



Годичное собрание ОФР 2022  
Всероссийская научная конференция  
с международным участием

# ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ФЕНОМИКА

КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННЫХ  
ФИТОБИОТЕХНОЛОГИЙ

ТЕЗИСЫ  
ДОКЛАДОВ

Нижний  
Новгород  
27 - 30 сентября  
2022



## Выявление механизмов действия гена *MtCLE35* в системной регуляции развития симбиотических клубеньков у люцерны с помощью транскриптомного анализа и геномного редактирования

Лебедева М.А., Добычкина Д.А., Додуева И.Е., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия.  
[m.a.lebedeva@spbu.ru](mailto:m.a.lebedeva@spbu.ru)

В ходе симбиоза бобовых растений с почвенными бактериями ризобиями происходит формирование новых симбиотических органов на корнях – азотфиксирующих клубеньков. Развитие клубеньков находится под системным контролем со стороны растения: их количество строго контролируется с помощью системы авторегуляции. Клубеньки формируются только при низком содержании азота, тогда как наличие в среде достаточного количества азота, в частности, нитрата, подавляет развитие клубеньков. Важными участниками авторегуляции клубенькообразования являются пептиды CLE, охарактеризованные у ряда бобовых растений. Ранее нами было показано участие гена *MtCLE35*, кодирующего регуляторный пептид CLE, в контроле численности симбиотических клубеньков у люцерны (Lebedeva et al., 2020). Экспрессия этого гена активируется как в ответ на инокуляцию ризобиями, так и при обработке нитратом. Сверхэкспрессия этого гена под контролем конститутивного промотора 35S приводила к подавлению развития симбиотических клубеньков на корнях люцерны. Однако оставалось не изученным, на какой именно стадии осуществляется блок развития симбиоза при активации гена *MtCLE35*.

Для выяснения механизмов действия пептида MtCLE35 и поиска мишеней пути, им активированного, нами был проведен транскриптомный анализ трансгенных корней со сверхэкспрессией гена *MtCLE35* (*MtCLE35-oe*) после их инокуляции бактериями ризобиями. В качестве контроля были взяты корни растений со сверхэкспрессией гена *GUS* (*GUS-oe*), кодирующего репортерный ген бета-глюкуронидазы. Транскриптомный анализ проводили с помощью технологии MACE (Massive Analysis of cDNA Ends, (GenXPro GmbH, Germany)). Всего при сравнении образцов *GUS-oe* и *MtCLE35-oe* в условиях инокуляции бактериями ризобиями было выявлено 889 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), из них 714 генов со сниженной экспрессией и 175 генов – с повышенной экспрессией в образцах со сверхэкспрессией *MtCLE35*. Среди ДЭГ, экспрессия которых значительно снижена в образцах – ключевые гены-регуляторы симбиотических клубеньков, кодирующие транскрипционные факторы NIN (NODULE INCEPTION), NSP1 (NODULATION SIGNALING PATHWAY 1), NF-YA1/HAP2, а также ERN1 (ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1)). Гены, кодирующие данные транскрипционные факторы, активируются с участием компонентов сигнального каскада, индуцируемого ризобиями. При этом статистически значимого снижения экспрессии генов, кодирующих рецепторы сигнальных молекул ризобий (Nod-факторов), а также генов, кодирующих компоненты сигнального каскада, в частности, кальций/кальмодулин-зависимую киназу DMI3 (DOESN'T MAKE INFECTIONS 3), действующих на самых ранних этапах развития симбиоза, не наблюдалось. Таким образом, регуляторный путь, активируемый пептидом MtCLE35, блокирует развитие симбиотических клубеньков за счет подавления уровней экспрессии генов ключевых транскрипционных факторов, регулирующих программу симбиоза, но при этом не затрагивает самые ранние этапы, связанные с рецепцией Nod-факторов и активацией раннего симбиотического сигнального каскада.

В ходе транскриптомного анализа корней со сверхэкспрессией гена *MtCLE35* в “несимбиотических” условиях (в отсутствие инокуляции ризобиями) было выявлено 104 ДЭГ. Для четырех генов было дополнительно подтверждено увеличение экспрессии в корнях *MtCLE35-oe* в трех независимых биологических экспериментах. Интересно, что один из таких генов кодирует предполагаемый рецептор пептида MtCLE35.

Кроме того, нами также были получены растения люцерны с нокаутированным геном *MtCLE35* в результате его редактирования с помощью системы *crispr-Cas9*. Среди них – гомозиготные растения поколения T1, содержащие вставки одиночных нуклеотидов в кодирующую последовательность *MtCLE35*, а также различные варианты делеций, приводящие к образованию нефункционального белкового продукта за счет сдвига рамки считывания. У полученных растений будет проведена оценка количества симбиотических клубеньков при различном уровне азота в среде, а также других параметров роста и развития.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-016-00129 и грантом Санкт-Петербургского государственного университета ID 93020431.