньшее количество нуклеотидных замен, чем «европейскую» и «афганскую» (рис. 14); следовательно, «афганская» аллель может считаться более древней, чем «таджикская». Вопрос о том, какое аллельное состояние *LykX* (коррелирующее к широкой или узкой специфичностью симбиоза) следует считать первичным, пока остаётся открытым, однако секвенирование первого экзона *LykX* у двух диких родственников гороха посевного, *P. sativum* ssp. *elatius* WL2123 и *P. fulvum* 701, показало, что они обладают типичной «европейской» аллелью данного гена (табл. 9). Таким образом, признак

широкой «европейской» специфичности следует считать по крайней мере *не менее* древним, чем признак узкой специфичности, свойственный «афганским» и «таджикским» формам.

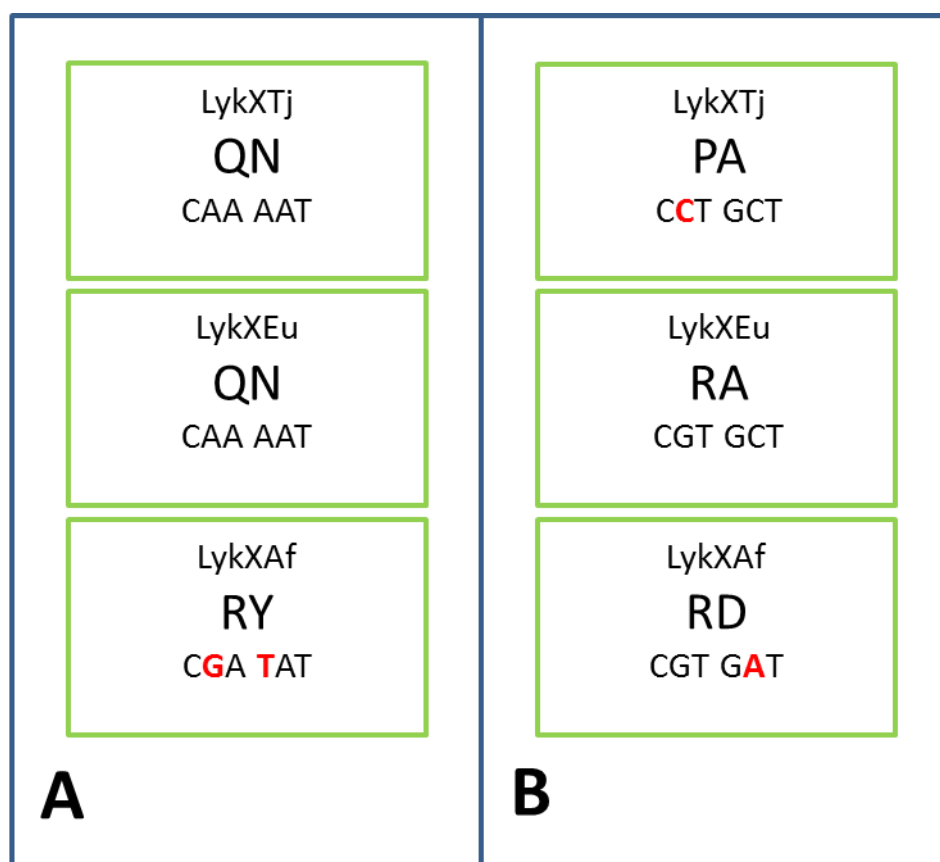


Рисунок 14. Аминокислотные замены, характерные для белка *LykX* линий гороха с разной специфичностью симбиоза, и соответствующие им кодоны. А – позиция LysM1 44-45, В – позиция LysM1 75-76. Eu – «европейский» вариант; Af – «афганский» вариант; Tj – «таджикский» вариант; красным цветом выделены нуклеотиды, приводящие к замене аминокислоты.

3.5. Поиск мутантов по гену *LykX* с применением метода TILLING.

Наличие аллельных состояний, чётко коррелирующих с проявлением повышенной избирательности к микросимбионту, стало веским доводом в пользу тождественности генов *LykX* и *Sym2*. Однако для установления функций гена *LykX* целесообразно было получить мутанты по данному гену и изучить их симбиотический фенотип. Для этого решено было обратиться к методу TILLING (англ. Targeting Induced Local Lesions in Genomes – поиск индуцированных локальных нарушений в геномах), в основе которого лежит принцип «обратной» генетики [Sulima, Zhukov, 2015]. Метод позволяет проводить поиск линий, несущих мутации в конкретном гене с известной

последовательностью (принцип «от генотипа к фенотипу»); таким образом, он идеально подходил для выполнения поставленной задачи. В работе была использована коллекция EMS-мутантов гороха посевной линии Caméog, доступная на коммерческой основе в Отделе изучения геномики растений (Unité de Recherche en Génomique Végétale) Национального института сельскохозяйственных исследований (INRA), Франция.

В качестве первого этапа работы в соответствии с рекомендациями поставщика услуги были сконструированы праймеры для ПЦР-амплификации целевых фрагментов гена и их последующего секвенирования на приборе Illumina. Поскольку известно, что EMS-мутагенез приводит к возникновению транзиций (замен С на Т и G на А) [Инге-Вечтомов, 2010], из всего набора сконструированных праймеров были отобраны те, что позволяли амплифицировать участки, содержащие наибольшее количество последовательностей вида CGA, CAG и CAA, мутация в которых способна привести к раннему образованию стоп-кодона (рис. 15). Оптимальные условия реакции для выбранных праймеров (4 пары) с добавлением на 5'-конце стандартного адаптера Illumina подбирались тестированием на геномной ДНК линии Caméog.

В результате скрининга коллекции были выявлены мутантные семьи, несущие мутации в последовательности гена *LukX*. Всего было обнаружено 23 мутации, три из которых находились в пределах интронов, а ещё три являлись синонимичными и не приводили к замене аминокислоты в последовательности белка (табл. 10). Вопреки ожиданиям, ни одна из обнаруженных мутаций не приводила к преждевременному образованию стоп-кодона.

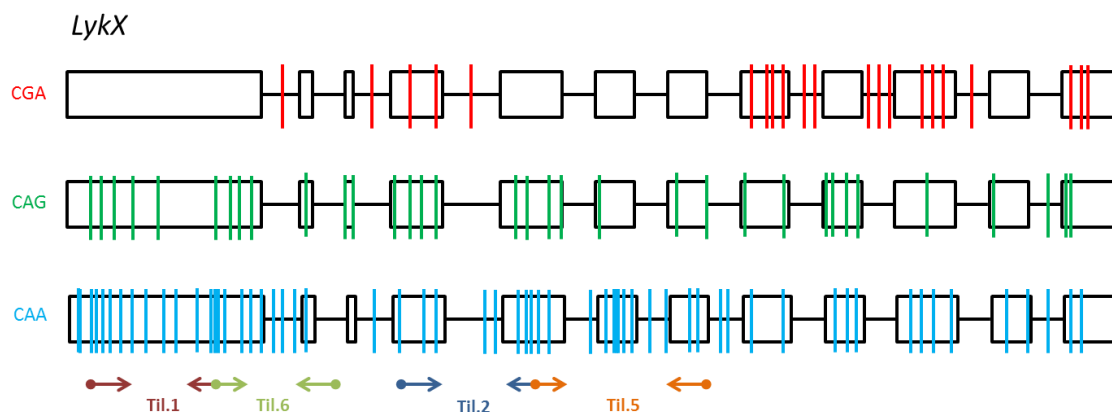


Рисунок 15. Подбор праймеров для поиска мутаций в гене *LykX* по методу TILLING. Последовательность гена *LykX* представлена схематично, как на рис. 8. Вертикальными линиями обозначены сайты CGA (красные), CAG (зелёные) и CAA (голубые). Пары праймеров (Ttl.1, Ttl.2, Ttl.5, Ttl.6) обозначены цветными стрелками внизу рисунка. Дополнительно см. табл.2 Приложения.

Таблица 10. Результаты поиска мутантов по гену *LykX* методом TILLING

	WT	Mut	Позиция, гДНК	Позиция, кДНК	Позиция, белок	Семья	Тип мутации	Прогноз SIFT
Ttl 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.	-
Ttl 2	G	A	1468	945	L315L	2266	синоним.	-
	C	T	1216	интрон	-	841	интронная	-
Ttl 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
Ttl 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

Пояснения к Таблице 10: в графе «Прогноз SIFT» указан предполагаемый эффект мутации на функцию кодируемого белка: вредный (damaging) или нейтральный (tolerated). В графе «Семья» жирным шрифтом выделены номера мутантных семей, вовлечённых в дальнейший анализ.

Для продолжения работы в URGV INRA были заказаны семена растений из 8 мутантных семей, мутации у которых, согласно предсказанию алгоритма SIFT [Kumar, Henikoff, Ng, 2009], с наибольшей вероятностью приводят к нарушению функции кодируемого белка. Дополнительным этапом работы стало выяснение аллельного состояния гена интереса (мутантная аллель, аллель дикого типа, или гетерозигота) у полученных растений. Для этого применялась ПЦР-амплификация нужного фрагмента гена с помощью тех же праймеров, что использовались для TILLING-скрининга, и последующее секвенирование амплифицированных фрагментов (в случае гетерозиготы на хроматограммах в сайте мутации наблюдался чёткий двойной пик; см. рис. 16). В результате выяснилось, что в мутантной семье 1480 ни одно из полученных растений не несет мутантную аллель гена *LukX* ни в гомо-, ни в гетерозиготном состоянии. Эта семья была исключена из дальнейшей работы. В каждой из оставшихся семей присутствовали растения, несущие мутантную аллель гена интереса в гомозиготном состоянии. Они были размножены для последующего анализа.

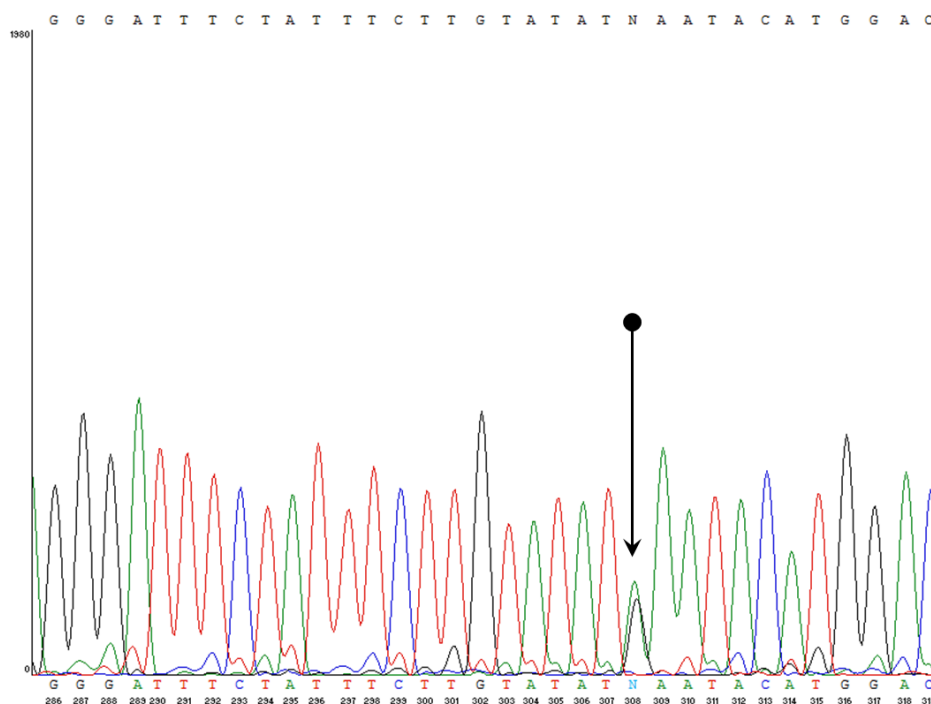


Рисунок 16. Пример гетерозиготы по гену *LukX* среди мутантов TILLING. Чёрная стрелка отмечает двойной пик в месте варибельного нуклеотида. Приведённая хроматограмма относится к растению линии 1362.

3.6. Описание симбиотического фенотипа мутантов *lykX*.

Среди растений всех мутантных семей наблюдались различные дефекты надземной части, как то: карликовость, хлороз, аномалии развития цветка и боба. Однако проявление данных признаков никак не коррелировало с аллельным состоянием гена интереса и было вызвано, по-видимому, другими мутациями, присутствующими в их геноме (известно, что при EMS-мутагенезе частота нуклеотидных замен составляет примерно 10 на ген, и каждое растение из M2 несёт примерно 720 мутаций на геном [Greene и др., 2003; Till и др., 2003]). Таким образом, ген *LykX*, вероятнее всего, не влияет на развитие надземной части растения.

Способность мутантов вступать в азотфиксирующий симбиоз была проверена при помощи инокуляции растений штаммом обычного микросимбионта гороха *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026, содержащим репортерный ген *gusA*, который контролирует синтез фермента β -глюкуронидазы (это было важно для дальнейших, более детальных исследований мутантного фенотипа). Подсчёт образованных клубеньков проводился на двух сроках – 2 и 4 недели после инокуляции; в качестве контроля использовались растения дикого типа линии Caméor.

Все мутанты *lykX* на обоих сроках продемонстрировали сниженное количество клубеньков по сравнению с диким типом, хотя выраженность различий варьировала в зависимости от конкретной мутантной семьи. При этом отдельные растения внутри мутантной семьи нередко демонстрировали значительный разброс количества образованных клубеньков (рис. 16, табл. 3 Приложения), в особенности на сроке 2 недели. Интересно, что клубеньки мутантных растений зачастую имели несколько верхушек («рогатый» фенотип), что было нехарактерно для клубеньков растений дикого типа. Подобный фенотип может наблюдаться в случае недостатка ризобий в почве или нарушений симбиоза, вызванных мутациями в растительных генах.

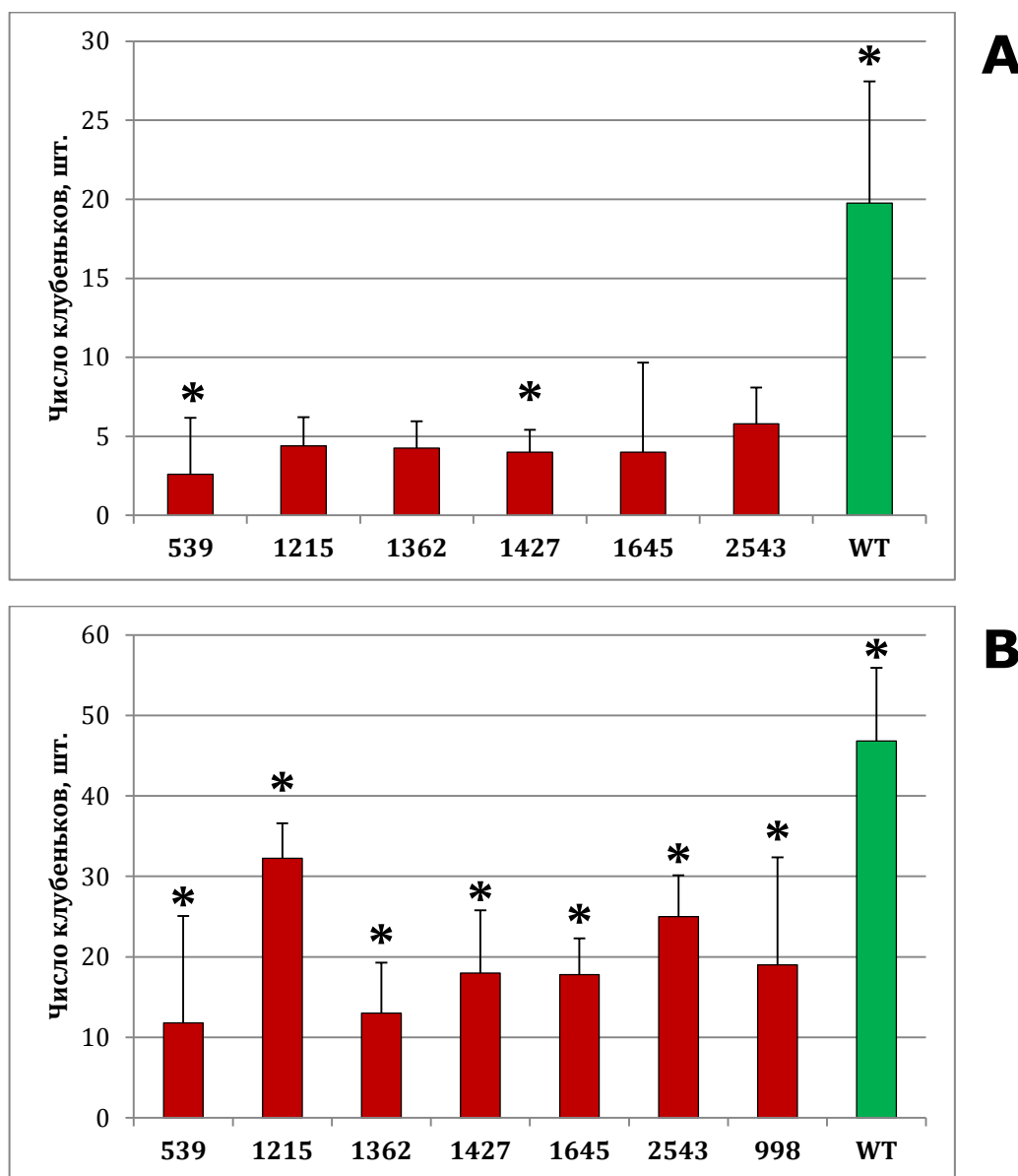


Рисунок 17. Количество клубеньков, образованных мутантами по гену *LysX* при инокуляции штаммом RCAM1026 на сроке 2 недели (A) и 4 недели (B). Интервалы показывают стандартное отклонение. На сроке 2 недели достоверны различия между диким типом (WT) и мутантами 539 и 1427 (ранговый ANOVA, $P < 0,05$). На сроке 4 недели различия между диким типом и каждым из мутантов статистически достоверны (однофакторный ANOVA, $P < 0,05$). Достоверные отличия отмечены звёздочками.

