



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



Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика растений люцерны *Medicago truncatula* с отредактированным геном *MtCLE35*

Добычкина Д.А., Лебедева М.А., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии,
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

dobichkinadaria@gmail.com

Азот является одним из трех основных макроэлементов, необходимых для роста растений. Хотя азот является наиболее распространенным элементом в атмосфере, большинство растений не могут напрямую использовать атмосферный газообразный азот. Однако бобовые растения научились преодолевать эту проблему: в условиях нехватки азота они способны образовывать строго регулируемые симбиотические отношения с азотфиксирующими почвенными бактериями, известными как ризобии. Такое взаимодействие приводит к образованию на корнях растений новых органов – симбиотических клубеньков, в которых происходит процесс азотфиксации. Бактерии осуществляют фиксацию молекулярного азота из атмосферы и превращают в ион аммония, который является доступным для растения и идет на строение органических молекул. Растения, в свою очередь, снабжают бактерии веществами, содержащими углерод, продуктами фотосинтеза. Важно отметить, если в почве содержатся доступные соединения азота, растение преимущественно будет использовать именно их для восполнения собственного минерального статуса и, следовательно, клубеньки образовываться не будут.

Формирование и функционирование азотфиксирующих клубеньков требует больших энергетических ресурсов растения, поэтому эти процессы находятся под системным контролем со стороны растения. У бобовых растений известна такая система, как авторегуляция клубенькообразования, которая ограничивает формирование избыточных симбиотических клубеньков. Мобильными компонентами авторегуляции клубенькообразования являются определенные пептиды CLE. Пептиды CLE, синтезируемые в развивающихся на корнях клубеньках, транспортируются по ксилеме из корней в побег, где происходит их взаимодействие со специфическими рецепторами – CLAVATA1 (CLV1)–подобными киназами и вследствие этого взаимодействия происходит выработка ответного сигнала, блокирующего формирование новых клубеньков на корнях по механизму отрицательной обратной связи.

Наша работа посвящена изучению роли гена *MtCLE35*, кодирующего один из пептидов, вовлеченных в системный контроль развития симбиотических клубеньков у люцерны *Medicago truncatula*. Экспрессия гена *MtCLE35* активируется как при воздействии ризобий, так и при обработке нитратом, а его сверхэкспрессия в трансгенных корнях подавляет развитие симбиотических клубеньков (Lebedeva et al., 2020). Таким образом, *MtCLE35* опосредует ингибирование закладки клубеньков в ответ на присутствие нитрата, а также по механизму обратной связи как компонент системы авторегуляции клубенькообразования. Для выяснения механизмов действия гена *MtCLE35* в контроле развития были получены растения, трансформированные генетической конструкцией для редактирования гена *MtCLE35* с помощью системы CRISPR-Cas. Среди растений поколения T0 было проанализировано 23 растений, и из них у 20 растений были выявлены изменения в гене *MtCLE35*, тогда как у трех растений из всех проанализированных ген *MtCLE35* оказался неотредактированным. Нами было получено поколение T1 и для части из них мы провели генотипирование. Были проанализированы потомки от шести различных растений, всего около 10-13 растений в каждой семье. Среди потомков одной семьи растений *crispr-1* в гене *MtCLE35* была обнаружена вставка одного нуклеотида, расположенная за три нуклеотида до последовательности PAM, т.е. в предполагаемом сайте разрезания эндонуклеазой Cas9. Интересно, что у потомков данной семьи обе аллели оказались со вставкой одного нуклеотида: в одной аллели оказалась вставка G, в другой аллели - вставка C, были выявлены как гомозиготные, так и гетерозиготные растения. У таких растений продукт гена *MtCLE35* должен быть нефункциональным за счет сдвига рамки считывания. Такая же аллель со вставкой дополнительного нуклеотида в этом же сайте была обнаружена еще в двух семьях, но на ряду с ней были также выявлены и аллели, содержащие делеции 3 или 15 нуклеотидов в гене *MtCLE35*. Кроме того, еще в двух семьях были выявлены делеции 1 и 5 нуклеотидов, которые должны приводить к сдвигу рамки считывания и образованию нефункционального белкового продукта. Были выявлены как гомозиготы по таким делециям, так и гетерозиготные потомки. Также у одной семьи были обнаружены аллель, содержащая протяженную делецию в гене *MtCLE35* – выпадение 63 нуклеотидов, которая должна привести к выпадению 21 аминокислоты из белкового продукта: к потери значительного участка варибельного домена белка-предшественника пептида *MtCLE35*.

В настоящее время у отредактированных растений мы проводим оценку способности образовывать симбиотические клубеньки при различном содержании азота, также мы планируем провести анализ их транскриптома и метаболома. Полученные результаты позволят понять механизм действия пептида *MtCLE35* в нитрат-зависимом ингибировании развития клубеньков, а также и в других нитрат-регулируемых процессах.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2020-922 от 16.11.2020 на создание и развитие Научного центра мирового уровня “Агротехнологии будущего”.