Правительство Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

«Санкт-Петербургский государственный университет»

(СПбГУ)

УДК 575

Рег No НИОКТР:

АААА-А20-120013090046-4

Инв. No 77778976

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Управления

научных исследований СпбГУ

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Е.В. Лебедева

« » \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_20\_\_\_ г.

ОТЧЁТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Изучение новых компонентов системы авторегуляции клубенькообразования и ответа на нитрат у бобовых

по гранту РФФИ No 20-016-00129 А

(промежуточный)

Руководитель НИР,

доцент,

кандидат биологических наук

И.Е. Додуева

Санкт-Петербург

2021

**Реферат**

Проект направлен на поиск новых пептидов семейства CLE (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED), индуцируемых нитратом и регулирующих образование симбиотических клубеньков у бобовых растений – люцерны *Medicago truncatula* и гороха *Pisum sativum*. В рамках данного проекта мы планируем провести поиск пептидов CLE, активируемых нитратом и регулирующих клубенькообразование у люцерны и гороха, а также более детально исследовать функции этих пептидов, выявить потенциальные рецепторы пептидов CLE, регуляторы экспрессии генов CLE, а также проверить предположение о взаимодействии пептидов CLE и СЕР в ответе растений на нитрат. Полученные результаты должны расширить представления о механизмах системного контроля клубенькообразования у бобовых растений и о роли нитрата в регуляции развития симбиотических клубеньков.

**Введение**

Бобовые растения являются важными участниками аграрных экосистем, так как они способны вступать в симбиоз с почвенными бактериями ризобиями и формировать на корнях новые органы – симбиотические клубеньки. В таких клубеньках с участием ризобий происходит фиксация молекулярного азота и включение его в состав органических соединений. Число симбиотических клубеньков контролируется растением на системном уровне с участием системы авторегуляции клубенькообразования (AON, autoregulation of nodulation). Ключевыми компонентами этой системы являются пептиды CLE (CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION-related). Для ряда бобовых растений показано, что экспрессия некоторых генов *CLE* растений активируется в ходе развития симбиотических клубеньков. Продукты генов *CLE*, регуляторные пептиды CLE, в процессе дальнего транспорта перемещаются в листья, где, как предполагаются, взаимодействуют со своим рецептором, и запускают вторичный сигнал, идущий из стебля в корень и подавляющий развитие клубеньков Такой механизм действия был показан для пептида LjCLE-RS2 лядвенца, а также для пептидов MtCLE12 и MtCLE13 у люцерны (Okamoto et al., 2009; Mortier et al., 2010). У лядвенца и сои были охарактеризованы активируемые нитратом гены CLE, подавляющие развитие клубеньков при наличии нитрата в среде. В ходе предыдущего этапа выполнения работы нами был выявлен нитрат-активируемый ген CLE у люцерны, *MtCLE35*, сверхэкспрессия которого приводила к практически полному подавлению развития симбиотических клубеньков (Lebedeva et al., 2020), но конкретный механизм его действия на развитие симбиотических клубеньков оставался не изученным.

**Основная часть отчета о НИР**

На первом этапе реализации проекта нами был охарактеризован нитрат-индуцируемый ген MtCLE35, продукт которого системно подавляет развитие симбиотических клубеньков у люцерны. У гороха были идентифицированы активируемые при клубенькообразовании и в ответ на нитрат гены CLE, получены конструкции со сверхэкспрессией этих генов. В задачи на второй год реализации проекта входило:

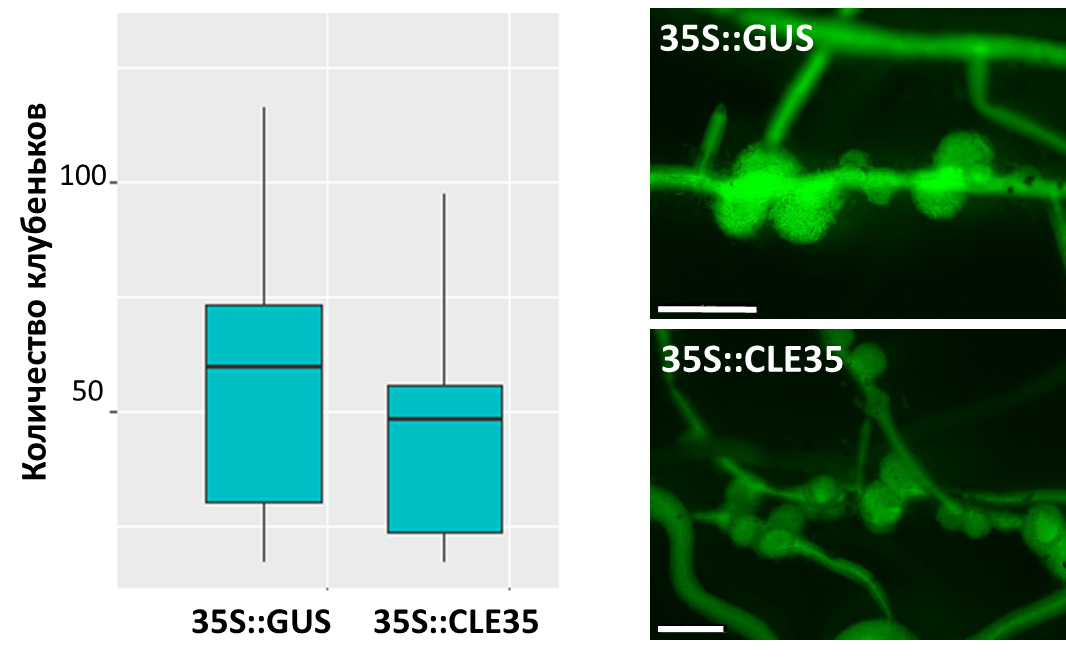
1). Выявление предполагаемых рецепторов нитрат-регулируемых пептидов CLE: оценка влияния сверхэкспрессии CLE на формирование клубеньков у мутантов по генам предполагаемых рецепторов CLE (MtSUNN, PsSYM28, PsSYM29)

2) Изучение регуляторных областей генов *CLE* гороха и люцерны с целью выявления консервативных регуляторных элементов NRE (nitrate response elements)

1. **Оценка эффекта сверхэкспрессии *MtCLE35* на формирование симбиотических клубеньков у мутантных растений люцерны sunn-4, несущему мутацию в гене CLV1-подобной рецепторной киназы SUNN**

У бобовых растений некоторые пептиды CLE принимают участие в регуляции развития азотфиксирующих клубеньков, формируемых в результате симбиотического взаимодействия с почвенными бактериями рода *Rhizobium*. Результатом работы данной регуляторной системы является подавление формирования избыточного количества клубеньков.