Микроскопический анализ фенотипа мутантов проводили на сроке 4 недели после инокуляции. Для проверки влияния мутации в гене *LysX* на самые ранние этапы развития симбиоза, предшествующие непосредственной инфекции, был произведён подсчёт скрученных корневых волосков у мутантов и растений дикого типа. Для каждого растения был сделан ряд фотоснимков поверхности корней при 40-кратном увеличении, по которым впоследствии и производился подсчёт. Далее для каждого из проанализированных растений определялось отношение общего количества

волосков, нормализованного по количеству полей зрения, к проценту скрученных волосков (рис. 18, табл. 4 Приложения). Из анализа следует, что четыре мутанта – 998, 1362, 1427 и 1215 – по относительному количеству скрученных волосков не отличаются от дикого типа, в то время как мутанты 2543, 539 и 1645 демонстрируют те или иные отличия от дикого типа по данному признаку. Так, линия 2543 характеризуется повышенным количеством корневых волосков при сниженном проценте скручивания. При этом у данной линии наблюдаются дефекты в самой морфологии корневых волосков: они зачастую укороченные и вздувшиеся на концах, напоминающие по форме теннисную ракетку (рис. 19). По-видимому, из-за этих дефектов волоски не способны нормально скручиваться, что, как будет показано ниже, отражается и на более поздних этапах симбиоза. Важно, что линия 998 имеет вызванную мутацией аминокислотную замену в том же сайте (A346) белка *LukX*, что и 2543 (см. табл. 10), но по количеству скручиваний корневых волосков не отличается от дикого типа. У линии 1645 повышено общее количество корневых волосков на фоне уменьшенной длины корней, при этом процент скручиваний такой же, как у дикого типа. Наконец, линия 539 демонстрирует увеличение и общего количества корневых волосков, и процента скручиваний по сравнению с диким типом. Данная линия также характеризуется выраженными дефектами надземной части, такими как карликовость и наследственный хлороз. Увеличение числа корневых волосков и повышенная восприимчивость к ризобиям могут быть проявлениями системной реакции, призванной компенсировать нарушения развития растения. Таким образом, справедливо говорить, что мутация в гене *LukX* не приводит к нарушению начальных этапов установления клубенькового симбиоза, а отличия некоторых мутантов *lukX* от дикого типа обусловлены присутствием в их геноме дополнительных мутаций, как и в случае с дефектами надземной части.

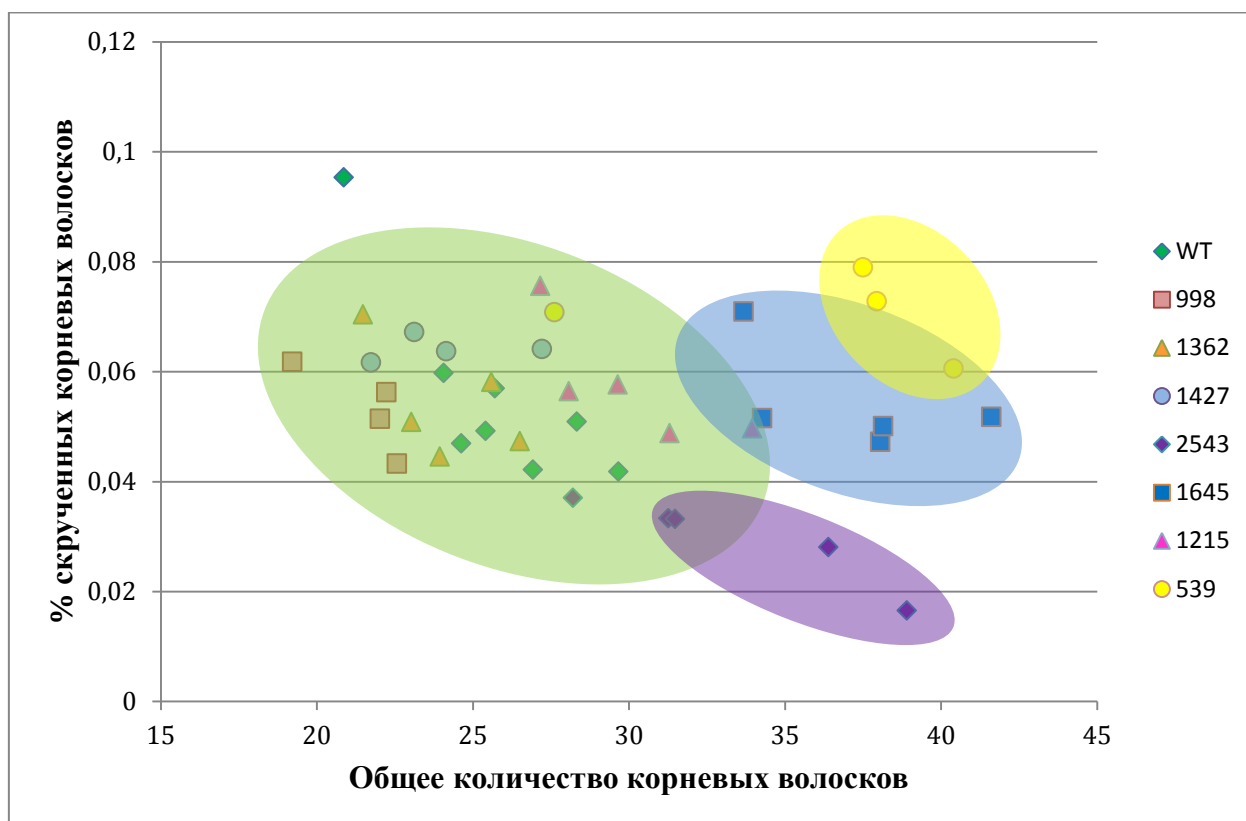


Рисунок 18. Соотношение общего количества корневых волосков к проценту (%) скрученных корневых волосков у мутантов по гену *LykX*. Пояснения см. в тексте и табл. 4 Приложения.

Далее для каждого мутанта подсчитывалось количество так называемых инфекционных событий – ранних этапов инфекции, начиная от образования микроколонии в изгибе скрученного корневого волоска и заканчивая проникновением инфекционной нити в клетки коры корня. При этом между стадиями не делалось различий из-за сложностей с интерпретацией изображения. Все мутанты *lykX*, за исключением 2543 (см. выше), продемонстрировали достоверно повышенное число инфекционных событий по сравнению с растениями дикого типа (рис. 20, табл. 5 Приложения). При этом у мутантов, в отличие от растений дикого типа, инфекционные события распределялись по длине корня неравномерно, зачастую образуя множественные скопления. Наблюдение структуры инфекционных нитей, производившееся при 100– и 200–кратном увеличении, позволило выявить многочисленные аномалии в их строении (утолщения, вздутия, «мешковидные структуры»), которые, по-видимому, отражали нарушение

нормального протекания бактериальной инфекции (рис. 21). При этом в тех случаях, когда нить развивалась нормально, инфекция приводила к формированию зрелых функциональных клубеньков.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что мутация в гене *LukX* не влияет на самые ранние этапы клубенькового симбиоза, предполагающих работу «рецепторов узнавания». В то же время характерные особенности фенотипа, общие для большинства мутантов, проявляются лишь на более поздних стадиях, во время которых подключаются «рецепторы проникновения», что полностью соответствует гипотезе о роли гена *Sym2* в клубеньковом симбиозе (рис. 22).

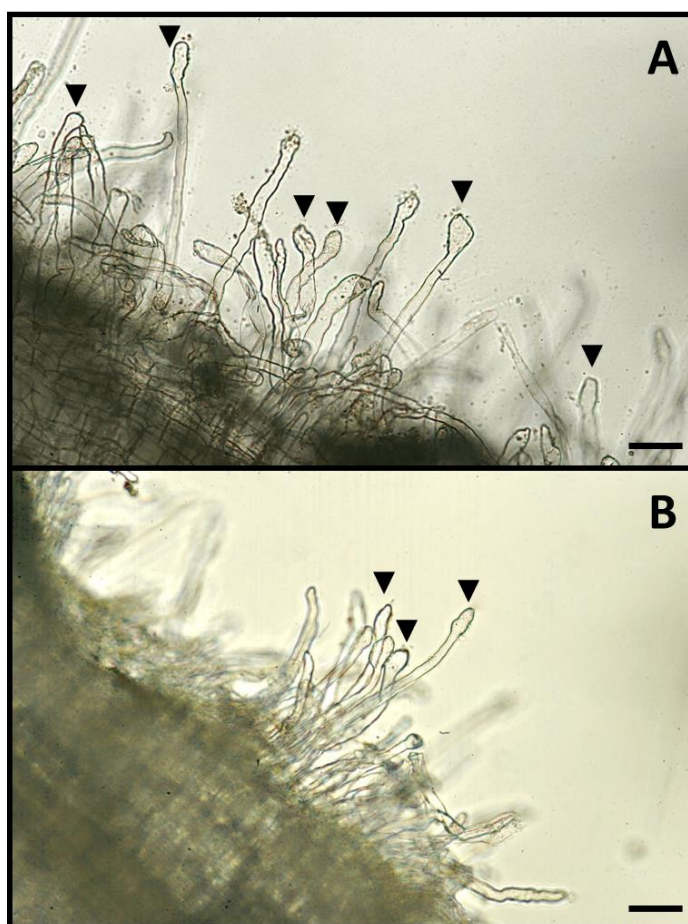


Рисунок 19. Нарушения морфологии корневых волосков у линии 2543. Чёрными стрелками отмечены вздутия на концах волосков. Линейка – 0,1 мм.

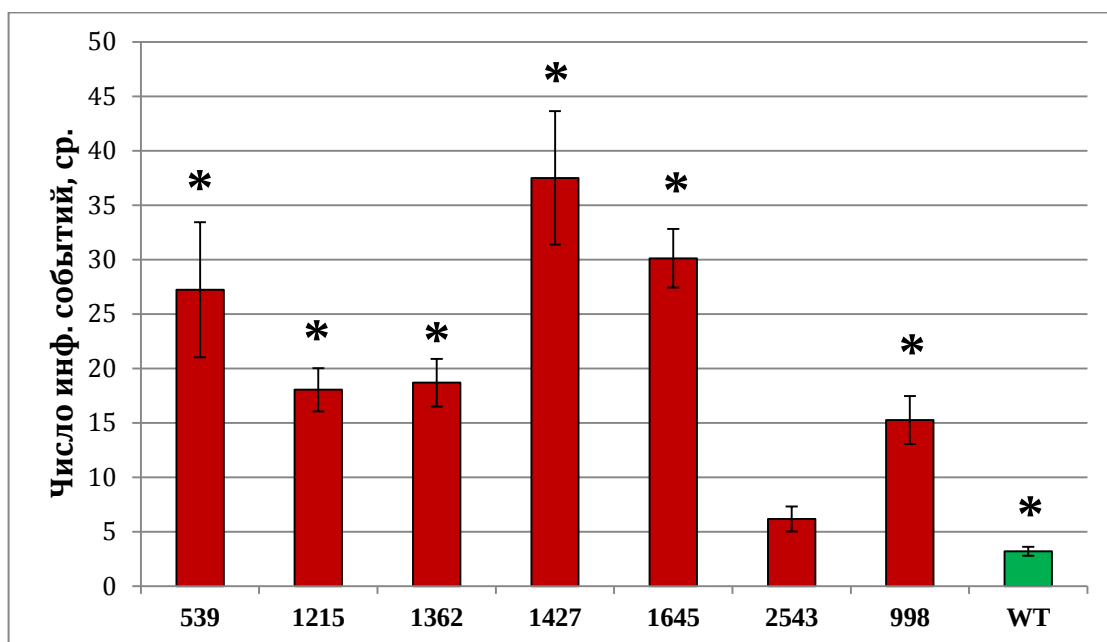


Рисунок 20. Количество инфекционных событий у мутантов по гену *LukX* по сравнению с диким типом (WT) на сроке 4 недели после инокуляции. Интервалы показывают стандартную ошибку. Различия достоверны между диким типом и всеми мутантами, за исключением 2543 (отмечено звёздочками) (ранговый ANOVA, $P < 0,05$)

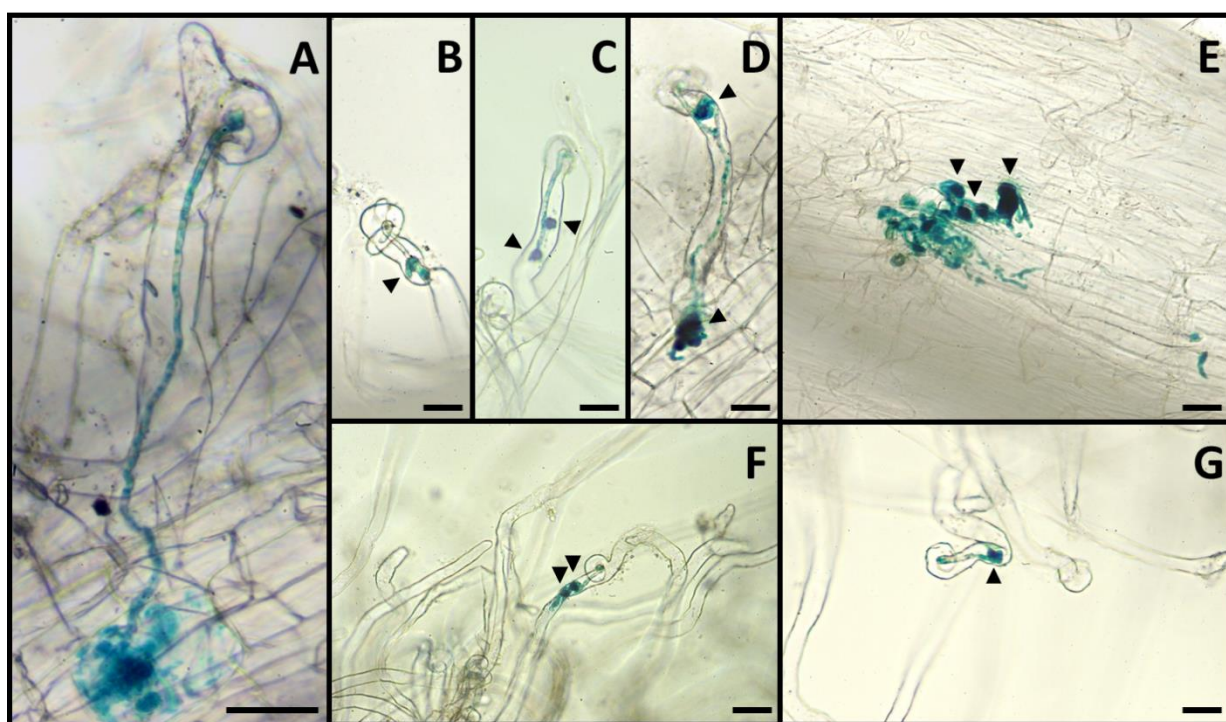


Рисунок 21. Аномалии развития инфекционных нитей (ИН) у мутантов по гену *LukX*. А – ИН дикого типа; В-Г – ИН мутантов. Чёрными стрелками отмечены утолщения и «мешковидные структуры» на инфекционных нитях. Линейка: А,В,С,Д,Ф,Г – 0,1 мм, Е – 0,05мм.

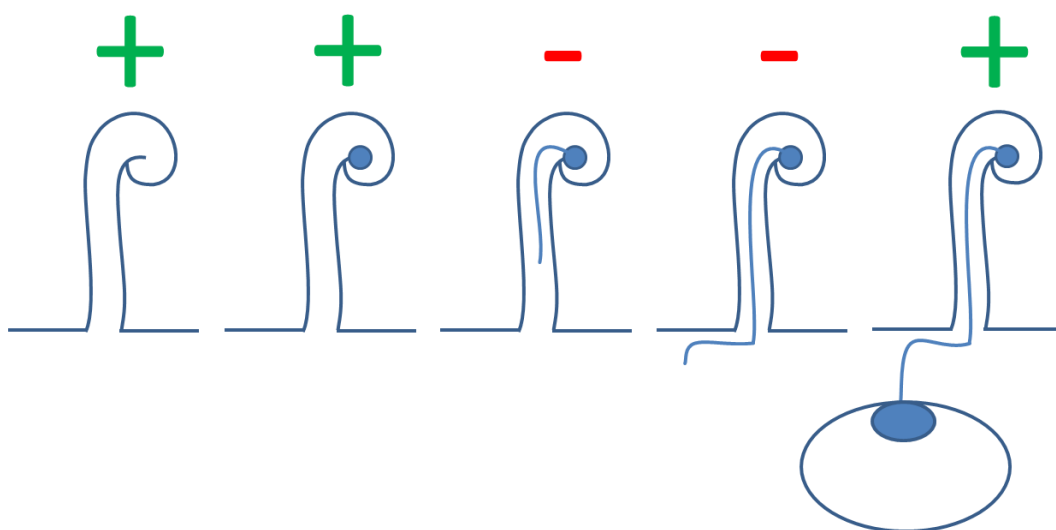


Рисунок 22. Схематичное изображение стадий развития симбиоза, нарушенных у мутантов по гену *LukX*. Знаком «+» отмечены стадии, протекающие нормально. Знаком «-» отмечены нарушенные стадии.

3.7. Тест на аллелизм индуцированной мутации в гене *LukX* и природных аллелей гена *Sym2*

Принимая во внимание трудоёмкость процедуры генетической трансформации гороха, а также его крайне низкую способность к регенерации, в качестве окончательного подтверждения роли гена *LukX* и его соответствия гену *Sym2* было решено провести комплементационный анализ выявленных мутантов с наиболее характерным фенотипом и растений, несущих различные аллели *LukX* дикого типа («европейскую», «афганскую» и «таджикскую»). Согласно выдвинутой гипотезе, в случае, если *LukX* действительно является геном *Sym2* и определяет специфичность симбиоза, гибриды F_1 , полученные от скрещивания растений с дефектным (мутантным) геном *lukX* и растений с высокоспецифичными «афганскими» или «таджикскими» аллелями *LukX*, должны были образовать сниженное количество клубеньков при взаимодействии с *nodX⁻* штаммом ризобий, в то время как у гибридов между мутантами и «европейскими» линиями ожидалось клубенькообразование, близкое к нормальному.

Для скрещивания была отобрана мутантная линия *lukX* 1645, продемонстрировавшая наиболее яркий фенотип (соотношение числа

инфекционных событий с числом образованных зрелых клубеньков) вкуче с высокой плодovitостью и жизнеспособностью. В качестве линии с «европейской» аллелью *LukX* была взята линия Caméog, являющаяся исходной для мутантов *lukX*. В качестве носителей «афганской» и «таджикской» аллелей были взяты линии NGB2150 и 3821, соответственно. Всего было получено 5 гибридных семян 1645xCaméog, 5 гибридных семян 1645x3821 и 11 гибридных семян 1645x2150. Клубенькообразование гибридов и исходных родительских линий проверялось в стандартном эксперименте, описанном в разделе 2.1.1, при инокуляции штаммом RCAM1026. Подсчёт образовавшихся клубеньков проводился на сроке 4 недели после инокуляции.

Растения линии Caméog образовали в среднем ($m \pm SD$) $49,3 \pm 14,0$ клубеньков, растения 1645 – $21,68 \pm 9,8$ клубеньков, а растения линий NGB2150 и 3821 – 0 клубеньков, что соответствовало выдвинутой гипотезе. Гибриды 1645xCaméog продемонстрировали нормальное клубенькообразование, достоверно не отличавшееся от клубенькообразования у линии Caméog. В то же время гибриды 1645x3821 и 1645x2150 образовали значительно сниженное число клубеньков, которое в большинстве случаев не превышало 10-ти штук на растение, а в среднем составляло $4,2 \pm 3,3$ и $4,9 \pm 4,2$ клубеньков, соответственно (рис.23). Таким образом, полученные данные подтверждают изначальную гипотезу о тождественности *Sym2* и *LukX*.

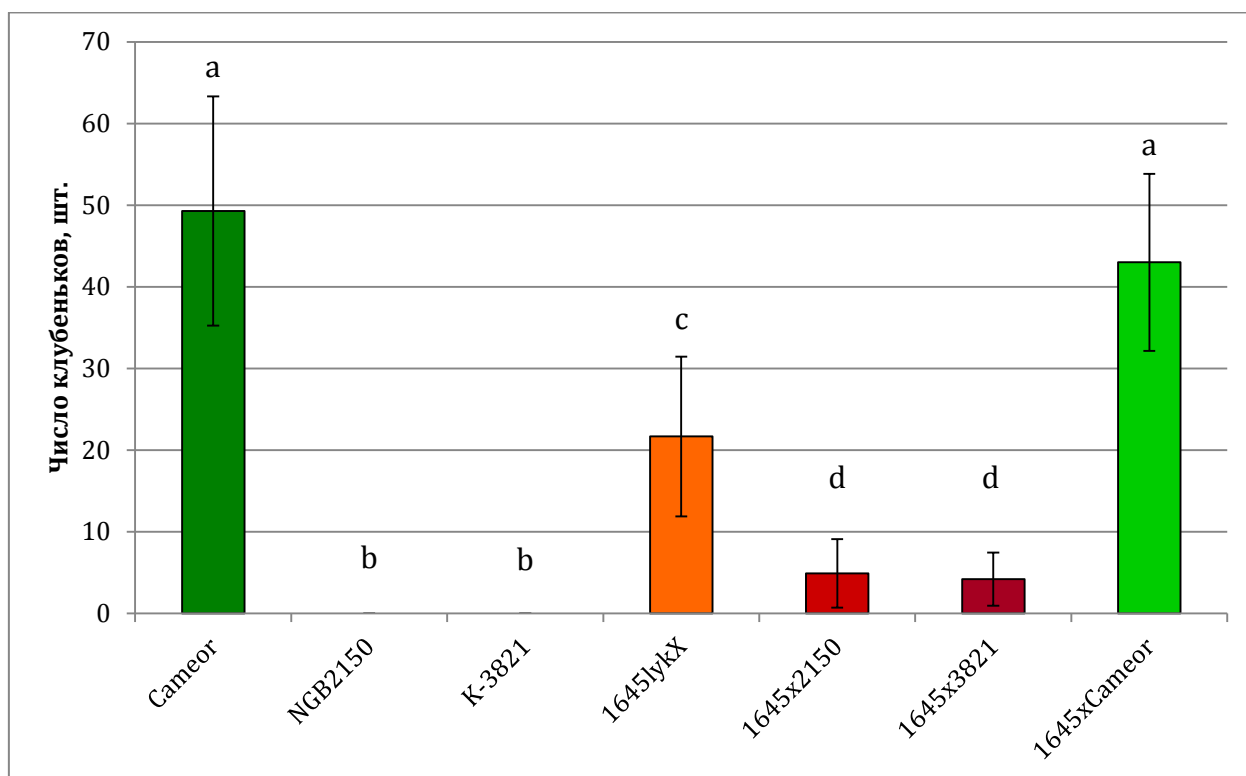


Рисунок 23. Результаты комплементационного анализа между линией гороха 1645, мутантной по гену *LykX*, и природными вариациями гороха, демонстрирующими различную специфичность симбиоза. NGB2150 – «афганская» линия; K-3821(3821) – «таджикская» линия; Cameor – «европейская» линия. Интервалы показывают стандартное отклонение. Одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий в уровнях экспрессии (ранговый ANOVA, $P < 0,05$).

3.8. Оценка полиморфизма первого экзона гена *LykX*

В рамках отдельного направления исследований последовательность первого экзона *LykX* (соответствующая рецепторному домену белка) была секвенирована на выборке линий гороха с разным географическим происхождением (см. табл. 6 Приложения). Наряду с *LykX* в этот анализ были включены и последовательности первых экзонов генов *Sym37* и *K1*.

Нуклеотидные последовательности выравнивали по алгоритму ClustalW, и на основе полученных результатов строили филогенетические деревья, представляющие гаплотипы исследованных генов (см. рис. 2-4 Приложения). Впоследствии эти гаплотипы были подтверждены сравнением соответствующих аминокислотных последовательностей (табл. 11). Оказалось, что из трёх генов *LykX* является наиболее полиморфным: в последовательности кодируемого белка обнаруживается 16 сайтов

полиморфизма, на основе которых вся выборка делится на 13 групп, причём 7 из них представлены уникальными последовательностями с дополнительными заменами; возможно, существуют и другие аллели *LukX*, не представленные в использованной выборке. При этом «афганские» аллели *LukX*, включённые в выборку, объединились в собственную отдельную гаплогруппу, а «таджикские» попали в уникальные гаплогруппы из-за наличия дополнительных замен. *Sym37*, напротив, оказался наименее изменчивым: по аминокислотной последовательности он подразделяется на шесть гаплотипов, объединённых в две большие группы. Интересно, что Ronghui Li с соавторами в работе 2011 года [Li и др., 2011] связали те же самые гаплогруппы со способностью гороха образовывать клубеньки со штаммами ризобий, дефектными по гену *nodE*, который влияет на структуру остатка жирной кислоты на нередуцирующем конце Nod-фактора.

Ген *K1* также разделяется на две основные группы гаплотипов, которые, учитывая недавно показанную важность этого гена для клубенькового симбиоза [Kirienko и др., 2018], также могут представлять изоформы рецепторов, различающиеся по аффинности к лиганду. По-видимому, столь сложная система переменных рецепторов нужна гороху для тонкой и своевременной подстройки под постоянно меняющихся микросимбионтов, отличающихся чрезвычайно лабильным геномом.

Таблица 11. Гаплотипы LysM-RLK гороха (по рецепторному домену)

K1																		
	13	31	38	45	46	48	49	50	55	61	65	81	90	104	105	124	181	
A1	F	L	V	P	T	K	N	Y	I	D	S	F	E	T	T	S	N	
A2	F	L	I	A	T	K	N	Y	I	D	S	F	D	T	T	T	N	
A3	F	L	V	P	T	K	N	Y	I	D	S	F	E	T	A	T	I	
A4	F	L	V/I	P	T	K	N/S	Y	I	N	S	F/S	E	I	T	S/T	N	
A5	F	L	V	P	T	K	N	Y	I	D	R	F	D	T	T	S	N	
B1	L	I	V	S	N	T	T	F	L	D	R	F	E	T	T	S	N	
B2	L	I	V	S	N	T	T	F	L	D	R	F	E	T	T	S	N	
K1 005	F	I	I	A	T	K	S	Y	I	D	S	F	E	T	T	T	I	158Q:R 172S:F
K1 019	F	I	V	S	N	T	T	F	I	D	R	F	E	T	T	T	K	
K1 074	F	L	V	P	T	K	N	Y	I	D	S	F	E	T	T	T	N	
K1 085	L	I	V	S	N	T	T	F	L	D	R	F	E	T	A	S	N	
K1 1238	L	I	V	S	N	T	T	F	L	D	R	F	E	T	T	T	N	
K1 2150	F	L	V	P	T	K	N	Y	I	D	S	S	E	T	T	T	N	
Sym37																		
	43	45	56	60	83	131	141	181	184	205								
A0	E	S	L	S	I	F	A	S	K	I								
A1	E	L	V	S	I	F	A	S	K	I								
A2	E	S	L	S	I	F	A	S	K	I								
B0	Q	S	V	F	V	Y	V/A	R	K	V								
B1	Q	S	V	F	V	Y	V	R	N	V								
Sym37 005	Q	S	V	S	I	F	A	R	K	V	26V:L							
LykX																		
	9	13	16	18	23	42	44	45	75	76	82	86	111	134	142	184		
A	L	L	V	F	K	L	Q	N	R	A	F	V	T	S	A	F		
B	F	V	V	F	K	K	Q	N	R	A	F	I	T	S	I	S		
C	L	L	F	S	K	K	Q	N	R	A	S	I	S	S	I	S		
D	L	V	F	F	K	K	Q	N	R	A	F	I	T	G	A	S		
E	L	L	F	S	K	K	Q	N	R	A	S	I	S	S	A	S		
F	L	L	V	F	K	K	R	Y	R	D	F	V	T	S	I	S		
LykX 039	L	L	V	F	K	K	Q	N	P	A	F	I	T	S	A	S	128V:F	
LykX 063	L	L	F	S	Q	K	Q	N	R	A	S	I	T	S	A	S	135H:D	
LykX 074	L	V	F	S	K	K	Q	N	R	A	S	I	T	S	I	S		
LykX 082	L	L	F	S	Q	K	Q	N	R	A	S	I	T	G	A	S	191I:M	
LykX 085	L	L	V	F	K	K	Q	N	P	A	F	I	T	S	I	S	5F:L183A:T	
LykX 089	L	L	F	S	K	K	Q	N	R	A	S	I	S	S	I	S		
LykX 093	L	L	V	F	K	L	Q	S	R	A	F	I	T	S	A	S		

Пояснения к Таблице 11: числа обозначают позицию аминокислоты в последовательности соответствующего белка. В левом столбце буквами обозначены группы гаплотипов, как показано на рис. 2-4 Приложения. Цвета обозначают функциональные части рецепторного домена (см. рис. 9B).

Глава 4. Обсуждение

Восприятие бактериального сигнала является одним из ключевых этапов установления клубенькового симбиоза, имеющим большую экологическую значимость. Данные, полученные на модельных объектах, свидетельствуют о наличии у бобовых растений сложной многокомпонентной системы рецепторов, работающих по принципу запирающих штифтов механического замка: симбиоз начнётся лишь в том случае, если все «бородки» бактериального «ключа» – особенности декора Nod-фактора – окажутся подходящими к конкретным рецепторам.

Горох посевной давно обратил на себя внимание исследователей уникальным свойством, выраженным в предъявлении повышенных требований к структуре сигнальной молекулы – так называемым «афганским» фенотипом. Интерес к этому феномену помог открыть принципы взаимодействия бобовых растений и ризобий, однако молекулярные основы самого «афганского» фенотипа долгое время оставались неизвестными. За время, прошедшее с момента описания гена *Sym2*, детерминанта «афганского» фенотипа, у гороха было обнаружено сразу несколько подходящих кандидатов на его роль. Все они действительно оказались вовлечены в рецепцию Nod-фактора, однако ни один из них не подтвердил своего влияния на «афганский» фенотип. Лишь сейчас, после обнаружения и описания нового гена рецепторной киназы *LykX*, можно с уверенностью говорить, что «неуловимый» ген *Sym2* наконец-то пойман.

Все данные, полученные к настоящему моменту, свидетельствуют в пользу того, что *LykX* – это действительно *Sym2*, при этом нет ни одного факта, противоречащего этой гипотезе. Потенциальным аргументом против может считаться отсутствие в киназном домене белка *LykX* так называемого YAQ-мотива, обязательного для симбиотических рецепторных киназ у лядвца (*Lotus japonicus*), однако у растений с недетерминированными клубеньками процесс установления симбиоза, видимо, протекает иначе, нежели у растений

с детерминированными клубеньками (к которым относится *L.japonicus*). На примере TILLING-мутантов показано, что продукт гена *LykX* принимает непосредственное участие в клубенькообразовании и работает именно на тех стадиях, где предполагается участие *Sym2*.

На основе собственных данных и результатов работы Li с коллегами [Li и др., 2011] в настоящей диссертации предложена модель, подразумевающая наличие у гороха сразу двух «поздних» рецепторов к Nod-фактору, – *Sym37* и *Sym2*, – которые взаимодействуют с противоположными концами молекулы, проявляя специфичность к соответствующему декору (рис. 24).