Для выявления предполагаемого рецептора пептида MtCLE35 у люцерны мы проанализировали влияние сверхэкспрессии гена *MtCLE35* на развитие симбиотических клубеньков у мутанта по гену *MtSUNN*, кодирующему CLV1-подобную рецепторную киназу, которая, как было показано ранее, работает в побеге. Для этого штаммом *Agrobaterium rhizogenes,* несущим конструкцию для сверхэкспрессии гена *MtCLE35* (35S::MtCLE35), полученную в ходе предыдущего этапа работы, были трансформированы проростки люцерны мутантной линии *sunn-4,* в качестве контроля использовали конструкцию для сверхэкспрессии репортерного гена *GUS* (35S::GUS). Полученные трансгенные корни (которые отбирали по флуоресценции репортерного белка GFP) инокулировали штаммом ризобий *Sinorhizobium meliloti* 2011 для индукции образования клубеньков. Оценку количества клубеньков проводили на 21 день после инокуляции. Мы обнаружили, что у суперклубенькообразующего мутанта *sunn-4* сверхэкспрессия *MtCLE35* не приводит к снижению количества симбиотических клубеньков (см. Рисунок 1).



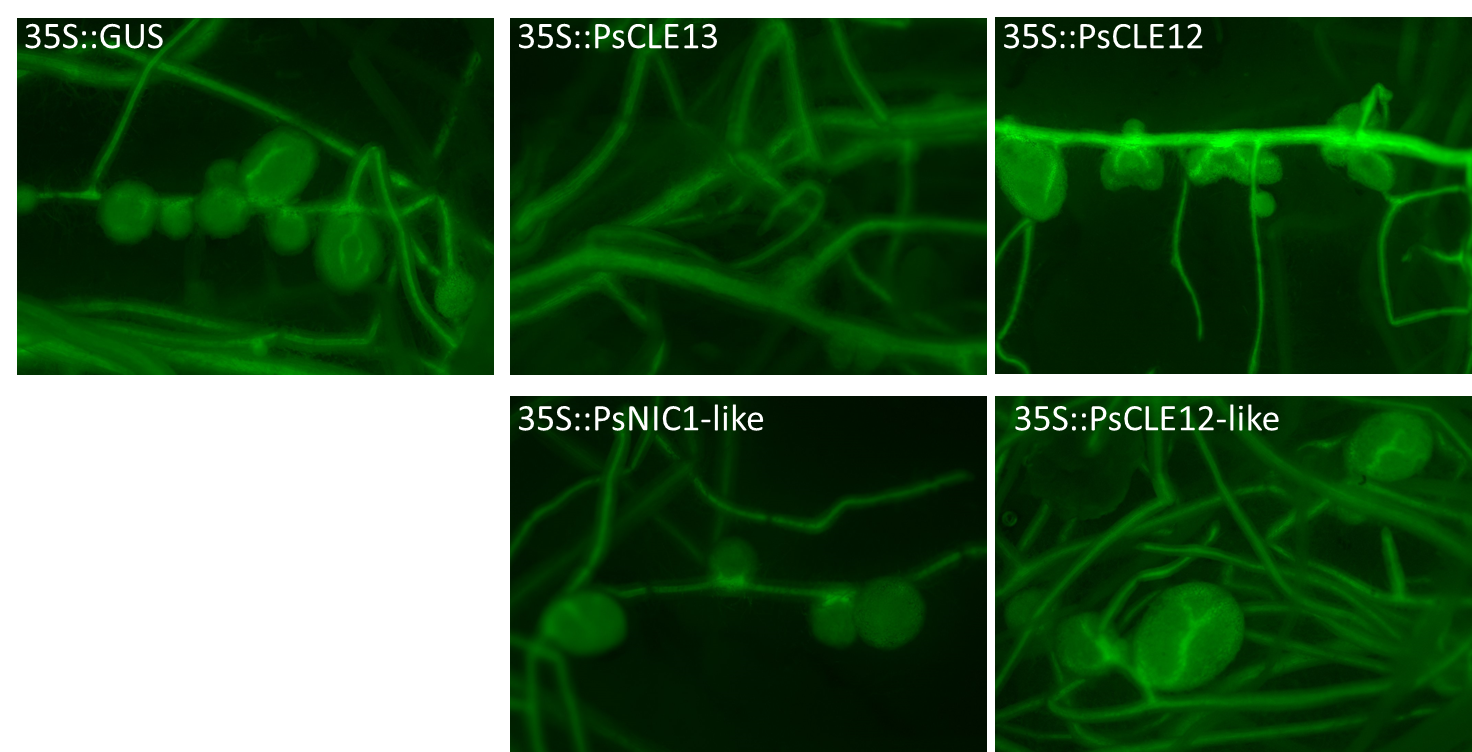
**Рисунок 1.** Оценка эффекта сверхэкспрессии *MtCLE35* на формирование симбиотических клубеньков у мутантных растений люцерны *sunn-4*. 35S::GUS - сверхэкспрессия репортерного гена *GUS* (контроль); 35S::MtCLE35 – сверхэкспрессия *MtCLE35*.

Вместе с этим, у растений дикого типа, как мы показали ранее, сверхэкспрессия *MtCLE35* практически полностью подавляла закладку симбиотических клубеньков. Таким образом, для проявления эффекта сверхэкспрессии *MtCLE35* необходим функциональный продукт гена *MtSUNN.* Полученный результат указывает на то, что в рецепции пептида MtCLE35 задействована рецепторная киназа SUNN, как это ранее было показано для пептидов MtCLE12 и MtCLE13 (Mortier et al., 2010).