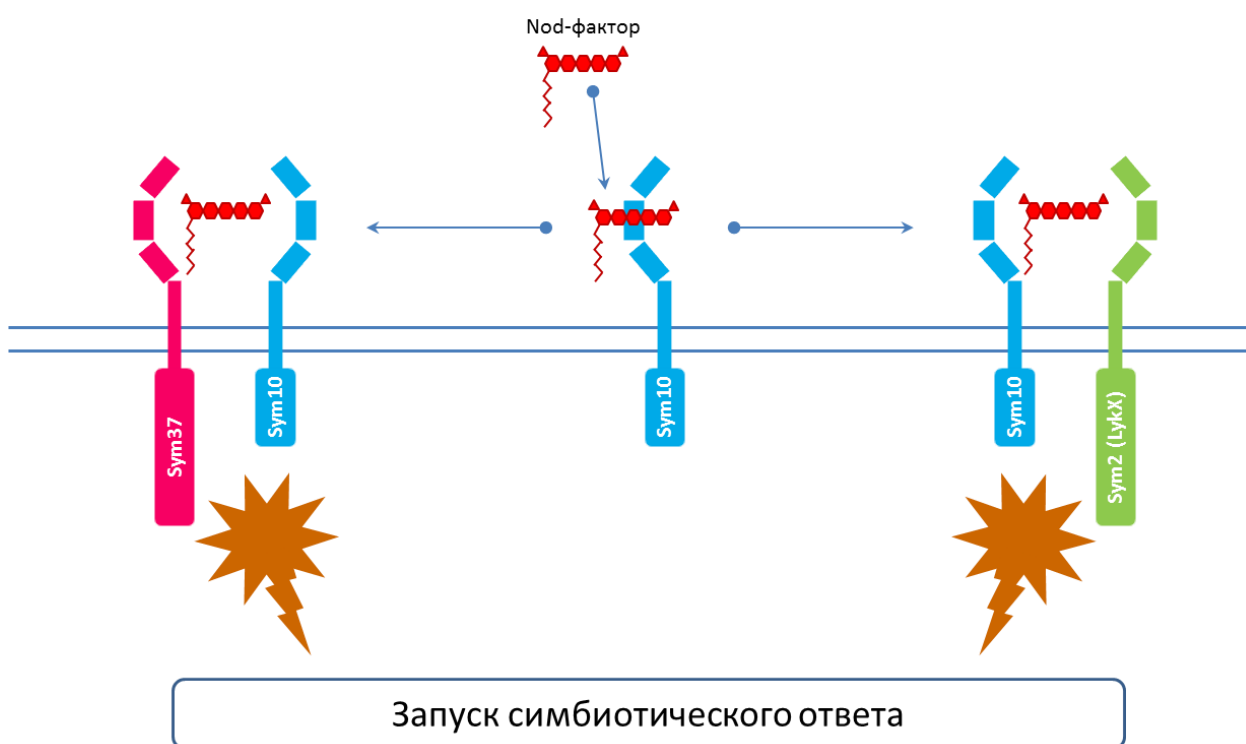


Рисунок 24. Гипотетическая модель распознавания структуры Nod-фактора рецепторными киназами гороха. На первом этапе низкоспецифичный рецептор (*Sym10*) связывается с Nod-фактором и заякоривает его на мембране. Затем Nod-фактор предьявляется рецепторам *Sym37* и *Sym2* (*LykX*), специфичные к структуре, соответственно, нередуцирующего и редуцирующего концов молекулы. Если и *Sym37*, и *Sym2* успешно свяжутся с Nod-фактором, активируются нижележащие компоненты симбиотического сигнального каскада.

У подавляющего большинства современных культурных сортов и разновидностей гороха, не обладающих «афганской» специфичностью, рецептор *Sym2* не распознаёт дополнительный декор редуцирующего конца молекулы, однако *Sym37* остаётся полностью функциональным, о чём

свидетельствует анализ его полиморфизма: всё выявленное разнообразие гаплотипов представляет собой варианты, связанные с особенностями восприятия структуры остатка жирной кислоты на нередуцирующем конце Nod-фактора. В связи с этим примечателен фенотип линии гороха RisNod4, мутантной по гену *Sym37*. Данная линия в норме характеризуется нарушенным клубенькообразованием, однако её фенотип может быть супрессирован штаммом, содержащим ген *nodX*. Не исключено, что мутация в *Sym37*, которая затрагивает рецепторный домен белка, изменяет его структуру таким образом, что он становится функциональной заменой *Sym2*.

Важно, что для *Sym37* у *Medicago truncatula* известен ортолог – *LYK3*, в то время как *LykX*, по-видимому, является уникальным геном гороха, не имеющим настоящего ортолога у *M. truncatula*. При этом анализ последовательности первого экзона генов *LykX* и *Sym37* на выборке из 90 генотипов гороха различного происхождения показал, что *LykX* весьма полиморфен. В работе Sulima et al., 2017 авторам удалось выявить 13 гаплотипов этого гена, один из которых соответствует «афганской» аллели, и ещё два обладают признаками «таджикской» аллели, но не попадают в единую группу из-за дополнительных замен. Изменчивость *LykX* может иметь значение для эволюции симбиотических систем гороха, особенно в свете новых взглядов на происхождение «афганского» фенотипа. До недавнего времени этот признак было принято считать примитивным, свойственным древним формам гороха или даже общим предкам гороха с другими бобовыми, однако в данной работе показано, что среди диких родственников гороха посевного, *Pisum fulvum* и *P. sativum* ssp. *elatius*, имеются формы с низкоспецифичной «европейской» аллелью гена *LykX*. Это даёт основания считать «афганский» фенотип продвинутым адаптивным признаком. Интересно, что «таджикская» аллель, очевидно, возникла из «европейской» независимо от «афганской» аллели, при замене нуклеотида в одном и том же участке гена *Sym2* (соответствующем первому LysM-модулю рецепторной части белка). Это может говорить о том, что *LykX* является

своего рода «геном запаса», который в норме подвержен нейтральной эволюции и не играет определяющей роли в установлении симбиоза, но при изменении условий (в частности, микробного окружения) может проявлять себя в качестве дополнительного фактора специфичности для более тонкой селекции симбиотических партнёров. Не исключено, что у гороха, равно как и у других бобовых, имеется несколько подобных генов: своеобразная «резервная обойма», реагирующая на стремительные изменения лабильного генома микросимбионтов. Данные гены должны оставаться функциональными, и при этом обладать потенциалом для увеличения специфичности симбиоза за счёт изменения структуры кодируемого белка. В зависимости от конкретных условий среды более выгодной для растения может оказаться как стратегия «ослабления бдительности» (например, если доступных бактерий в среде немного, а иных источников азота нет), так и повышение избирательности к потенциальному симбиотическому партнёру (в случае высокой конкуренции среди штаммов ризобий и наличия «симбиотических жуликов»). Возможно, что такие флуктуации специфичности возможно наблюдать даже «в реальном времени», благодаря свидетельствам действия отбора, сохранившимся в последовательностях ДНК растения. Так, высокая вариабельность «европейских» аллелей (не затрагивающая, меж тем, сайт, отличающий их от «афганских» и «таджикских») может свидетельствовать об отборе в пользу расширения специфичности. В то же время «афганские» аллели демонстрируют большее единообразие, что указывает на действие стабилизирующего отбора, сохраняющего возникшую когда-то высокоспецифичную симбиотическую систему. При этом отсутствие разнообразия среди «афганских» аллелей вкупе с их сильным отличием от более распространенных «европейских» говорит об эволюционной древности данного аллельного варианта, сохранившегося до наших дней в виде своеобразного реликта.

Заключение

Изучение молекулярных механизмов установления высокоинтегрированных эндосимбиозов между растениями и микроорганизмами не только вносит значительный вклад в фундаментальную науку, но также имеет неоспоримую практическую ценность. Так, способность бобовых растений вступать в эффективные симбиотические отношения с азотфиксирующими бактериями (ризобиями) активно используется в сельском хозяйстве для повышения урожайности многих ценных бобовых культур. В рамках перспективной концепции «адаптивного земледелия», предполагающей максимально полное использование микробиологического потенциала почв, исследователи всего мира активно изучают молекулярные механизмы генетической интеграции, лежащие в основе симбиозов между бобовыми растениями и ризобиями. Их усилия направлены, в частности, на создание высокоэффективных комплементарных пар симбионтов, а также переноса столь полезного свойства, коим является кооперация с бактериями-азотфиксаторами, на небобовые культуры, в особенности злаки.

Важным этапом на пути к этой амбициозной цели должно стать понимание процессов, лежащих в основе высокой специфичности бобово-ризобияльного симбиоза. В связи с этим весьма интересную модель представляют собой так называемые «афганские» формы гороха посевного, одной из наиболее распространённых и древних бобовых культур. Повышенная избирательность к микросимбионту, свойственная «афганским» линиям гороха, является уникальной среди бобовых, и потому для её изучения нельзя привлечь традиционные модельные объекты наподобие люцерны или лядвенца. При этом сам горох обладает рядом негативных свойств, и значительная часть современных методов молекулярной биологии и биоинформатики не оптимизирована для работы с ним. Во многом именно поэтому феномен «афганского» фенотипа, открытый более 80-ти лет назад и без преувеличения положивший начало всем дальнейшим исследованиям

механизмов бобово-ризобиального симбиоза, до сих пор оставался практически неизученным, а его молекулярные основы – неясными. Генетический детерминант данного признака, получивший название *Sym2*, фактически существовал лишь «на бумаге» – не было известно ни его нуклеотидной последовательности, ни функции кодируемого им белка. Хотя в середине 90-х годов *Sym2* был успешно картирован в группе сцепления I генома гороха, он продолжал ускользать от исследователей: регион его локализации оказался кластером ортологичных генов, обладающих сходной последовательностью, и предыдущие попытки выявить среди них гены-кандидаты на роль *Sym2* не увенчались успехом.

В данной работе вместо «точечного» подхода, нацеленного на выявление индивидуальных генов, для поиска *Sym2* решено было применить масштабные методы, такие как анализ природной изменчивости гороха с использованием материала генетических коллекций, скрининг ВАС-библиотеки генома гороха и TILLING мутантов по гену интереса. Это, среди прочего, позволило обойти трудности, вызванные отсутствием у гороха секвенированного генома и его низкой способностью к генетической трансформации. В результате в регионе локализации *Sym2* авторам удалось обнаружить новый ген *LykX*, который, как было показано в ходе его всестороннего изучения, обладает всеми свойствами, постулировавшимися для *Sym2*. В полном соответствии с ранее высказанными гипотезами, *LykX* относится к группе генов, кодирующих LysM-RLK – рецепторные киназы, играющие ключевую роль в восприятии симбиотических сигналов ризобий. Аллельные состояния, выявленные для *LykX*, чётко коррелируют с проявлением признака повышенной избирательности к ризобиям и приводят к аминокислотным заменам в функциональном домене кодируемого белка. Наконец, мутанты по этому гену, выявленные с помощью метода TILLING, обладают нарушениями именно тех стадий симбиоза, на которых проявляется «афганский» фенотип, а их гибриды с «афганскими» формами не восстанавливают нормальное клубенькообразование при взаимодействии с

ризобиями, не имеющими гена *nodX*. Принимая во внимание все полученные данные, правомерно говорить о тождественности *LykX* и *Sym2* – на сегодняшний день всё свидетельствует в пользу этой гипотезы, и сложно представить, что будет обнаружен другой ген, который подходил бы на роль *Sym2* лучше, чем *LykX*. Однако это вовсе не значит, что список рецепторов гороха к Nod-фактору перестанет пополняться. Уже сейчас очевидно, что система распознавания Nod-фактора у гороха устроена сложнее, чем у других известных бобовых, и включает в себя больше компонентов с различными функциями.

Изучение «афганских» форм может иметь большое значение и для понимания эволюции гороха. Впервые подобный признак был описан у горохов из Передней Азии во время экспедиций Н.И.Вавилова, который развернул в СССР широкомасштабную кампанию по сохранению генетических ресурсов культурных растений и их диких родственников. Регион Афганистана является одним из центров генетического разнообразия гороха, которые нередко совпадают с центрами окультуривания. Учитывая, что большая часть современного культурного гороха не обладает повышенной требовательностью к микросимбионту, «афганский» фенотип прежде считался примитивным признаком, присущим диким или даже предковым формам гороха, который оказался утраченным при интродукции гороха в регионы с иным составом почвенной микрофлоры. В связи с этим большой интерес представляет открытие так называемой «таджикской» группы линий, проявляющих повышенную специфичность симбиоза, сходную с «афганской», но обладающих другим аллельным состоянием гена *LykX*. Данные линии были обнаружены при работе с коллекцией ВИР, в которой поддерживаются образцы гороха, собранные на протяжении сотни лет, в том числе «местные сорта» (*landraces*) и дикие формы. Существование редких «таджикских» форм заставляет пересмотреть ранние представления об эволюции клубенькового симбиоза гороха в контексте его окультуривания и активного распространения по земному шару: по-видимому, узкая

специфичность симбиоза возникала у гороха неоднократно, разными путями и в разное время. Любопытно, что у представителей дикого подвида гороха *Pisum sativum* ssp. *elatius* и вида *P. fulvum* обнаружены «европейские» аллели *LykX*, что даёт основания считать повышенную специфичность «афганских» и «таджикских» форм гороха не примитивным, а, напротив, продвинутым признаком, имеющим важное адаптивное значение. Это подводит нас к более глобальной проблеме баланса симбиотических систем. Стремительная эволюция бактерий-симбионтов может быть направлена как в сторону увеличения эффективности взаимодействия с одним видом-хозяином, так и в сторону преодоления растительных механизмов специфичности с целью взаимодействия с максимально широким кругом хозяев (форма «симбиотического жульничества»). В зависимости от условий среды и пула доступных микросимбионтов для растения может быть выгодно как снижение, так и повышение избирательности к потенциальному симбиотическому партнёру. В то же время из-за мутаций в симбиотических генах растение может утратить способность взаимодействовать со своими обычными микросимбионтами. В подобной ситуации преимущество получают те бактерии, которые имеют механизмы преодоления блока клубенькообразования, например, за счет воздействия на растительные рецепторы, в норме не оказывающие заметного влияния на симбиоз. В результате возникает новая специфичная пара симбионтов, которая затем, попав в иные условия, может вновь утратить свою специфичность. В перспективе знания о динамике симбиотической системы и о ключевых факторах, оказывающих влияние на все её компоненты, могут помочь управлять клубеньковым симбиозом путём искусственного конструирования высококомплементарных пар симбионтов, эффективно осуществляющих процесс биологической азотфиксации.

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 *LukX* является новым геном LysM-RLK гороха, который расположен в непосредственной близости от ранее выявленных симбиотических генов *Sym37* и *K1* в регионе *Sym2*.
3. Ген *LukX* 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 *LukX* – «афганский» или «таджикский» – с несинонимичными заменами относительно распространённой «европейской» аллели.
5. Мутации в гене *LukX* приводят к нарушению клубенькового симбиоза на стадии проникновения бактерий в корневой волосок и не затрагивают более ранние и более поздние стадии.
6. На основании теста на аллелизм природных аллелей *Sym2*, определяющих узкую специфичность симбиоза, и индуцированной мутации в гене *LukX*, установлена тождественность генов *LukX* и *Sym2*.

Список литературы

1. Akiyama K., Matsuzaki K.I., Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi // *Nature*. 2005. T. 435. № 7043. С. 824–827.
2. Albrecht C., Geurts R., Bisseling T. Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet // *EMBO J*. 1999. T. 18. № 2. С. 281–288.
3. Alves-Carvalho S. и др. Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species // *Plant J*. 2015. T. 84. № 1. С. 1–19.
4. Andrews M., Andrews M.E. Specificity in legume-rhizobia symbioses // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. T. 18. № 4.
5. Ardourel M. и др. *Rhizobium meliloti* Lipooligosaccharide Nodulation Factors : Different Structural Requirements for Bacterial Entry into Target Root Hair Cells and Induction of Plant Symbiotic Developmental Responses // *Plant Cell*. 1994. T. 6. № October. С. 1357–1374.
6. Arrighi J.-F. The *Medicago truncatula* Lysine Motif-Receptor-Like Kinase Gene Family Includes NFP and New Nodule-Expressed Genes // *Plant Physiol*. 2006. T. 142. № 1. С. 265–279.
7. Artursson V., Finlay R.D., Jansson J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth // *Environ. Microbiol*. 2006. T. 8. № 1. С. 1–10.
8. Atkinson E.M. и др. Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1994. T. 91. № 18. С. 8418–8422.
9. Bankevich A. и др. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing // *J. Comput. Biol*. 2012. T. 19. № 5. С. 455–477.
10. Barea J.M. и др. Microbial co-operation in the rhizosphere // *J. Exp. Bot*. 2005. T. 56. № 417. С. 1761–1778.
11. Barker D.G. и др. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Plant Mol. Biol. Report*. 1990. T. 8. № 1. С. 40–49.
12. Bateman A., Bycroft M. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD) // *J. Mol. Biol*. 2000. T. 299. № 4. С. 1113–1119.

13. Bender G.L. The nodD1 gene from *Rhizobium* strain NGR234 is a key determinant in the extension of host range to the nonlegume *Parasponia* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1988. T. 1. C. 259–266.
14. Bensmihen S., Billy F. de, Gough C. Contribution of NFP LysM domains to the recognition of Nod factors during the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis // *PLoS One.* 2011. T. 6. № 11.
15. Besserer A. и др. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria // *PLoS Biol.* 2006. T. 4. № 7. C. 1239–1247.
16. Bethlenfalvay G.J., Brown M.S., Pacovsky R.S. Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: development of the host plant. // *Phytopathology.* 1982. T. 72. № 7. C. 889–893.
17. Bhardwaj D. и др. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity // *Microb. Cell Fact.* 2014. T. 13. № 1. C. 1–10.
18. Bhat R.A. и др. Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. T. 102. № 8. C. 3135–3140.
19. Bhattacharya D., Yoon H.S., Hackett J.D. Photosynthetic eukaryotes unite: Endosymbiosis connects the dots // *BioEssays.* 2004. T. 26. № 1. C. 50–60.
20. Bianciotto V. и др. ‘ *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* ’ gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi // 2003. № 2003. C. 121–124.
21. Bianciotto V. и др. Vertical Transmission of Endobacteria in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita* through Generation of Vegetative Spores // 2004. T. 70. № 6. C. 3600–3608.
22. Bonfante P., Anca I.-A. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions // *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. T. 63. № 1. C. 363–383.
23. Borisov A.Y. и др. The Sym35 Gene Required for Root Nodule Development in Pea Is an Ortholog of Nin from *Lotus japonicus* 1 // 2003. T. 131. № March. C. 1009–1017.
24. Borisov A.Y. и др. Pea (*Pisum sativum* L.) regulatory genes controlling development of nitrogen-fixing nodule and arbuscular mycorrhiza: fundamentals and application // *Biologia (Bratisl).* 2004. T. 59. C. 137–144.
25. Borisov A.Y. и др. Regulatory genes of garden pea (*Pisum sativum* L.) controlling the development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza: A review of basic and applied aspects // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2007. T. 43. № 3. C. 237–243.

26. Bougher N.L., Grove T.S., Malajczuk N. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply // *New Phytol.* 1990. T. 114. № 1. С. 77–85.
27. Brewin N.J. Development of the legume root nodule // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991. T. 7. № 1. С. 191–226.
28. Brewin N.J. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes // *The rhizobiaceae.* : Springer, 1998. С. 417–429.
29. Broghammer а. и др. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. T. 109. № 34. С. 13859–13864.
30. Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X. Keys to symbiotic harmony // *J. Bacteriol.* 2000. T. 182. № 20. С. 5641–5652.
31. Buendia L. и др. The LysM receptor-like kinase SLLYK10 regulates the arbuscular mycorrhizal symbiosis in tomato // *New Phytol.* 2016. T. 210. № 1. С. 184–195.
32. Buist G. и др. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans // *Mol. Microbiol.* 2008. T. 68. № 4. С. 838–847.
33. Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. Plant Genetic Control of Nodulation // *Annu. Rev. Microbiol.* 1991. T. 45. № 1. С. 345–382.
34. Camp R.O. Den и др. LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia* // *Science* (80-.). 2011. T. 331. № 6019. С. 909–912.
35. Capoen W. и др. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. T. 108. № 34. С. 14348–14353.
36. Carotenuto G. и др. The rice LysM receptor-like kinase OsCERK1 is required for the perception of short-chain chitin oligomers in arbuscular mycorrhizal signaling // *New Phytol.* 2017. T. 214. № 4. С. 1440–1446.
37. Catoira R. и др. Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway // *Plant Cell.* 2000. T. 12. № 9. С. 1647.
38. Celik I., Ortas I., Kilic S. Effects of compost, mycorrhiza, manure and fertilizer on some physical properties of a Chromoxerert soil // *Soil Tillage Res.* 2004. T. 78. № 1. С. 59–67.
39. Charpentier M., Oldroyd G. How close are we to nitrogen-fixing cereals? // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010. T. 13. № 5. С. 556–564.

40. Cheney K.L., Côté I.M. Mutualism or parasitism? The variable outcome of cleaning symbioses // *Biol. Lett.* 2005. T. 1. № 2. C. 162–165.
41. Compant S., Clément C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // *Soil Biol. Biochem.* 2010. T. 42. № 5. C. 669–678.
42. Czechowski T. и др. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2005. T. 139. № 1. C. 5–17.
43. Davis E.O., Evans I.J., Johnston A.W.B. Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas // *Mol. Gen. Genet. MGG.* 1988. T. 212. № 3. C. 531–535.
44. Delaux P.-M. и др. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. T. 112. № 43. C. 13390–13395.
45. Demont N. и др. Role of the *Rhizobium meliloti* *nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors // *J. Biol. Chem.* 1993. T. 268. № 27. C. 20134–20142.
46. Dénarié J., Debelle F., Promé J.-C. *Rhizobium* Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. T. 65. № 1. C. 503–535.
47. Djordjevic M.A. и др. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress *nod* gene expression in *Rhizobium trifolii* // *EMBO J.* 1987. T. 6. № 5. C. 1173–1179.
48. Dotzler N., Krings M., Taylor T.N. Germination shields in *Scutellospora* (*Glomeromycota* : *Diversisporales* , *Gigasporaceae*) from the 400 million-year-old Rhynie chert // 2006. C. 178–184.
49. Douglas A.E. *Symbiotic Interactions*: Oxford Science Publications. : Oxford University Press, Oxford, 1994.
50. Downie J.A. Legume nodulation // *Curr. Biol.* 2014. T. 24. № 5. C. R184–R190.
51. Downie J.A., Walker S.A. Plant responses to nodulation factors // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1999. T. 2. № 6. C. 483–489.
52. Edwards A. и др. Structural Implications of Mutations in the Pea *SYM8* Symbiosis Gene, the *DMI1* Ortholog, Encoding a Predicted Ion Channel // *Mol Plant Microbe Interact.* 2007. T. 20. № 10. C. 1183–1191.
53. Ehrhardt D.W. и др. In vitro sulfotransferase activity of *NodH*, a nodulation protein of *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation. // *J. Bacteriol.* 1995. T. 177. № 21. C. 6237–6245.

54. Endre G. и др. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development // *Nature*. 2002. Т. 417. № 6892. С. 962.
55. Ferguson B.J. и др. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. Т. 52. № 1. С. 61–76.
56. Ferriere R. и др. Cheating and the evolutionary stability of mutualisms // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2002. Т. 269. № 1493. С. 773–780.
57. Firmin J.L. и др. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants // *Nature*. 1986. Т. 324. № 6092. С. 90.
58. Firmin J.L. и др. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by nodX, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor // *Mol. Microbiol.* 1993. Т. 10. № 2. С. 351–360.
59. Fliegmann J. и др. Lipo-chitooligosaccharidic symbiotic signals are recognized by LysM receptor-like kinase LYR3 in the legume *Medicago truncatula* // *ACS Chem. Biol.* 2013. Т. 8. № 9. С. 1900–1906.
60. Fliegmann J. и др. LYR3, a high-affinity LCO-binding protein of *Medicago truncatula*, interacts with LYK3, a key symbiotic receptor // *FEBS Lett.* 2016. Т. 590. № 10. С. 1477–1487.
61. Franssen H.J. и др. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Plant Mol. Biol.* 1992. Т. 19. № 1. С. 89–107.
62. Franssen S.U. и др. Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing // *BMC Genomics*. 2011. Т. 12. № 1. С. 227.
63. Geremia R.A. и др. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. Т. 91. № 7. С. 2669–2673.
64. Geurts R. и др. Sym2 of Pea 1s Involved in a Nodulation Factor-Perception Mechanism That Controls the Infection Process in the Epidermis ' // 1997. С. 351–359.
65. Geurts R., Bisseling T. *Rhizobium* Nod factor perception and signalling // *Plant Cell*. 2002. Т. 14. № suppl 1. С. S239–S249.
66. Gianinazzi-Pearson V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. // *Plant Cell*. 1996. Т. 8. № 10. С. 1871.
67. Gleason C. и др. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition // *Nature*. 2006. Т. 441. № 7097. С. 1149–1152.

68. Gobbato E. и др. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling // *Curr. Biol.* 2012. Т. 22. № 23. С. 2236–2241.
69. Gobbato E. Recent developments in arbuscular mycorrhizal signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. Т. 26. С. 1–7.
70. Graham J.H., Drouillard D.L., Hodge N.C. Carbon economy of sour orange in response to different *Glomus* spp. // *Tree Physiol.* 1996. Т. 16. № 11–12. С. 1023–1029.
71. Granqvist E. и др. Buffering Capacity Explains Signal Variation in Symbiotic Calcium Oscillations // *Plant Physiol.* 2012. Т. 160. № 4. С. 2300–2310.
72. Greene E.A. и др. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis* // *Genetics*. 2003. Т. 164. № 2. С. 731–740.
73. Groth M. и др. NENA, a *Lotus japonicus* Homolog of Sec13, Is Required for Rhizodermal Infection by Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Rhizobia but Dispensable for Cortical Endosymbiotic Development // *Plant Cell Online*. 2010. Т. 22. № 7. С. 2509–2526.
74. Gutjahr C., Parniske M. Cell and Developmental Biology of Arbuscular Mycorrhiza Symbiosis // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2013. Т. 29. № 1. С. 593–617.
75. Hall K.J., Parker J.S., Ellis T.H. The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. I. Standard and translocation karyotypes. // *Genome*. 1997. Т. 40. № 5. С. 744–754.
76. Handberg K., Stougaard J. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics // *Plant J.* 1992. Т. 2. № 4. С. 487–496.
77. Haney C.H. и др. Symbiotic Rhizobia Bacteria Trigger a Change in Localization and Dynamics of the *Medicago truncatula* Receptor Kinase LYK3 // *Plant Cell*. 2011. Т. 23. № 7. С. 2774–2787.
78. Haney C.H., Long S.R. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Т. 107. № 1. С. 478–483.
79. Harrison M.J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: An underground association // *Trends Plant Sci.* 1997. Т. 2. № 2. С. 54–60.
80. Herre E.A. и др. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation // *Trends Ecol. Evol.* 1999. Т. 14. № 2. С. 49–53.
81. Hirsch A. Plant-microbe symbioses: a continuum from commensalism to parasitism // *Symbiosis*. 2004. Т. 37. № 1–3. С. 345–363.
82. Horváth B. и др. *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common

- symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses // Mol. plant-microbe Interact. 2011. T. 24. № 11. C. 1345–1358.
83. Imaizumi-Anraku H. и др. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots // Nature. 2005. T. 433. № 7025. C. 527.
84. Jacobsen E. Modification of symbiotic interaction of pea (*Pisum sativum* L .) and *Rhizobium leguminosarum* by induced mutations In pea , natural variability has been found for symbiotic performance // 1984. T. 8.
85. Jarsch I.K., Ott T. Perspectives on Remorin Proteins, Membrane Rafts, and Their Role During Plant–Microbe Interactions // Mol. Plant-Microbe Interact. 2011. T. 24. № 1. C. 7–12.
86. John M. и др. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1993. T. 90. № 2. C. 625–629.
87. Johnson N.C. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? // Ecol. Appl. 1993. T. 3. № 4. C. 749–757.
88. Jones M.D., Smith S.E. Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms? // Can. J. Bot. 2004. T. 82. № 8. C. 1089–1109.
89. Kaló P. и др. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators // Science (80-.). 2005. T. 308. № 5729. C. 1786–1789.
90. Kanamori N. и др. A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis // Proc. Natl. Acad. Sci. 2006. T. 103. № 2. C. 359–364.
91. Kelly S., Radutoiu S., Stougaard J. Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signalling // Curr. Opin. Plant Biol. 2017. T. 39. C. 152–158.
92. Kevei Z. и др. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase1 Interacts with NOR1 and Is Crucial for Nodulation in *Medicago truncatula* // Plant Cell Online. 2007. T. 19. № 12. C. 3974–3989.
93. Kiers E.T., Heijden M.G.A. Van Der. Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation // Ecology. 2006. T. 87. № 7. C. 1627–1636.
94. Kierszniowska S., Seiwert B., Schulze W.X. Definition of *Arabidopsis* Sterol-rich Membrane Microdomains by Differential Treatment with Methyl- β -cyclodextrin and Quantitative Proteomics // Mol. Cell. Proteomics. 2009. T. 8. № 4. C. 612–623.
95. Kirienko A.N. и др. Role of a receptor-like kinase K1 in pea *Rhizobium* symbiosis development // Planta. 2018. № 0123456789.

96. Kistner C., Parniske M. <Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis.pdf> // 2002. T. 7. № 11. C. 511–518.
97. Koide R. The nature of growth depressions in sunflower caused by vesicular–arbuscular mycorrhizal infection // *New Phytol.* 1985. T. 99. № 3. C. 449–462.
98. Kozik A. и др. Pea lines carrying *sym1* or *sym2* can be nodulated by *Rhizobium* strains containing *nodX*; *sym1* and *sym2* are allelic // *Plant Sci.* 1995. T. 108. № 1. C. 41–49.
99. Kozik A. Fine mapping of the *sym2* locus of pea linkage group 1 // 1996.
100. Kozik A. и др. The pea early nodulin gene *PsENOD7* maps in the region of linkage group I containing *sym2* and leghaemoglobin // *Plant Mol. Biol.* 1996. T. 31. № 1. C. 149–156.
101. Krusell L. и др. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase // *Nature*. 2002. T. 420. № 6914. C. 422–426.
102. Kulaeva O.A. и др. Pea Marker Database (PMD) – A new online database combining known pea (*Pisum sativum* L.) gene-based markers // *PLoS One*. 2017. T. 12. № 10. C. 1–16.
103. Kumar P., Henikoff S., Ng P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm // 2009. T. 4. № 8. C. 1073–1082.
104. Kumar S. и др. MEGA : A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences // 2008. T. 9. № 4.
105. Lauressergues D. и др. The microRNA *miR171h* modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting *NSP2* // *Plant J.* 2012. T. 72. № 3. C. 512–522.
106. Leake J.R. The biology of myco-heterotrophic (‘saprophytic’) plants // *New Phytol.* 1994. T. 127. № 2. C. 171–216.
107. Lefebvre B. и др. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. T. 107. № 5. C. 2343–2348.
108. Lerouge P. и др. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal // *Nature*. 1990. T. 344. № 6268. C. 781.
109. Lévy J. и др. A Putative Ca^{2+} -and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses // *Science* (80-.). 2004. T. 303. № 5662. C. 1361–1364.
110. Lewin R.A. Symbiosis and Parasitism: Definitions and Evaluations //

Bioscience. 1982. T. 32. № 4. C. 254–260.

111. Li R. и др. Natural variation in host-specific nodulation of pea is associated with a haplotype of the SYM37 LysM-type receptor-like kinase. // *Mol. plant-microbe Interact.* 2011. T. 24. № 11. C. 1396–403.

112. Lie T.A. Temperature-dependent root-nodule formation in pea cv. Iran // *Plant Soil.* 1971. T. 34. № 3. C. 751–752.

113. Lie T.A. Symbiotic specialisation in pea plants: the requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from Afghanistan // *Ann. Appl. Biol.* 1978. T. 88. № 3. C. 462–465.

114. Lie T.A. Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strains // *Plant Soil.* 1984. T. 82. № 3. C. 415–425.

115. Lie T.A., Timmermans P., Ladizinski G. Host-controlled nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis // *Isr. J. Bot.* 1982. T. 31. № May 2015. C. 163–167.

116. Lie T.A., Timmermans P.C.J.M. Host-genetic control of nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis: complication in the genetic analysis due to maternal effects // *Plant Soil.* 1983. T. 75. № 3. C. 449–453.

117. Limpens E. и др. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection // *Science* (80-.). 2003. T. 302. № 5645. C. 630–633.

118. Limpens E. и др. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. T. 102. № 29. C. 10375–10380.

119. Limpens E., Bisseling T. Signaling in symbiosis // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. T. 6. № 4. C. 343–350.

120. Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // *Science* (80-.). 2010. T. 327. № 5961. C. 46–50.

121. Liu W. и др. Strigolactone Biosynthesis in *Medicago truncatula* and Rice Requires the Symbiotic GRAS-Type Transcription Factors NSP1 and NSP2 // *Plant Cell.* 2011. T. 23. № 10. C. 3853–3865.

122. Macas J., Neumann P., Navrátilová A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula* // *BMC Genomics.* 2007. T. 8. № 1. C. 427.

123. Madsen E.B. и др. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals // *Nature.* 2003. T. 425. № 6958. C. 637–640.

124. Maillet F. и др. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. // *Nature*. 2011. Т. 469. № 7328. С. 58–63.
125. Malkov N. и др. Molecular basis of lipo-chitooligosaccharide recognition by the lysin motif receptor-like kinase LYR3 in legumes // *Biochem. J.* 2016. Т. 473. № 10. С. 1369–1378.
126. Malloch D.W. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review) *Ecology* : // 1980. Т. 77. № 4. С. 2113–2118.
127. Markmann K., Giczey G., Parniske M. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria // *PLoS Biol.* 2008. Т. 6. № 3. С. 0497–0506.
128. Marsh J.F. и др. Medicago truncatula NIN Is Essential for Rhizobial-Independent Nodule Organogenesis Induced by Autoactive Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase 1 // 2007. Т. 144. № May. С. 324–335.
129. Martin B.D. Symbiosis : " Living together " in chaos Article in Studies in history of biology · December 2012 // *Stud. Hist. Biol.* 2014. № December 2012.
130. Martin B.D., Schwab E. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology // *Int. J. Biol.* 2012. Т. 5. № 1. С. 32–45.
131. McFadden G.I. Endosymbiosis and evolution of the plant cell. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1999. Т. 2. № 6. С. 513–519.
132. Mergaert P. и др. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. Т. 103. № 13. С. 5230–5235.
133. Middleton P.H. и др. An ERF Transcription Factor in Medicago truncatula That Is Essential for Nod Factor Signal Transduction // *Plant Cell Online*. 2007. Т. 19. № 4. С. 1221–1234.
134. Mitra R.M. и др. A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Т. 101. № 13. С. 4701–4705.
135. Miyata K. и др. The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice // *Plant Cell Physiol.* 2014. Т. 55. № 11. С. 1864–1872.
136. Modjo H.S., Hendrix J.W. The mycorrhizal fungus Glomus macrocarpum as a cause of tobacco stunt disease. // *Phytopathology*. 1986. Т. 76. № 7. С. 688–691.
137. Mortier V. и др. CLE Peptides Control Medicago truncatula Nodulation Locally and Systemically // *Plant Physiol.* 2010. Т. 153. № 1. С. 222–237.