1. **Оценка эффекта сверхэкспрессии генов *CLE* гороха на клубенькообразование**

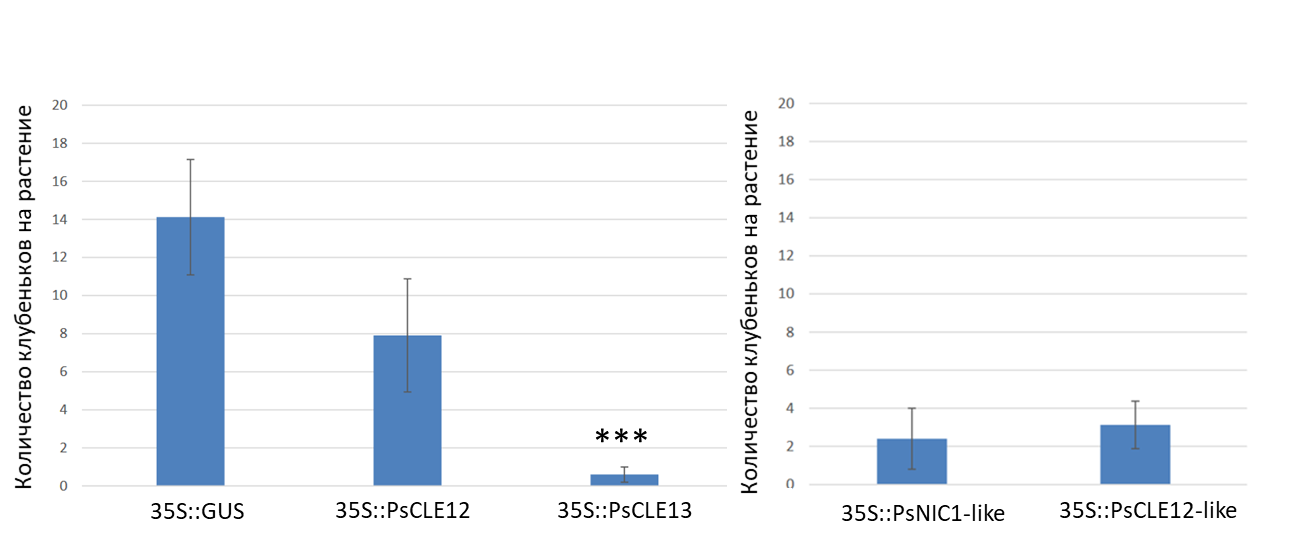
На предыдущем этапе работы нами были получены конструкции для сверхэкспрессии четырёх генов *CLE* гороха: *PsCLE13, PsCLE12* и *PsCLE12-like* и *PsNIC1-like.* Полученные конструкции были введены в штамм *A. rhizogenes* Arqua и использованы для трансформации проростков гороха. В качестве контроля использовали конструкцию для сверхэкспрессии гена бета-глюкуронидазы (35S::GUS). Конструкции для сверхэкспрессии включают кодирующие области соответствующих генов под контролем конститутивного промотора 35S в векторе назначения pB7WG2D, который также содержит кассету для экспрессии флуоресцентного маркера GFP, позволяющую производить отбор трансгенных корней по флуоресценции GFP после трансформации с помощью *A. rhizogenes*.

Трансформацию гороха проводили способом, позволяющим сохранить собственную корневую систему растения. Проростки гороха на 2-7 день помещали на чашки Петри, содержащие среду Farhaeus, по 4-6 проростка на чашку. Трансформацию осуществляли следующим образом: стерильной иглой от шприца прокалывали корень проростка в верхней части. Затем на место прокола иглой наносили суспензию агробактерий. После этого культивирование растений проводили в течение 7-10 дней на твердой питательной среде Farhaeus до формирования видимого каллуса в месте повреждения, и пересаживали в горшки, заполненные вермикулитом. Из каллусов в последствие формировались трансгенные корни, которые отбирали по флуоресценции репортерного белка GFP. Через 1-2 недели после пересадки в вермикулит растения гороха инокулировали штаммом ризобий *Rhizobium leguminosarum* CIAM 1026, и оценивали количество клубеньков через 4 недели после инокуляции (Рисунок 2, 3)

****

**Рисунок 2**. Микрофотографии трансгенных корней гороха со сверхэкспрессией генов *PsCLE13* (35S::PsCLE13)*, PsCLE12* (35S::PsCLE12)*, PsNIC1-like* (35S::PsNIC1-like)*, PsCLE12-like* (35S::PsCLE12-like)*,* и *GUS* ((35S::GUS)*,* контроль) через 4 недели после инокуляции.

Для вариантов со сверхэкпрессией генов *PsCLE13* (35S::PsCLE13)*, PsCLE12* (35S::PsCLE12) и контроля (35S:GUS)нами было проведено два эксперимента, в которых было проанализировано около 13-15 растений на вариант, что позволило нам провести статистическую обработку полученных результатов. Сверхэкспрессия *PsCLE13* приводит к значительному снижению числа клубеньков на трансгенных корнях, тогда как сверхэкспрессия гена *PsCLE12,* хотя и снижала среднее количество клубеньков, но такое снижение не было статистически значимым (Рисунок 3).

****

**Рисунок 3**. Оценка влиянии сверхэкспрессии генов *PsCLE12 (35S::PsCLE12)* и *PsCLE13 (35S::PsCLE13)* на число симбиотических клубеньков у гороха (\*\*\*p<0,001, t-тест). 35S:GUS - контроль