138. Mulligan J.T., Long S.R. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. // *Genetics*. 1989. T. 122. № 1. C. 7–18.
139. Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T. Symbiotic nitrogen fixation. // *Plant Cell*. 1995. T. 7. № 7. C. 869.
140. Nagahashi G., Douds D.D. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots // *New Phytol.* 1997. T. 136. № 2. C. 299–304.
141. Nakagawa T. и др. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume–*Rhizobium* symbiosis // *Plant J.* 2011. T. 65. № 2. C. 169–180.
142. Nesbitt M. Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture Vol. 39. : Royal Botanic Gardens, Kew, 2003. 242 с.
143. Nishimura R. и др. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development // *Nature*. 2002. T. 420. № 6914. C. 426–429.
144. Ohnuma T. и др. LysM domains from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A: A stability study and characterization of the chitin-binding site // *J. Biol. Chem.* 2008. T. 283. № 8. C. 5178–5187.
145. Okamoto S. и др. Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation // *Plant Cell Physiol.* 2009. T. 50. № 1. C. 67–77.
146. Oke V., Long S.R. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Curr. Opin. Microbiol.* 1999. T. 2. № 6. C. 641–646.
147. Oldroyd G.E.D. Dissecting symbiosis: Developments in Nod factor signal transduction // *Ann. Bot.* 2001. T. 87. № 6. C. 709–718.
148. Oldroyd G.E.D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants // *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. T. 11. № 4. C. 252–263.
149. Oldroyd G.E.D., Dixon R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. T. 26. C. 19–24.
150. Oldroyd G.E.D., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. T. 59. № 12. C. 519–546.
151. Ovtsyna A.O. и др. Restriction of Host Range by the *sym2* Allele of Afghan Pea Is Nonspecific for the Type of Modification at the Reducing Terminus of Nodulation Signals // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1998. T. 11. № 5. C. 418–422.
152. Ovtsyna A.O. и др. Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and

- their fucosylated derivatives stimulate a Nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed in vitro by plant chitinases at different rates // *Mol. plant-microbe Interact.* 2000. T. 13. № 8. C. 799–807.
153. OvtSYna A.O. и др. Nod Factors Induce Nod Factor Cleaving Enzymes in Pea Roots. Genetic and Pharmacological Approaches Indicate Different Activation Mechanisms // *Plant Physiol.* 2005. T. 139. № October. C. 1051–1064.
154. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. T. 6. № 10. C. 763–775.
155. Partida-Martinez L.P.P., Heil M. The microbe-free plant: fact or artifact? // *Front. Plant Sci.* 2011. T. 2. № December. C. 100.
156. Pawlowski K., Bisseling T. Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features? // *Plant Cell.* 1996. T. 8. № 10. C. 1899.
157. Pawlowski K., Demchenko K.N. The diversity of actinorhizal symbiosis // *Protoplasma.* 2012. T. 249. № 4. C. 967–979.
158. Peck M.C., Fisher R.F., Long S.R. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti* // *J. Bacteriol.* 2006. T. 188. № 15. C. 5417–5427.
159. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. T. 64. № 1. C. 180–201.
160. Peters N.K., Long S.R. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes // *Plant Physiol.* 1988. T. 88. № 2. C. 396–400.
161. Philip-Hollingsworth S., Dazzo F.B., Hollingsworth R.I. Structural requirements of *Rhizobium* chitolipooligosaccharides for uptake and bioactivity in legume roots as revealed by synthetic analogs and fluorescent probes. // *J. Lipid Res.* 1997. T. 38. № 6. C. 1229–41.
162. Pietraszewska-Bogiel A. и др. Interaction of *Medicago truncatula* Lysin Motif Receptor-Like Kinases, NFP and LYK3, Produced in *Nicotiana benthamiana* Induces Defence-Like Responses // *PLoS One.* 2013. T. 8. № 6. C. 16–18.
163. Pike L.J. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function // *J. Lipid Res.* 2006. T. 47. № 7. C. 1597–1598.
164. Popp C., Ott T. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. T. 14. № 4. C. 458–467.
165. Porter S.S., Simms E.L. Selection for cheating across disparate environments in the legume-rhizobium mutualism // *Ecol. Lett.* 2014. T. 17. № 9. C. 1121–1129.

166. Postma J.G., Jacobsen E., Feenstra W.J. Three Pea Mutants with an Altered Nodulation Studied by Genetic Analysis and Grafting // *J. Plant Physiol.* 1988. T. 132. № 4. С. 424–430.
167. Provorov N.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza // *J. Theor. Biol.* 2002. T. 214. № 2. С. 215–232.
168. Radutoiu S. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // *ASA Refresh. Courses Anesthesiol.* 2003.
169. Raffaele S. и др. Genome-Wide Annotation of Remorins, a Plant-Specific Protein Family: Evolutionary and Functional Perspectives // *Plant Physiol.* 2007. T. 145. № 3. С. 593–600.
170. Remigi P. и др. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts // *Trends Microbiol.* 2016. T. 24. № 1. С. 63–75.
171. Remy W. и др. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. T. 91. № 25. С. 11841–11843.
172. Rival P. и др. Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula* // 2012. T. 3391. С. 3383–3391.
173. Rogers C., Oldroyd G.E.D. Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals // *J. Exp. Bot.* 2014. T. 65. № 8. С. 1939–1946.
174. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* 1985. T. 5. № 2. С. 69–76.
175. Sachs J.L., Simms E.L. Pathways to mutualism breakdown // *Trends Ecol. Evol.* 2006. T. 21. № 10. С. 585–592.
176. Sagan L. On the origin of mitosing cells // *J. Theor. Biol.* 1967. T. 14. № 3. С. 225–IN6.
177. Saito K. и др. NUCLEOPORIN85 Is Required for Calcium Spiking, Fungal and Bacterial Symbioses, and Seed Production in *Lotus japonicus* // *Plant Cell Online.* 2007. T. 19. № 2. С. 610–624.
178. Santoyo G. и др. Plant growth-promoting bacterial endophytes // *Microbiol. Res.* 2016. T. 183. С. 92–99.
179. Schauser L. и др. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules // *Nature.* 1999. T. 402. № 6758. С. 191–195.
180. Schnabel E. и др. The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length // *Plant Mol. Biol.* 2005. T. 58. № 6. С. 809–822.

181. Schultze M., Kondorosi A. Regulation of symbiotic root nodule development // *Annu. Rev. Genet.* 1998. T. 32. № 1. C. 33–57.
182. Schwedock J.S. и др. Rhizobium meliloti NodP and NodQ form a multifunctional sulfate- activating complex requiring GTP for activity // *J. Bacteriol.* 1994. T. 176. № 22. C. 7055–7064.
183. Shiu S.-H., Bleecker A.B. Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling // *Sci. Signal.* 2001. T. 2001. № 113. C. re22–re22.
184. Shizuya H., Kouros-Mehr H. The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system // *Keio J. Med.* 2001. T. 50. № 1. C. 26–30.
185. Smit P. и др. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial nod factor-induced transcription // *Science (80-.).* 2005. T. 308. № 5729. C. 1789–1791.
186. Smit P. и др. Medicago LYK3, an Entry Receptor in Rhizobial Nodulation Factor Signaling // *Plant Physiol.* 2007. T. 145. № 1. C. 183–191.
187. Smith F.A., Smith S.E. How harmonious are arbuscular mycorrhizal symbioses? Inconsistent concepts reflect different mindsets as well as results // *New Phytol.* 2015. T. 205. № 4. C. 1381–1384.
188. Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. : Academic press, 2010.
189. Smýkal P. и др. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the Pisum genus // *Plant Genet. Resour. Characterisation Util.* 2011. T. 9. № 1. C. 4–18.
190. Soyano T. и др. NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. T. 111. № 40. C. 14607–14612.
191. Spaink H.P. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1995. T. 33. C. 345–368.
192. Sprent J.I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: A taxonomic perspective on the occurrence of nodulation: Tansley review // *New Phytol.* 2007. T. 174. № 1. C. 11–25.
193. Sprent J.I., Ardley J.K., James E.K. From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes // *South African J. Bot.* 2013. T. 89. C. 31–41.
194. Stacey G. и др. Genetics and functional genomics of legume nodulation // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. T. 9. № 2. C. 110–121.

195. Stracke S. и др. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis // *Nature*. 2002. Т. 417. № 6892. С. 959.
196. Sudheesh S. и др. De novo assembly and characterisation of the field pea transcriptome using RNA-Seq // *BMC Genomics*. 2015. Т. 16. № 1. С. 611.
197. Sulima A.S. и др. Selection Signatures in the First Exon of Paralogous Receptor Kinase Genes from the Sym2 Region of the *Pisum sativum* L. Genome // *Front. Plant Sci*. 2017. Т. 8. № November.
198. Sulima A.S., Zhukov V.A. Tilling: The modern technology in «reverse» genetic of plants // *Sel'skokhozyaistvennaya Biol*. 2015. Т. 50. № 3.
199. Till B.J. и др. Large-Scale Discovery of Induced Point Mutations With Large-Scale Discovery of Induced Point Mutations With High-Throughput TILLING // 2003. С. 524–530.
200. Timmers A.C.J. и др. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules // *Mol Plant-Microbe Interact*. 2000. Т. 13. № 11. С. 1204–1213.
201. Vance C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources // *Plant Physiol*. 2001. Т. 127. № 2. С. 390–397.
202. Visweswaran G.R.R. и др. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2014. Т. 98. № 10. С. 4331–4345.
203. Wais R.J. и др. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula* // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2000. Т. 97. № 24. С. 13407–13412.
204. Walker S.A., Viprey V., Downie J.A. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2000. Т. 97. № 24. С. 13413–13418.
205. Wall L.G. The actinorhizal symbiosis // *J. Plant Growth Regul*. 2000. Т. 19. № 2. С. 167–182.
206. Wang D. и др. Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism // *Cell. Microbiol*. 2012a. Т. 14. № 3. С. 334–342.
207. Wang E. и др. A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants // *Curr. Biol*. 2012b. Т. 22. № 23. С. 2242–2246.
208. White J.F. и др. Rhizophagy Cycle : An Oxidative Process in Plants for Nutrient Extraction From Symbiotic Microbes // 2018. С. 1–17.
209. Yano K. и др. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2008. Т. 105. № 51. С. 20540–20545.

210. Yuan S. и др. A Ubiquitin Ligase of Symbiosis Receptor Kinase Involved in Nodule Organogenesis // *Plant Physiol.* 2012. Т. 160. № 1. С. 106–117.
211. Zhang X.-C. и др. Molecular Evolution of Lysin Motif-Type Receptor-Like Kinases in Plants // *Plant Physiol.* 2007. Т. 144. № 2. С. 623–636.
212. Zhang X. и др. The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling // *Plant J.* 2015. Т. 81. № 2. С. 258–267.
213. Zhu H. и др. Tracing non-legume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses // *Genetics.* 2006.
214. Zhu H. и др. A Novel ARID DNA-Binding Protein Interacts with SymRK and Is Expressed during Early Nodule Development in *Lotus japonicus* // *Plant Physiol.* 2008. Т. 148. № 1. С. 337–347.
215. Zhukov V. и др. The Pea *Sym37* Receptor Kinase Gene Controls Infection-Thread Initiation and Nodule Development // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2008. Т. 21. № 12. С. 1600–1608.
216. Zhukov V.A. и др. De novo assembly of the pea (*Pisum sativum* L.) nodule transcriptome // *Int. J. Genomics.* 2015. Т. 2015.
217. Вавилов Н.И.Н.И., Букинич Д.Д.Д. Земледельческий Афганистан. Ленинград: Всесоюзный институт прикладной ботаники и новых культур при СНК СССР, 1929. Вып. Ленинградс.
218. Вишнякова М.А. Роль НИ Вавилова в создании коллекции генетических ресурсов зернобобовых культур // *Сельскохозяйственная биология.* 2012. Т. 57. № 5. С. 31–38.
219. Говоров Л.И. Горох Афганистана // *Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции.* 1928. Т. 19. № 2. С. 497–522.
220. Гончаров Н.П. Экспедиции НИ Вавилова // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2014. Т. 16. № 3. С. 560–578.
221. Жуков В.А. и др. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями // *Ecol. Genet.* 2008. Т. 6. № 4. С. 12–19.
222. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. 2-е издание // СПб. Изд-во Н-Л, 2010б. 2010.
223. Костерин О.Э. При царе горохе (*Pisum sativum* L.): непростая судьба первого генетического объекта // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2015а. Т. 19. № 1. С. 13–26.
224. Костерин О.Э. Перспективы использования диких сородичей в селекции гороха (*Pisum sativum* L.) // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2015б.

Т. 19. № 2. С. 154–164.

225. Мережковский К.С. Теория двух плазм как основа симбиогенезиса, нового учения о происхождении организмов // Казань: Изд-во Импер. ун-та. 1909. С. 102.

226. Проворов Н.А. Антон де Бари (Anton de Bary). Явление симбиоза (die Erscheinung der symbiose) // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 3. С. 113–126.

227. Проворов Н.А., Мыльников С.В. Генетические механизмы индивидуальных и кооперативных адаптации // Ecol. Genet. 2007. Т. 5. № 1.

228. Проворов Н.А., Штарк О.Ю., Долгих Е.А. Эволюция азотфиксирующих симбиозов, основанная на миграции бактерий из микоризных грибов и почвы в ткани растений // Журнал общей биологии. 2016. Т. 77. № 5. С. 329–345.

229. Разумовская З.Г. Образование клубеньков у различных сортов гороха // микробиология. 1937. Т. 6. № 3. С. 321–328.

230. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий // Экологическая генетика. 2003. Т. 1. № Спецвыпуск.

231. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего // 2009.

232. Фаминцын А.С. О роли симбиоза в эволюции организмов // Тр. Импер. Акад. наук. физ.-мат. отд. 1907. Т. 20. С. 3–35.

233. Яценко-Степанова Т.Н., Немцева Н.В., Игнатенко М.Е. Многообразие симбиозов и их роль в эволюции органического мира // Вестник Оренбургского государственного университета. 2014. Т. 13. № 13 (174). С. 142–147.

Приложение

Таблица 1. Список образцов из коллекции ВИР, участвовавших в отборе новых источников «афганской» аллели *Sym2*

№ в каталоге ВИР	Название образца	Происхождение (по каталогу ВИР)	RCAM1026	A1	RCAM1026	A1
K-73	Мелькак	Памир	35	40	+	+
K-108	Smugnense	Турция	78	70	++	++
K-188	Махорг	Таджикистан (Памир)	73	75	++	++
K-236	Мелькак	Афганистан	74	60	++	+
K-864	-	Казахстан	33	50	+/-	+
K-958	-	Узбекская ССР	38	40	+	+
K-1248	Перчак	Таджикистан	14	44	+/-	+
K-1250	Местный	Таджикистан (Памир)	70	70	++	++
K-1441	Махорг	Памир	58	95	+	++
K-1837	Местный	Индия	47	80	+	++
K-1852	-	Палестина	43	40	+	+
K-1878	Мушунг	Афганистан	0	59	-	+
1974	Местный	Афганистан	45	40	+	+
K-2090	Местный	Индия	39	60	+/-	+
K-2094	Местный	Армения	36	30	+/-	+/-
K-2095	Местный	Армения	76	60	++	+
K-2172	-	Израиль	48	50	+	+
K-2182	Мюшик 623	Иран	5	35	-/+	+/-
K-2198	-	Турция	40	50	+	+
K-2209	-	Турция	78	80	++	++
K-2223	-	Турция	66	70	++	++
K-2227	-	Турция	84	80	++	++
K-2240	-	Турция	47	30	+	+/-
K-2248	-	Турция	80	90	++	++
K-2258	-	Турция	61	50	+	+
K-2262	-	Турция	45	40	+	+
K-2309	K93	Грузия	40	60	+	+
K-2478	-	Сирия	41	40	+	+
K-2489	Горох обыкновенный огородный	Азербайджан	34	40	+/-	+
K-2490	-	Турция	40	50	+	+
K-2496	-	Турция	38	70	+	++
K-2514	-	Сирия	31	60	+/-	+
K-2516	Мселле	Палестина	46	60	+	+
K-2521	<i>P.s. ssp. syriacum</i>	Израиль	90	80	++	++
K-2524	<i>P. elatius</i>	Ливан	40	50	+	+
K-2595	-	Израиль	39	50	+	+
K-3208	-	Турция	35	60	+	+
K-3244	<i>P. arvense</i>	Грузия	69	70	++	++
K-3264	-	Турция	95	60	++	+
K-3374	-	Туркмения	0	63	-	+

К-3434	-	Индия, Тибет	80	60	++	-
К-3567	<i>P.s. ssp. abyssinicum</i> Berger	Йемен	106	60	+++	+
К-3598	Мужук	Памир	191	70	+++	++
К-3607	-	Памир	50	90	+	++
К-3785	-	Грузия	67	90	+	++
К-3821	-	Таджикистан	0	67	-	++
К-3828	-	Таджикистан	65	100	+	+++
К-3829	-	Таджикистан	37	90	+	++
К-3980	<i>P. arvense</i> L. №1	Грузия	61	40	+	+
К-4379	Горох местный	Киргизия	48	40	+	+
К-4396	Карлик	Киргизия	79	80	++	++
К-4650	Местный	Армения	48	50	+	+
К-4901	Восток-55	Узбекистан	0	52	-	+
К-5101	Полуштамбовый карлик	Киргизия	55	90	+	++
К-5212	-	Индия	47	60	+	+
К-5213	-	Индия	37	30	+	+/-
К-5223	-	Индия	76	30	++	+/-
К-5351	Bombay green	Индия	32	40	+/-	+
К-5369	смесь	Пакистан	99	70	+++	++
К-5370	Green Peas	Пакистан	78	60	++	+
К-5380	№35	Пакистан	60	40	+	+
К-5411	-	Сирия	71	60	++	+
К-5792	-	Афганистан	37	60	+	+
К-5804	-	Афганистан	40	50	+	+
К-5987	BR.2 (I.C. 1626)	Индия	64	50	+	+
К-6069	Местный	Казахстан	87	80	++	++
К-6143	Зимующий	Греция	42	90	+	++
К-6199	Местный	Таджикистан	78	90	++	++
К-6201	Местный	Таджикистан	51	70	+	++
К-6387	Местный	Таджикистан	69	70	++	++
К-6452	Arak	Турция	46	50	+	+
К-6458	-	Турция	72	60	++	+
К-6528	PNZ	Индия	55	90	+	++
К-6559	Мелкая пелюшка №144	Афганистан	0	75	-	++
К-6566*	Пелюшка № 1091	Афганистан	0	95	-	++
К-6650	Early 40 days (suger)	Пакистан	47	70	+	++
К-6651	Blue Bantham	Пакистан	66	70	++	++
К-6653	Swall	Пакистан	43	60	+	+
К-6654	Home Freezer	Пакистан	74	60	++	+
К-6657	смесь	Пакистан	83	50	++	+
К-6872	-	Казахстан	48	120	+	+++
К-6883	Местный	Узбекистан	38	100	+	+++
К-6982	Карабалыкский укосный	Казахстан	50	50	+	+
К-7005	№50	Сирия	75	40	++	+
К-7006	№277	Сирия	40	50	+	+
К-7008	№279	Сирия	72	60	++	+
К-7034	Местный	Непал	42	60	+	+
К-7163	P-96	Ливан	43	50	+	+
К-7169	-	Турция	57	40	+	+
К-7173	-	Турция	91	50	++	+
К-7328	-	Турция	103	50	+++	+
К-7382	Цхалцителя	Грузия	60	70	+	++

K-7648	P.V.774	Пакистан	50	50	+	+
K-7653	-	Грузия	38	70	+	++
K-7656	-	Пакистан	47	60	+	+
K-7657	-	Пакистан	>200	>200	+++	+++
K-7786	-	Россия, Дагестан	35	50	+	+
K-7814	Жемчуг	Киргизия	47	50	+	+
K-7861	Алма-атинский 340	Казахстан	30	50	+/-	+
K-7868	Джиниси	Грузия	68	40	++	+
K-7879	№35297	Турция	55	40	+	+
K-7892	-	Турция	52	40	+	+
K-7968	Церобани	Грузия	>200	100	+++	+++
K-8025	Tendrilled acacia mutant	Индия	100	80	+++	++
K-8026	Climbing	Йемен	140	80	+++	++
K-8065	-	Грузия	145	100	+++	+++
K-8067	-	Грузия	43	50	+	+
K-8082	Hindukusch	Афганистан	41	50	+	+
K-8095	F.C.3954	Пакистан	86	50	++	+
K-8258	Аджамецкий	Грузия	146	150	+++	+++
K-8327	-	Греция	61	50	+	+
K-8446	-	Йемен	31	40	+/-	+
K-8536	-	Греция	87	60	++	+
K-8546	P.s. afghanistan Ji-80	Афганистан	66	80	++	++
K-8547	P.s. afghanistan Ji-90	Афганистан	137	100	+++	+++
K-8563	NDP-8	Индия	52	40	+	+
K-8645	DMR-7	Индия	43	30	+	+/-
K-9066	Ig 49206	Сирия	58	70	+	++
K-9135	Ig 52534	Сирия	40	40	+	+
K-9205	Nissilos Greece GRC 63-1A	Греция	40	30	+	+/-
K-9282	Местный	Таджикистан	69	60	++	+
K-9396	Ig 52270 IFPI 3111	Афганистан	17	60	+/-	+
K-9398	Ig 52361 IFPI 3202	Иран	32	50	+/-	+

Пояснения к Таблице 1: отбор проводился по количеству клубеньков, образованных при взаимодействии с *nodX*⁻ штаммом ризобий RCAM 1026, по сравнению с *nodX*⁺ – штаммом A1. Оценка клубенькообразования проводилась качественно: 0 = «-»; <10 = «-/+»; 10-30 = «+/-»; 40-60 = «+»; 70-90 = «++»; >100 = «+++». Зеленым цветом выделены образцы, вовлечённые в дальнейшую работу (т.е. продемонстрировавшие «афганский» фенотип).

*: образец K-6566 был утерян в ходе работы.

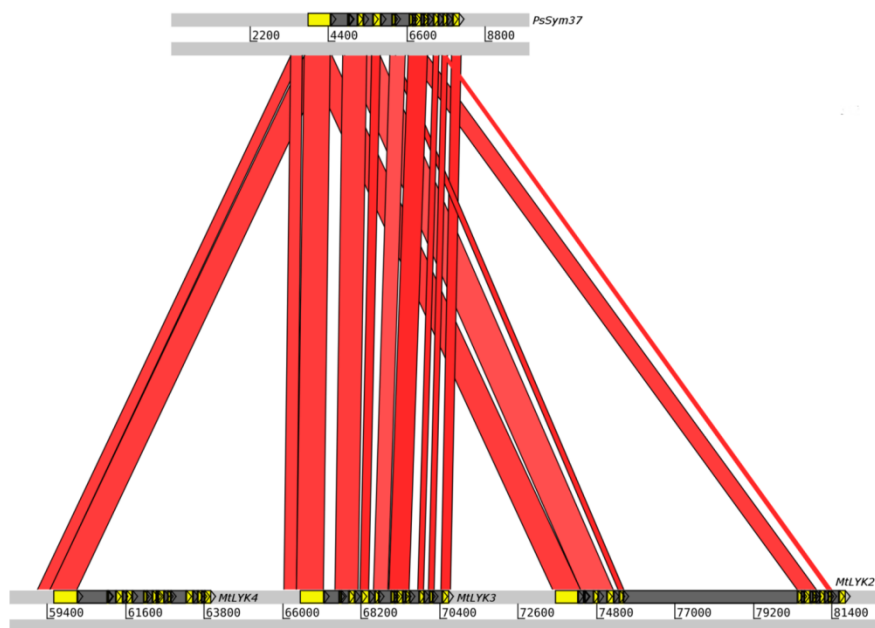
Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Название праймера	Последовательность (5' – 3')	Назначение
LYKXnspFw1	AAG TGT GTR AWA GGG TGT GAT	Амплификация первого экзона <i>LykX</i> (соответствует рецепторной части белка)
LYKXspRv1	CCA ACC ATT TGT ATC AAA CA	
99G_LykX_F2	CCA CAT TCT CTA GTC AAA CAT GC	
LykX_Wh1_Fw1	CCC TCA GCA GCC ATT TTC AT	
LykX_Wh1_Fw2	CTC TCT TTC TTA TTG ACT AAA TG	
99G_LykX_R1	TCT GTA AGT GAC AAC ATG CG	
99G_LykX_R2	CGT CAG CGT AAG ATC CAA CC	
99G_LykX_R3	GCA GAA GAT CGA AAG TTG ATG G	
K10_fw12	GCT TTC CTT CGG CAG CCA TTT TGT	Скрининг ВАС- библиотеки (ген <i>Sym37</i>)
K10_RACE	CAT TCA CAT GGG AAT GGA ATG TTG	
K1_fw3	GAA TGC TGT TCT GAA GAC AGG	Скрининг ВАС- библиотеки (ген <i>K1</i>)
K1_rv10	GTC ATC ATC ACA ATC TTC AAA TG	
LykX_fw1	GTT GAT ACA GAA TTT CAA TCC TGA C	Скрининг ВАС- библиотеки (ген <i>LykX</i>)
LykX_rv1	CCA AAC CTG TTC TGC AAG AGA G	
BAC_End_LykX	AGT AGT TAG GTT AGA GTC GGT TT	Сборка ВАС- вставки
Cont 1rv	GAT TCC ACC ATT GAT GTG TGC T	
Cont 1 fw (OGRE_End)	TGA AGT AGT GCA AAC GGA TAA G	
Cont 2 rv	ATC TGA GTT GAA ATA GCA CGT AC	
Cont 2 fw	ATG GCG GTG CAT TTC TAA GAG A	
Cont 3 rv	TAA ACA ACC AAT GCG ATG CTC	
Cont 3 fw	GCG GAT TTC GCT TGT GTT TGA G	
Cont 4 rv	CTT GCC TTT CAT TCA AAC ATA CAT	
Cont 4 fw	GAC TTG ATA GCG ATG GGA ATA AGA	
Cont 5 rv	GAC ACA AGT CTT CTA ATA TCT G	
Cont 5 fw	ATA GTA CAC TCA ATT AGC AAA TTG	
Cont 6 rv	TGA CCA CAT TAG CAA GGA ATA AG	
Cont 6 fw	GAA CGG CAG TGA TAT CTT ACA A	
ReaLX_Fw5_Salvation	GAT GAC GTT GCC TAT GAG G	Проведение rtПЦР
ReaLX_Rv5_Salvation	CTT TCG AAC TCG GTA CTA GG	
ReaLX_Fw6_Salvation	ACA CTA TTC ATG TGG CAG GC	
ReaLX_Rv6_Salvation	TCA CTA CCT CTC ATA TTT CCC	
Gapdh_F	AAG AAC GAC GAA CTC ACC G	Проведение rtПЦР (референсные гены)
Gapdh_R	TTG GCA CCA CCC TTC AAA TG	
PsActin2_real_time_FW	CTC AGC ACC TTC CAG CAG ATG TG	
PsActin2_real_time_RV	CTT CTT ATC CAT GGC AAC ATA GTT C	Проведение RACE-ПЦР
5'.1	CAG AAG AAT TGA AGG CTG ACA CA	
5'.2	AGT AAA AAT GCA GGC ATG ACA TGG T	
5'.3	CAC ACA CTT TGA TTC CAC TTT GAA	
3'.1	GCA GAT GAC ACA GCT TGC GAA G	
3'.2	GAG ATC CGA AAG GAC GTC CAA GA	
3'.3	ATT GAG TCC CAT TGT GGA GCA TGA	
K1_End	GAG AGC ATG TAC AAG AGA TAA TCC	Амплификация участка между генами <i>K1</i> и <i>LykX</i>
5'.1	CAG AAG AAT TGA AGG CTG ACA CA	
5'.2	AGT AAA AAT GCA GGC ATG ACA TGG T	

Til1Fw	<u>TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u> GCC TTC AAT TCT TCT GAT GT	Поиск мутантов <i>lykX</i> методом TILLING
Til1Rv	<u>AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> ATA AAC AAG CCA TAA TCC TT	
Til2Fw	<u>TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u> ACT TCT ATG GCT CTT TCA AC	
Til2Rv	<u>AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> TAA TAG ACC GTG CCA AAT CC	
Til3Fw	<u>TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u> TTT CTC GAT TCA TAA CCT TA	
Til3Rv	<u>AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> ACT CAA TGC TTC ACT ACC TC	
Til4Fw	<u>TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u> TAA CCA AGC TTA CTG ATG TT	
Til4Rv	<u>AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> ACC AAA GTT ACA AGG CTC TT	
Til5Fw	<u>TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u> ATT TGG CAC GGT CTA TTA CG	
Til5Rv	<u>AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> CTT AAG TTT CCG TTG TCC AT	
Til6Fw	<u>TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u> AAT CAT ATA CCT GCT AAA GC	
Til6Rv	<u>AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> CAT TCA AAG TTA CCA ACC TA	
Til7Fw	<u>TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u> TTA CGC TGA CGC ATG TTG TC	
Til7Rv	<u>AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> CCA TAG AAG TTT CTT GCT GT	
99G_K1_F1	GGA GTT GAA AGT GCA ATT AAG C	Амплификация первого экзона <i>K1</i> для оценки природного полиморфизма
99G_K1_F2	CGT ATC CCA ACA TGC ATG TCT G	
99G_K1_R2	GCG AAG CCA TCA CAA TTC ATA CC	
99G_K1_R1	GGA TAC AAA GGA ACA TAT TCT CC	
99G_Sym37_F0	CAC TAG GAA CAT CCA TTC ATT G	Амплификация первого экзона <i>Sym37</i> для оценки природного полиморфизма
99G_Sym37_F1	ACA TGT CAA CTC TTA TTG TAG CC	
99G_Sym37_F2	GAA TAG AAA AGC TAG GAA GTG TG	
99G_SYM37_R0	CAA GTA CTT TTG ATC AGA ACC ACC	
99G_SYM37_R1	ATT TAC CCA AGT CAC CGC GG	
99G_SYM37_R2	CTG AAG ATC AAA AGG TGG TGG	
99G_LykX_F2	CCA CAT TCT CTA GTC AAA CAT GC	Амплификация первого экзона <i>LykX</i> для оценки природного полиморфизма
99G_LykX_R3	GCA GAA GAT CGA AAG TTG ATG G	
99G_LykX_R2	CGT CAG CGT AAG ATC CAA CC	
99G_LykX_R1	TCT GTA AGT GAC AAC ATG CG	

Пояснения к Таблице 2: подчёркнутым шрифтом обозначены адаптеры Illumina.

A



B

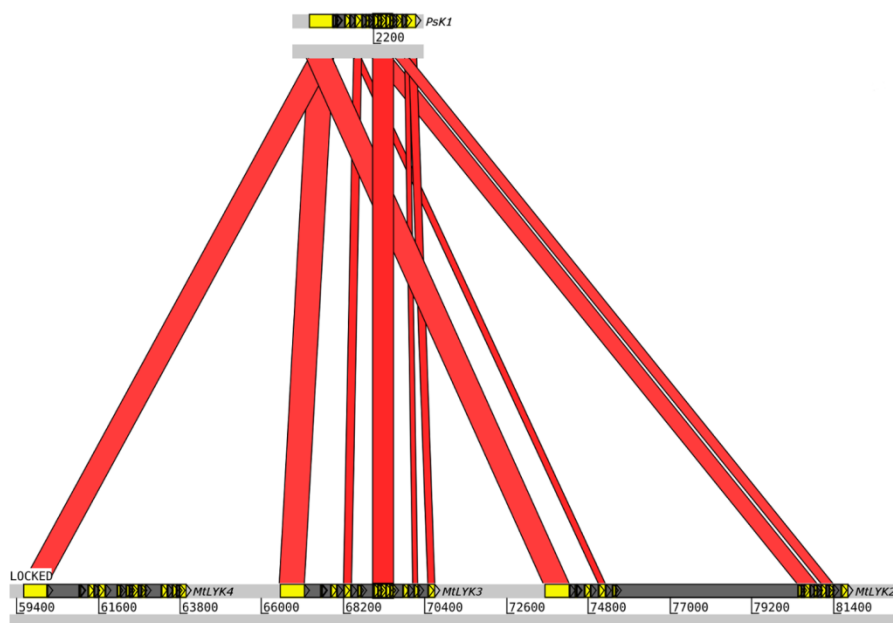


Рисунок 1. Сравнение последовательностей генов *Sym37* (A) и *K1* (B) с последовательностью LYK-региона в геноме *M.truncatula*.