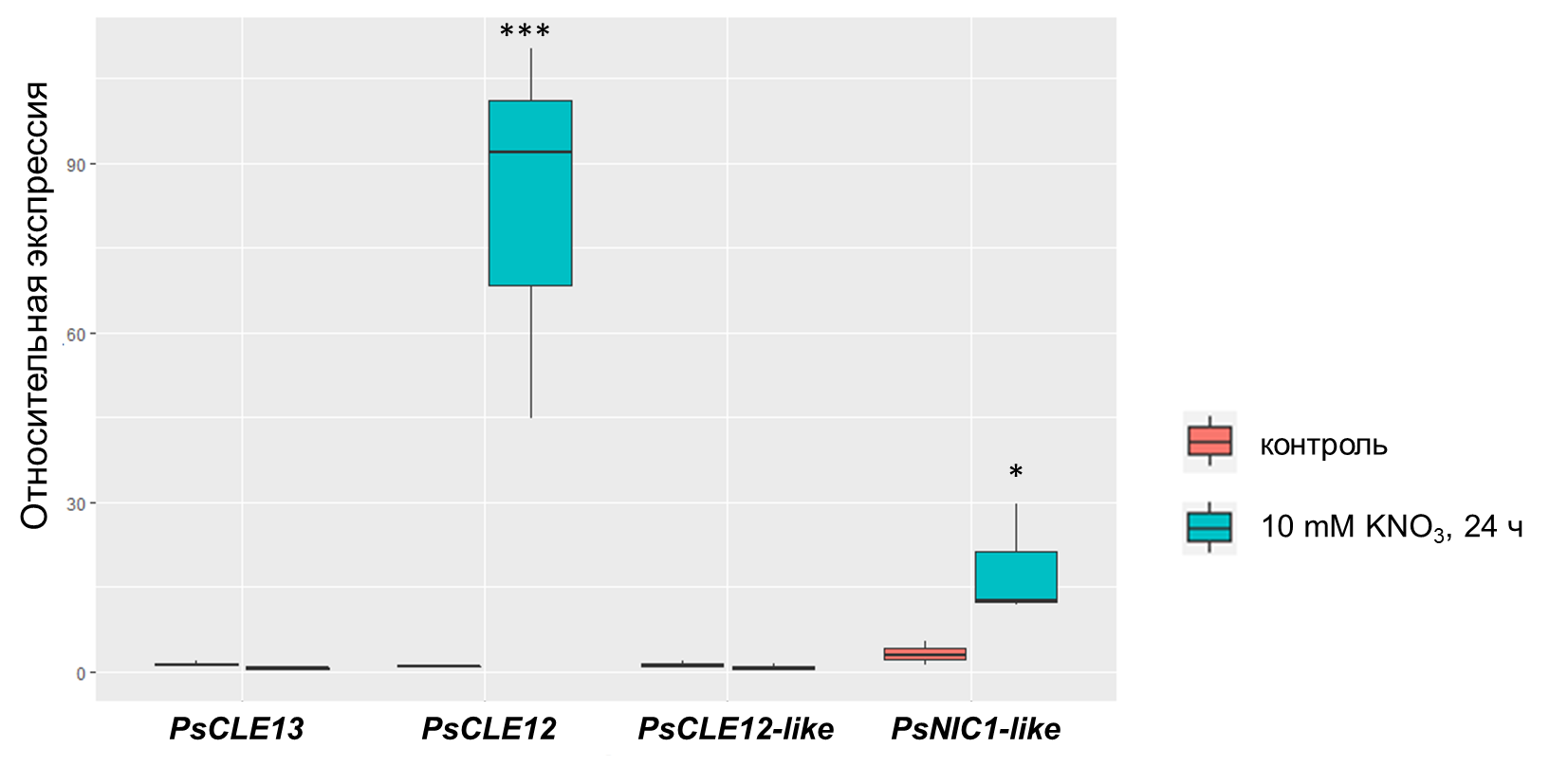
Для вариантов со сверхэкспрессией генов PsCLE12-like (35S::PsCLE12) и PsNIC1-like (35S::PsNIC1-like) мы провели только один эксперимент, в котором количество выживших после трансформации растений было невелико, около пяти растений на вариант. При этом трансгенных корнях растений 35S::PsCLE12 и 35S::PsNIC1-like мы наблюдали образование клубеньков (см. Рисунок 2), но их количество было снижено. Однако для окончательного вывода о роли *PsCLE12-like* и *PsNIC1-like* в развитии клубеньков нам необходимо провести дополнительные биологические повторности с большим количеством растений для возможности адекватного статистического анализа полученных результатов.

Таким образом, сверхэкспрессия гена *PsCLE12* статистически значимо не подавляет образование клубеньков на трансгенных корнях, тогда как сверхэкспрессия *PsCLE13* приводит к статистически значимому снижению количества клубеньков. Таким образом, *PsCLE13,* вероятно, является ингибитором клубенкьообразования, также как и его ближайший гомолог у люцерны, ген *MtCLE13*. На следующем этапе мы планируем провести дополнительные повторности для получения окончательных выводов о роли анализируемых генов *PsCLE* в клубенькообразовании у гороха.

**3. Оценка уровней экспрессии генов *PsCLE* у гороха при обработке нитратом**

В ходе предыдущего этапа выполнения проекта мы показали, что экспрессия генов *MtCLE34* и *MtCLE35* люцерны, а также ряда генов *CLE* у гороха активируется как при развитии клубеньков в ответ на инокуляцию ризобиями, так и при обработке нитратом (10 мМ KNO3 в течение24 часов). Данные по регуляции экспрессии гена *MtCLE35* с участием нитрата были опубликованы нами в работе Lebedeva et al., 2020. За отчетный период нами была проведена дополнительная повторность по оценке уровней экспрессии генов *CLE* гороха при обработке нитратом.

Мы проанализировали экспрессию генов *CLE* в ответ на обработку нитратом (10 мМ KNO3) в течение 24 часов. В данном эксперименте проростки гороха выращивали на агаризованной питательной среде на чашках Петри, и для обработки нитратом в питательную среду добавляли KNO3 до конечной концентрации 10 мМ, Через 24 часа после обработки из корней проростков гороха выделяли РНК, синтезировали кДНК и затем оценивали уровни экспрессии генов с помощью ПЦР в реальном времени. Уровни экспрессия генов *PsCLE12* и *PsNIC-like* увеличивались при обработке нитратом, тогда как значительных изменений в уровнях экспрессии генов *PsCLE13* и *PsCLE12-like* при нитратной обработке по сравнению с контролем обнаружено не было (Рисунок 4).

** Рисунок 4.** Относительные уровни экспрессии генов *PsCLE13, PsCLE12, PsCLE12-like* и *PsNIC-like* при обработке нитратом (10 мМ KNO3) в течение 24 часов и в контроле. (\*\*\* p < 0,01, \* p <0,05, t-тест).

Как и в прошлом эксперименте, мы наблюдали статистически значимое увеличение уровней экспрессии генов *PsCLE12* и *PsNIC-like* через 24 часа после обработки нитратом. Однако, в отличие от прошлого эксперимента, увеличения экспрессии гена *PsCLE13* в ответ на нитрат выявлено не было. В ходе следующего этапа работы мы планируем повторить эксперимент по обработке растений гороха нитратом с использование различных концентраций нитрата (5мМ, 10 мМ KNO3) и разных сроков обработки (24 ч и 48 ч).

**4. Изучение регуляторных областей генов *CLE* гороха и люцерны с целью выявления консервативных регуляторных элементов NRE (nitrate response elements)**

Известно, что в промоторах генов, активируемых при действии нитрата, присутствуют консервативные регуляторные элементы NRE (nitrate response elements) (Konishi and Yanagisawa, 2013). Такие регуляторные последовательности были обнаружены, в частности, в промоторах генов нитратных транспортеров, а также ряда генов, регулирующих развитие растений. У арабидопсиса и других растений были выявлены ключевые транскрипционные факторы, связывающиеся с NRE, которые относят к группе NIN-подобных белков (NIN-like proteins, NLP) (см. Konishi and Yanagisawa, 2013). У арабидопсиса ТФ NLP7 является основным активатором экспрессии генов первичного ответа на нитрат, и как предполагается, его активность контролируется за счет фосфорилирования, необходимого для транспорта этого ТФ в ядро (Marchive et al., 2013).

У бобового растения лядвенца японского в промоторе гена *CLE-RS2*, кодирующего регуляторный пептид CLE, подавляющий развитие клубеньков, были выявлены регуляторные последовательности NRE, с которыми связывается транскрипционный фактор NRSYM1/LjNLP4 из семейства NLP (Nishida et al., 2018). Было показано, что сайты связывания NLP по консенсусной последовательности близки к сайтам связывания транскрипционного фактора NIN – ключевого регулятора программы симбиоза у бобовых растений, который также относится к группе NIN-подобных белков. Таким образом, было показано, что ТФ NIN и NLP связываются со схожими цис-регуляторными элементами в генах-мишенях.

В ходе 2021 года были опубликованы две работы (Moreau et al., 2021; Luo et al., 2021), в которых было показано, что у люцерны ген *MtCLE35* (роль которого была изучена нами в ходе предыдущего этапа выполнения работы), регулируется с участием транскрипционного фактора MtNLP1. В промоторе гена *MtCLE35* также были выявлены регуляторные элементы NRE, соответствующие по консенсусной последовательности сайтам, охарактеризованным Nishida с соавторами (Nishida et al., 2018). В ходе данного этапа работы в промоторах генов *CLE* гороха мы также провели поиск регуляторных элементов NRE по консенсусной последовательности Nishida et al., 2018

Также совсем недавно было показано, что ТФ NIN и NLP работают в виде димеров (Nishida et al., 2021). Кроме того, несмотря на то, что сайты связывания ТФ NIN и NLP, как было показано ранее, имеют общую консенсусную последовательность, на основании анализа большого числа последовательностей генов-мишеней транскрипционных факторов NIN и NLP у лядвенца было показано, что гомодимеры NIN и гомодимеры NLP различаются по специфичности связывания с ДНК (Nishida et al., 2021). Ряд генов-мишеней, в частности, многих генов, вовлеченных в программу развития симбиоза, активируется с участием гомодимеров NIN. При этом взаимодействие NIN с NLP (образование гетеродимеров NIN-NLP) снижает вероятность образования гомодимеров NIN, необходимых для активации целого ряда симбиотических генов. В результате, транскрипционные факторы NLP, активация работы которых происходит при запуске ответа на нитрат, способны подавлять экспрессию многих генов-мишеней NIN, и таким образом, препятствовать запуску программы симбиоза в присутствии нитрата. В свою очередь, гомодимеры ТФ NLP опосредуют активацию экспрессии генов-мишеней в ответ на действие нитрата, и при этом образование гетеродимеров NIN-NLP приводит к снижению уровня экспрессии нитрат-зависимых генов (Nishida et al., 2021). Однако, некоторые гены *CLE*, участвующих в системном контроле численности клубеньков, содержат как NLP-специфичные, так и NIN-специфичные сайты связывания, и следовательно, они могут активироваться как в ответ на нитрат с участием NLP, так и в ответ на действие сигнального каскада, активируемого ризобиями, с участием NIN. В последней работе Nishida и соавторов были определены консенсусные последовательности в сайтах связывания для NIN и NLP в отдельности (Nishida et al., 2021). Взяв их за основу, мы провели поиск схожим регуляторных элементов в промоторах генов *CLE* у гороха и люцерны.

Таким образом, в рамках данной задачи мы провели поиск регуляторных последовательностей NRE в соответствии с консенсусной последовательностью Nishida et al., 2018, а также мотивов, соответствующих сайтам связывания NIN и NLP по данным Nishida et al., 2021.

**4.1. Поиск мотива NRE в промоторных областях генов *CLE* гороха и люцерны по консенсусной последовательности, охарактеризованной в работе Nishida et al., 2018**

В работе Nishida и соавторов 2018 г. были определены сайты связывания ТФ NIN (NBS) и NLP (NRE) в генах-мишенях (три сайта связывания NIN и NLP в гене *CLE-RS2,* сайты связывания NIN в гене *LjNF-YB1*, NRE в гене *LjNIR1*), которые соответствуют последовательности TGACCCTTARTYHHHDBVAARRG, см. Рисунок 5.



**Рисунок 5.** Консенсусная последовательность сайтов связывания ТФ NIN и NLP по данным Nishida et al., 2018.

Мы провели поиск данного мотива в промоторах генов *CLE* гороха (*PsCam040702 (PsCLE13), PsCam041632 (PsCLE12), PsCam040984 (PsCLE12-like)* и *PsCam041632 (PsNIC-like)* и генов *MtCLE34* и *MtCLE35* люцерны с помощью двух алгоритмов, MAST (Motif Alignment & Search Tool) и FIMO (Find Individual Motif Occurences), доступных в пакете программ MEME (<https://meme-suite.org/meme/index.html>). В качестве промоторов нами были взяты последовательности нуклеотидов длиной 5 тысяч пар оснований, расположенные до старт-кодона для каждого из анализируемых генов. В таблице 1 приведены мотивы, выявленные в генах *PsCLE13, PsCLE13 и PsCLE12-like* с помощью алгоритма MAST, при этом звездочкой отмечены те мотивы, которые также были найдены с помощью алгоритма FIMO. Всего с помощью данного подхода нами было выявлено по одному мотиву NRE в генах *PsCLE12* и *PsCLE13*, которые расположены на расстоянии около 1650-1700 п.о. от старт-кодона, а также два мотива в гене *PsCLE12-like*, расположенных на расстоянии около 2980 и 3840 нуклеотидов до старт-кодона. В гене *PsNIC1-like* не было выявлено NRE на основании консенсусной последовательности по данным Nishida et al., 2018.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Ген | NRE/NBS | Ориентация  +/- | Расположение  (п.о. от ATG) |
| PsCLE13 | **taaccccttgtacagaaaaagga** | **+** | **-1718.. -1696.. -\*** |
| PsCLE12 | **TAATCCTTATTCCATATCTAGAA** | **-** | **-1642.. -1664\*** |
| PsCLE12-like | **tgatcttggactttttggaaagg** | **+** | **-3844.. – 3822\*** |
| **cttttgggactcatggaagatca** | **-** | **-2984.. - 2962** |