Таблица 3. Клубенькообразование у мутантов *lukX* спустя 2 недели (2w) и 4 недели (4w) после инокуляции штаммом RCAM1026

539 2w	539 4w	1215 2w	1215 4w	1362 2w	1362 4w	1427 2w	1427 4w	1645 2w	1645 4w	2543 2w	2543 4w	998 4w	WT 2w	WT 4w
0	0	2	33	5	23	6	24	8	20	3	26	29	26	43
0	0	7	36	6	6	4	7	0	20	4	27	3	21	53
0	7	4	26	4	10	3	18		18	8	31	13	22	31
7	25	4	34	2	13	3	23		10	8	24	31	18	53
6	27	5			13				21	6	17		5	39
													13	47
													24	55
													29	45
														39
														46
														64
Ср. знач.±SD														
2,6± 3,58	11,8± 13,29	4,4± 1,82	32,2± 4,35	4,25± 1,71	13± 6,28	4± 1,41	18± 7,79	4± 5,66	17,8± 4,49	5,8± 2,28	25± 5,15	19± 13,37	19,75 ±7,70	46,82 ±9,12

Пояснения к Таблице 3: в столбцах указано количество клубеньков, образовавшихся на отдельных растениях. Мутант 998 анализировался только на сроке 4 недели из-за малого количества доступных семян.

Таблица 4. Учёт доли скрученных корневых волосков у мутантов *lukX*, инокулированных штаммом RCAM1026

	Кол-во полей зрения	Сумма всех	Сумма скрученных	Норм. все	Норм. скр.	% скр.
998WT	88	1836	175	20,86	1,99	0,09
998M1	98	2158	111	22,02	1,13	0,05
998M2	84	1867	105	22,23	1,25	0,06
998M3	80	1537	95	19,21	1,19	0,06
998M4	83	1873	81	22,57	0,98	0,04
1362WT	84	2134	105	25,4	1,25	0,05
1362M1	90	2155	96	23,94	1,07	0,04
1362M2	86	1847	130	21,48	1,51	0,07
1362M3	94	2165	110	23,03	1,17	0,05
1362M4	98	2598	123	26,51	1,26	0,05
1362M5	80	2047	119	25,59	1,49	0,06
1427WT	83	2462	103	29,66	1,24	0,04
1427M1	91	1978	122	21,74	1,34	0,06
1427M2	91	2197	140	24,14	1,54	0,06
1427M3	83	1919	129	23,12	1,55	0,07
1427M4	94	2558	164	27,21	1,74	0,06
2543WT	77	1896	89	24,62	1,16	0,05
2543M1	91	2567	95	28,21	1,04	0,04
2543M2	99	3095	103	31,26	1,04	0,03
2543M3	87	3385	56	38,91	0,64	0,02
2543M4	92	3348	94	36,39	1,02	0,03
2543M5	88	2770	92	31,48	1,05	0,03
1645WT	89	2396	101	26,92	1,13	0,04
1645M1	113	4300	203	38,05	1,8	0,05
1645M2	94	3221	166	34,27	1,77	0,05
1645M3	101	3853	193	38,15	1,91	0,05
1645M4	97	4037	209	41,62	2,15	0,05
1645M5	85	2862	203	33,67	2,39	0,07
1215WT1	95	2691	137	28,33	1,44	0,05
1215WT2	95	2442	139	25,71	1,46	0,06
1215M1	96	2695	152	28,07	1,58	0,06
1215M2	102	3463	172	33,95	1,69	0,05
1215M3	93	2911	142	31,3	1,53	0,05
1215M4	96	2846	164	29,65	1,71	0,06
1215M5	95	2580	195	27,16	2,05	0,08
539WT	96	2310	138	24,06	1,44	0,06
539M1	92	3717	225	40,4	2,45	0,06
539M2	91	2513	178	27,62	1,96	0,07
539M3	88	3339	243	37,94	2,76	0,07
539M4	52	1950	154	37,5	2,96	0,08

Пояснения к Таблице 4: зеленым цветом выделены контрольные растения дикого типа (линия Caméog, исходная для мутантов), посаженные вместе с растениями соответствующей мутантной семьи.

Таблица 5. Учёт инфекционных событий при инокуляции мутантов *lykX* штаммом RCAM1026*gusA*

	539	1215	1362	1427	1645	2543	998	WT
1 раст.	0	16	3	53	46	6	23	5
	58	15	4	66	22	6	21	5
	49	5	6	48	32	7	7	8
	0	15	5	60	42	4	32	8
	0	4	8	58	30	2	9	6
2 раст.	9	9	21	15	52	5	8	0
	10	14	22	7	36	3	24	3
	4	8	44	42	16	7	18	0
	8	3	23	34	14	7	13	0
	3	7	29	125	56	-	6	1
3 раст.	19	40	26	32	17	1	11	6
	31	27	33	21	12	0	31	1
	46	31	17	13	31	2	36	3
	39	28	8	10	19	5	11	4
	50	16	16	27	9	1	10	1
4 раст.	95	17	13	13	37	11	21	6
	46	33	14	11	39	6	5	5
	23	21	31	39	55	12	11	1
	-	13	7	40	26	16	2	3
	-	27	11	36	24	4	6	3
5 раст.		10	16		31	26		1
		24	33		24	1		2
		30	24		42	6		4
		17	21		18	6		2
		21	32		23	4		1
6 раст.								3
								4
								2
								5
								3
Ср.знач.	27,22	18,04	18,68	37,5	30,12	6,17	15,25	3,2
SD	26,37	9,92	11,02	27,43	13,47	5,63	9,91	2,27
SEr	6,22	1,99	2,2	6,13	2,69	1,15	2,22	0,41

Таблица 6. Список образцов из коллекции ВИР с разным географическим происхождением, отобранных для оценки полиморфизма генов LysM-RLK

№ в каталоге ВИР	№	Известный регион происхождения; сорт/подвид
К-2429	1	Алжир
К-2008	2	Египет (<i>Pisum jomardii</i>)
К-3429	3	Египет
К-7051	4	Ливия
К-8093	5	Мадагаскар, "Felefone"
К-6468	6	Судан
К-7131	7	Тунис
К-7584	8	Эфиопия
К-1836	9	Африка
К-3856	10	США
К-3855	11	Аргентина
К-5012	12	Аргентина, "Ozo Negro"
К-8261	13	Бразилия, "Long drink"
К-8600	14	-
К-8571	15	Венесуэла
К-693	16	Канада
К-925	17	США
К-8572	18	США, "Mayfair"
К-7094	19	Перу
К-6464	20	Чили
К-1982	21	Афганистан
К-3266	23	Армения
К-2514	24	Сирия
К-2595	25	Палестина
К-5493	26	Ирак
К-2182	27	Иран
К-958	28	Туркменистан
К-1251	29	Таджикистан
К-7128	30	р. Дагестан
К-188	31	Памир
К-1250	32	Памир
К-3540	33	Япония
К-3034	34	Япония
К-8599	35	-
К-8456	36	Бурунди
К-1537	37	Манчжурия
К-4776	38	о. Сахалин
К-6373	39	Монголия

К-5494	40	Монголия
К-4788	41	Монголия
К-8702	42	-
К-6063	43	Казахстан
К-4662	44	Приморский край
К-3273	45	р. Коми
К-6875	46	Красноярский край
К-7700	47	Бангладеш
К-7034	48	Непал
К-8543	49	Англия, Шри-Ланка
К-1142	50	Франция
К-1865	51	Индия
К-1866	52	Индия
К-6545	53	Индия
К-1929	54	Индия
К-2587	55	Армения
К-1985	56	Грузия
К-3445	57	Азербайджан
К-8585	58	Германия
К-5992	59	Австралия
К-8639	60	-
К-1937	61	Австрия
К-8431	62	Венгрия?
К-3980	63	Грузия
К-4650	64	Армения
К-2593	65	Кипр
К-2175	66	Турция или Болгария
К-2176	67	Чехия
К-8413	68	Венгрия
К-4148	69	Финляндия
К-7826	70	Польша
К-6139	71	Албания
К-2174	72	Болгария
К-2006	73	Дания (<i>P. arvense</i> v. <i>quadratum</i>)
К-3970	74	Бельгия
К-1022	75	Германия (<i>Pisum jomardii</i>)
К-1027	76	Германия
К-1025	77	Германия
К-1143	78	Франция
К-3140	79	Испания
К-1818	80	Англия или Италия
К-1930	81	Италия

К-1693	82	Англия
К-1699	83	Англия
К-6883	84	Узбекистан
К-4170	85	Латвия
К-116	86	Латвия
К-1815	87	Пензенская обл.
К-3312	88	Кировская обл.
К-957	89	Вологодская обл.
К-3063	90	Ленинградская обл.
К-1685	91	Швеция
К-3064	92	Белоруссия
К-3324	93	Украина, Луганская обл.
К-4789	94	Украина, Дрогобычская обл.
К-4108	95	Украина, Львовская обл.
К-3358	96	Саратовская обл.
К-8246	97	-
К-8522	98	Москва, "Тройка"
К-8274	99	Франция, "Vendevil"
К-8638	100	Финляндия, "Panu"

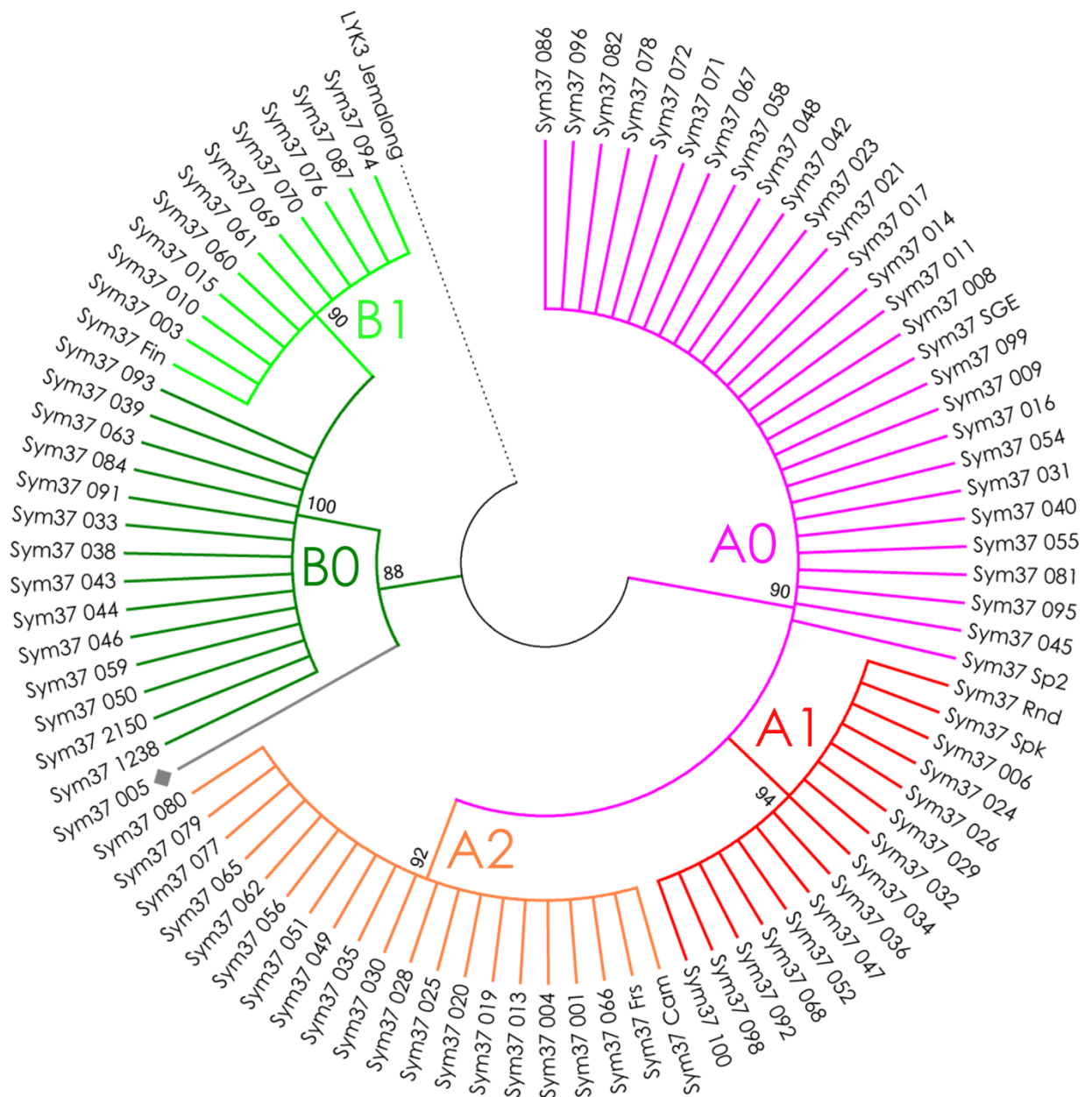


Рисунок 2. Филогенетическое древо, отражающее варибельность 1 экзона гена *Sym37*.

Названия групп гаплотипов совпадают с табл. 11. Уникальные гаплотипы дополнительно отмечены серыми ромбами. В качестве внешней группы использована последовательность гена *LYK3 M.truncatula copia Jemalong*.

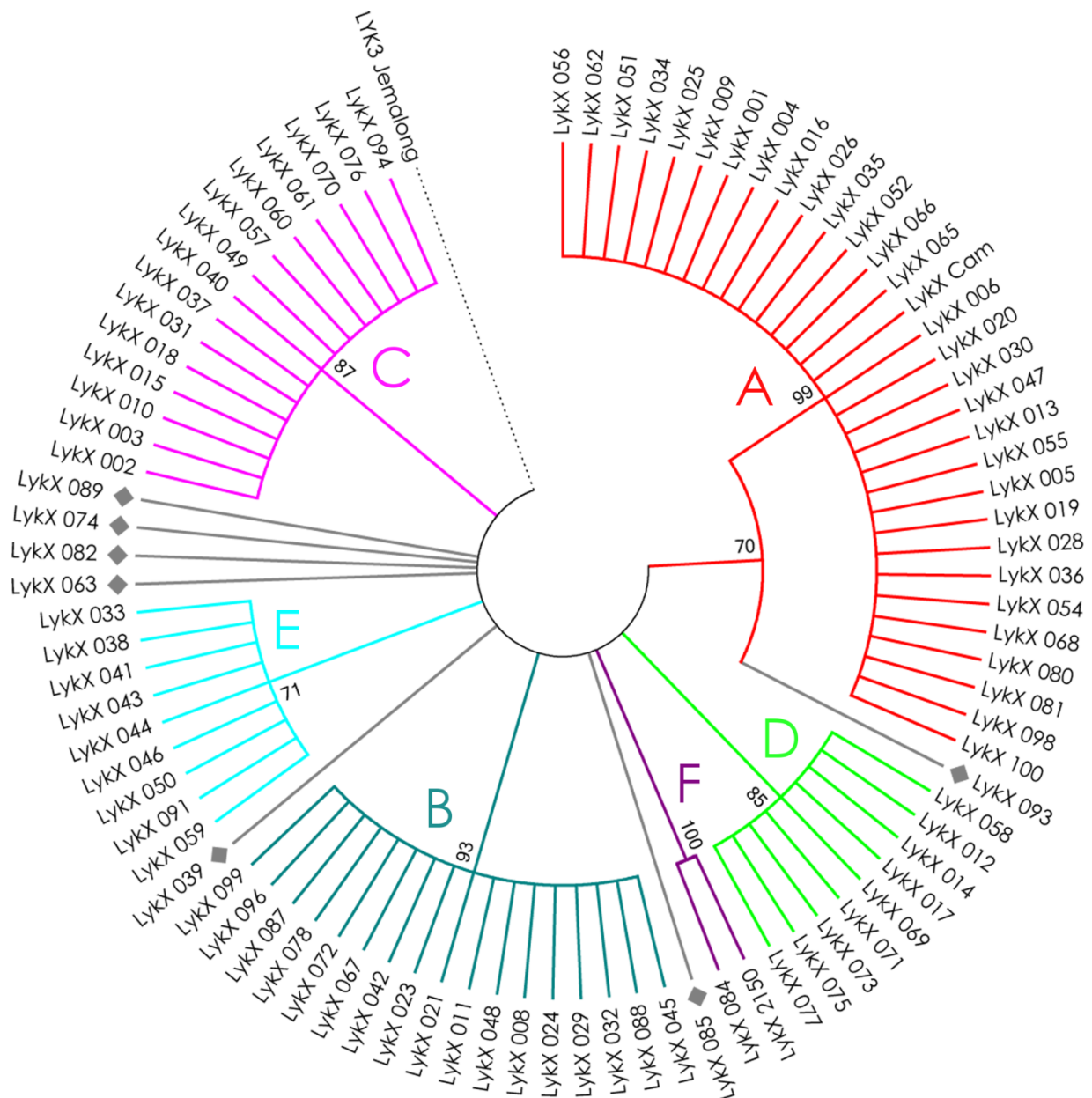


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, отражающее варибельность 1 экзона гена *LykX*. Названия групп гаплотипов совпадают с табл. 11. Уникальные гаплотипы дополнительно отмечены серыми ромбами. В качестве внешней группы использована последовательность гена *LYK3 M.truncatula* сорта Jemalong. Группа F объединяет линии с «афганским» фенотипом.