**Таблица 1.** Мотивы, схожие с консенсусной последовательностью NRE/NBS по данным Nishida et al., 2018, выявленные в генах *PsCLE* с помощью алгоритма MAST. \* - эти мотивы были также определены с помощью алгоритма FIMO

Аналогичным образом мы провели поиск NRE/NBS по данным Nishida et al., 2018 в промоторах генов *MtCLE34* и *MtCLE35* (см. Таблицу 2).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Ген | NRE/NBS | Ориентация  +/- | Расположение (п.о. от ATG) |
| MtCLE35 | TGACCCTTAAGCCTTGGAAGGGA | + | -4513..- 4491\* |
| TGACCTCTTTCAAAAAAAAAAAA | + | **-3518.. – 3496\*** |
| TGATCCCTCATTCAATGGCGGAG | + | **-2251.. – 2229\*** |
| TGATACTTAGTTTACACACAAAA | - | -429.. – 451\* |
| MtCLE34 | tctttgtgcctacataagggtga | - | -3968.. - 3946 |
| tgattttttcaactcatcaaaag | + | **-2579.. – 2557\*** |
| tgaactttgattttaatataaag | + | -112.. - -90\* |

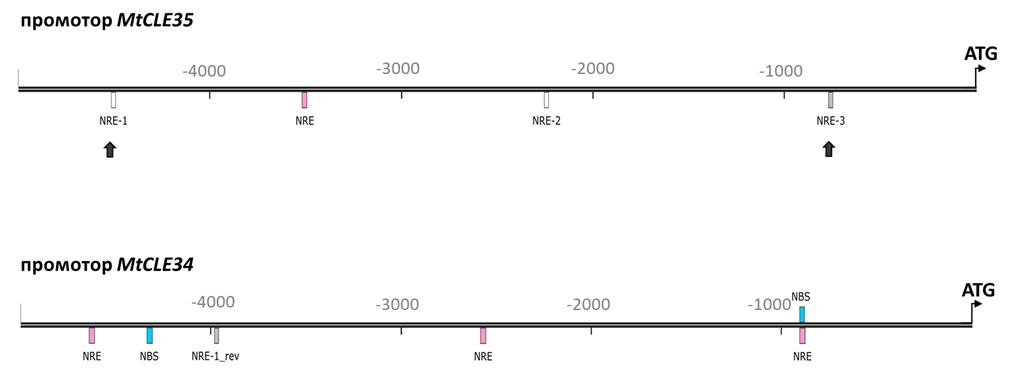
**Таблица 2.** Мотивы, схожие с консенсусной последовательностью NRE/NBS по данным Nishida et al., 2018, выявленные в генах *MtCLE34* и *MtCLE35* с помощью алгоритма MAST. \* - эти мотивы были также определены с помощью алгоритма FIMO

С помощью алгоритма MAST было выявлено 4 таких мотива NRE/NBS в гене *MtCLE35* и три – в гене *MtCLE34.*

**4.2. Поиск мотива NRE и NBS в промоторных областях генов *CLE* на основании сайтов связывания ТФ NLP и NIN, охарактеризованных в работе Nishida et al., 2021**

На основании последовательностей большого числа сайтов связывания ТФ NIN и NLP (LjNLP4) в промоторах генов-мишеней у лядвенца, выявленных методом DAP-seq (DNA affinity purification-seq approach, секвенирование фрагментов ДНК, выделенных на основании аффинности), приведенных в работе Nishida et al., 2021, нами были определены консенсусные мотивы с помощью алгоритма MEME (Multiple Em for Motif Elicitation, <https://meme-suite.org/meme/tools/meme>). На основании этих мотивов был проведен поиск схожих последовательностей в промоторах изучаемых генов *CLE* гороха и люцерны с помощью алгоритмов FIMO (<https://meme-suite.org/meme/tools/fimo>) и MAST (<https://meme-suite.org/meme/tools/mast>).

Расположение выявленных нами сайтов связывания NBS и NRE в промоторе генов *MtCLE34* и *MtCLE35* с помощью алгоритма MAST приведено на Рисунке 6.



**Рисунок 6.** Расположение мотивов, схожих с консенсусными последовательностями NBS (обозначены розовыми прямоугольниками) и NRE (обозначены голубыми прямоугольниками) по данным Nishida et al., 2021, выявленные в генах *MtCLE35* и *MtCLE34* с помощью алгоритма MAST. ATG обозначает старт кодон, числа обозначают количество нуклеотидов до старт-кодона. Серые прямоугольники обозначают сайты NRE, выявленные также в работах Moreau et al., 2021 и Luo et al., 2021. Черные стрелки указывают на сайты NRE, с которыми было показано связывание ТФ MtNLP1 в работе Luo et al., 2021.

С помощью данного подхода в промоторе гена *MtCLE35* были выявлены только предполагаемые сайты связывания NLP, тогда как в промоторе MtCLE34 было выявлено три сайта NRE и два сайта NBS, при этом одна из предполагаемых регуляторных последовательностей была определена и как предполагаемый сайт связывания NIN, и как сайт связывания NLP.

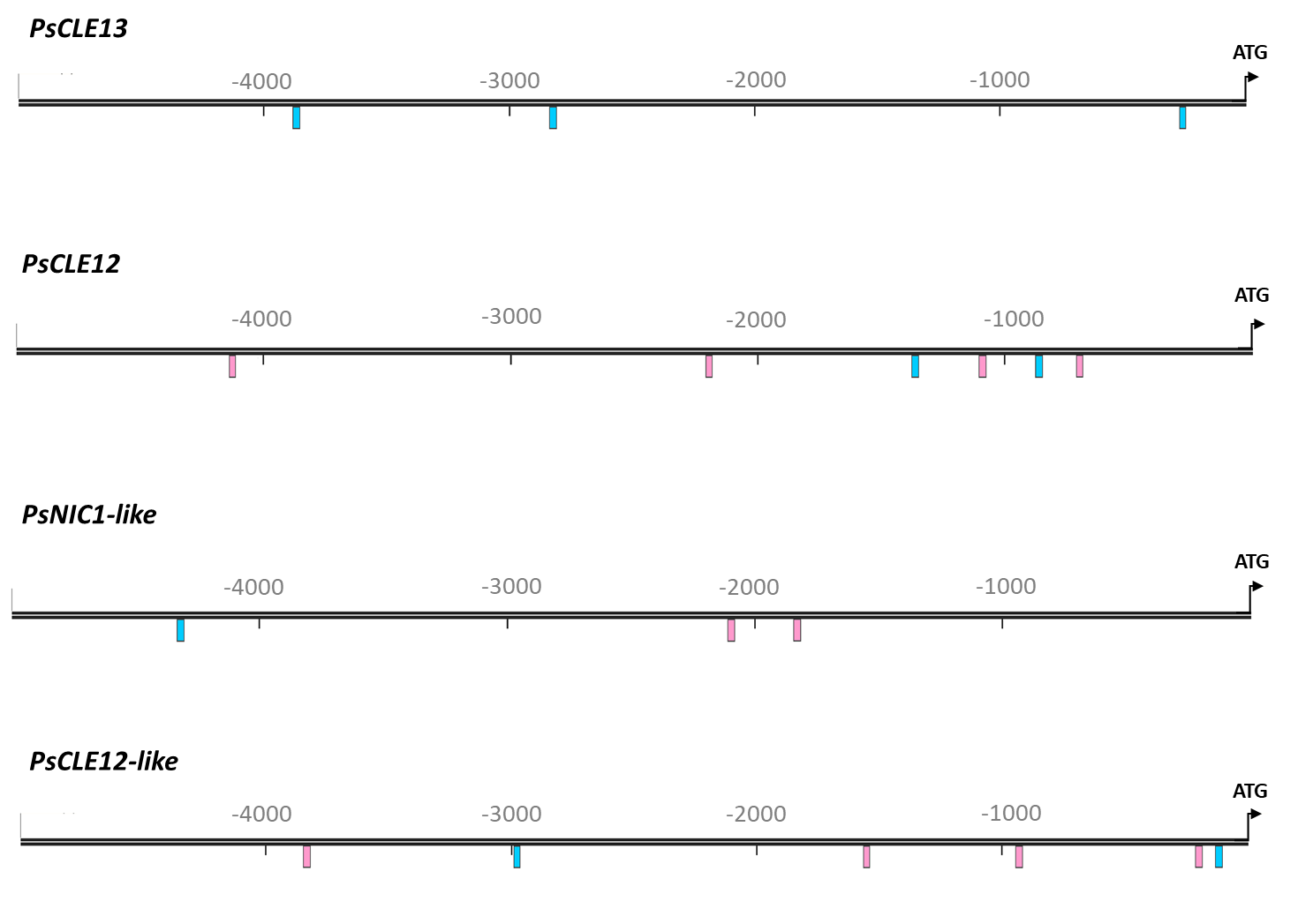
В работе Luo и соавторов (Luo et al., 2021) совсем недавно было показано связывание ТФ MtNLP1 с двумя сайтами NRE в гене *MtCLE35*, обозначенными на рисунке чёрными стрелками. Таким образом, наше предположение о том, что ТФ NLP опосредует активацию экспрессии гена *MtCLE35* в ответ на действие нитрата, было подтверждено в работе Luo и соавторов.

Мы также провели поиск последовательностей сайтов NBS и NRE по данным Nishida et al., 2021 в промоторах генов *CLE* у гороха. В Таблице 3 приведены выявленные нами мотивы, которые были найдены с помощью алгоритма MAST. В верхней строке приведены консенсусные последовательности предполагаемых сайтов NBS и NRE в промоторах генов *PsCLE* гороха, построенные с помощью приложения WebLogo 3 (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). Можно отметить, что сайты NBS и NRE напоминают вырожденные палиндромные последовательности, при этом сайты NBS в меньшей степени напоминают палиндромы, по сравнению с NRE.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Промотор  гена | Сайты связывания NIN (NBS) | Сайты связывания NLP (NRE) | +/- | расположение  (п.о. от ATG) |
|  |  |  |  |  |
| *PsCLE13* | atctccatgctcggatgtaaaagacac |  | + | -3880.. -2854\* |
| cggtttttaacagaaaccaagaggtat |  | + | -3833.. – 2807\* |
| TGGCCAAAAAAAAGTGGGAAAGGTTAC |  | - | -240.. - -266\* |
| *PsCLE12* |  | agccctaacctatgcctctagggcctc | + | -4138.. - 4112 |
|  | ttaattttttttaatacaaggggataa | + | -2208.. -2182\* |
| GAATCTCTCATCTGATGGAAGAGTTCC |  | - | -1348.. – 1374\* |
|  | acaccataggcttgcacaagaggcaat | + | -1100.. - 1074 |
| TATTCTTTTTATGAAATCAAAAGCCTC |  | -/+ | -845.. – 871\* |
|  | tagacattacaatttataagaggagaa | + | -708.. -682\* |
| *PsNIC1-like* | ttgtctctatggttaaacaaatgatga |  | - | -4304.. -4330\* |
|  | tacattttttattatataaaagggaaa | + | -2107.. – 2081\* |
|  | tcaacttagtaactgattagggataaa | + | -1840.. – 1814\* |
| *PsCLE12-like* |  | TCACCTTTCCAAAAAGTCCAAGATCAT | - | -3820.. -3845\* |
| TGATCTTCCATGAGTCCCAAAAGTCAA |  | - | -2962.. -2988\* |
|  | tgaatctaaactctctcaaaagaccaa | + | -1563.. -1537\* |
|  | TCGAGTTTGTCATACTCCAAAACTCAC | - | -914.. -940\* |
|  | ttcctttaacctaattttaaaagttaa | + | -208.. -182\* |
| tctctcttagagtgaatgaaaaaacaa |  | +/- | -127.. -101\* |

**Таблица 3.** Мотивы, схожие с консенсусными последовательностями NBS (сайты связывания NIN) и NRE (сайты связывания NLP) по данным Nishida et al., 2021, выявленные в генах *PsCLE* с помощью алгоритма MAST. \* - эти мотивы были также определены с помощью алгоритма FIMO

С помощью алгоритма MAST в промоторе гена *PsCLE13* выявлено три предполагаемых сайта NBS (при этом сайтов NRE выявлено не было), два сайта NBS и четыре NRE в промоторе *PsCLE12,* два сайта NRE и один сайт NBS в гене *PsNIC1-like*, а также четыре сайта NRE и два NBS в гене *PsCLE12-like*. Расположение сайтов NRE и NBS в промоторах генов *PsCLE* схематично изображено на Рисунке 7.



**Рисунок 7.** Расположение мотивов, схожих с консенсусными последовательностями NBS (обозначены розовыми прямоугольниками) и NRE (обозначены голубыми прямоугольниками) по данным Nishida et al., 2021, выявленные в генах *PsCLE* с помощью алгоритма MAST. ATG обозначает старт кодон, числа обозначают количество нуклеотидов до старт-кодона.

В гене *PsCLE13* с помощью алгоритма MAST нами не было выявлено последовательностей NRE, были обнаружены только предполагаемые сайты связывания NIN (NBS), что может указывать на то, в регуляции экспрессии этого гена может быть задействован ТФ NIN, но не NLP. Это согласуется с данными по экспрессии гена: экспрессия *PsCLE13* возрастает на ранних этапах клубенькообразования, и можно предположить, что за ее активацию ответственен ТФ NIN. При этом по данной второй повторности, экспрессия *PsCLE13* не увеличивается при обработке нитратом, и этот факт согласуется с тем, что в промоторе *PsCLE13* нами не были обнаружены сайты связывания NLP*.*

На следующем этапе работы запланировано проведение анализа связывания выявленных нами регуляторных последовательностей c ТФ NLP и NIN, что мы планируем осуществить с помощью одногибридной дрожжевой системы и/или метода EMSA (анализ сдвига электрофоретической подвижности). Это позволит нам получить данные о том, с помощью каких факторов регулируется экспрессия охарактеризованных нами “клубеньковых” генов *PsCLE* у гороха.

**Заключение**

Таким образом, за отчетный период мы показали, что сверхэкспрессия гена *MtCLE35* не приводит к снижению количества клубеньков у мутанта *sunn-4*, несущего мутацию в гене, кодирующем рецепторную киназу MtSUNN, в отличие от дикого типа, что указывает на то, что рецепторная киназа MtSUNN задействована в рецепции пептида MtCLE35. Также мы проанализировали эффект сверхэкспрессии генов *PsCLE* на клубенькообразование у гороха и впервые обнаружили, что сверхэкспрессия *PsCLE13* приводит к статистически значимому снижению количества клубеньков на трансгенных корнях, тогда как сверхэкспрессия *PsCLE12* значимо не подавляет число клубеньков. Для двух других генов CLE, *PsCLE12-like* и *PsNIC1-like* необходимо провести дополнительные повторности для определения их роли в ходе клубенькообразования.

Кроме того, мы провели повторный эксперимент по обработке проростков гороха нитратом, в котором была подтверждена активация экспрессии *PsCLE12* и *PsNIC1-like* в ответ на действие нитрата. В промоторах генов *CLE* гороха и люцерны с помощью различных подходов мы выявили предполагаемые сайты связывания ТФ NLP и NIN.

**Список литературы**

1. Okamoto S., Ohnishi E., Sato S., Takahashi H., Nakazono M., Tabata S., Kawaguchi M., Nod Factor/Nitrate-Induced *CLE* Genes that Drive HAR1-Mediated Systemic Regulation of Nodulation// Plant and Cell Physiology. 2009. V.50(1). P.67–77.
2. Mortier V., Den Herder G., Whitford R., Van de Velde W., Rombauts S., D’haeseleer K., Holsters M., Goormachtig S., CLE Peptides Control *Medicago truncatula* Nodulation Locally and Systemically// Plant Physiology. 2010. V.153. P.222–237.
3. Lebedeva M., Azarakhsh M., Yashenkova Y., Lutova L., Nitrate-Induced CLE Peptide Systemically Inhibits Nodulation in *Medicago truncatula*// Plants. 2020. V.9. P.1456.
4. Konishi M., Yanagisawa S., Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signaling// Nature Communications. 2013. V.4(1617). P.1–9.
5. Nishida H., Tanaka S., Handa Y., Ito M., Sakamoto Y., Matsunaga S., Betsuyaku S., Miura K., Soyano T., Kawaguchi M., Suzaki T., A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicas*// Nature Communications. 2018. V.9(499). P.1–14.
6. Nishida H, Nosaki S, Suzuki T, Ito M, Miyakawa T, Nomoto M, Tada Y, Miura K, Tanokura M, Kawaguchi M, Suzaki T. Different DNA-binding specificities of NLP and NIN transcription factors underlie nitrate-induced control of root nodulation // Plant Cell. 2021. V. 33(7). P. 2340-2359. doi: 10.1093/plcell/koab103. PMID: 33826745; PMCID: PMC8364233.
7. Moreau C, Gautrat P, Frugier F. Nitrate-induced CLE35 signaling peptides inhibit nodulation through the SUNN receptor and miR2111 repression. Plant Physiol. 2021 Apr 2;185(3):1216-1228. doi: 10.1093/plphys/kiaa094. PMID: 33793938; PMCID: PMC8133669.
8. Luo Z, Lin JS, Zhu Y, Fu M, Li X, Xie F. NLP1 reciprocally regulates nitrate inhibition of nodulation through SUNN-CRA2 signaling in *Medicago truncatula* // Plant Commun. 2021. V. 2(3). P. 100183. doi: 10.1016/j.xplc.2021.100183. PMID: 34027396; PMCID: PMC8132174.