

- сти // Факторы экспериментальной эволюции организмов. – К.: ЛОГОС, 2010. – Т. 8. – С 449–453.
11. Жук О.И. Адаптивная эволюция водного режима и засухоустойчивости растений // Факторы экспериментальной эволюции организмов. – К.: ЛОГОС, 2010. – Т. 8. – С. 12–16.
 12. Козлов Н.Н., Коровина В.Л., Клименко И.А. и др. Особенности формирования исходного материала кормовых трав // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – С-П., 2009. – Т. 166. – С. 131–135.
 13. Вавилов Н.И. Избр. соч. // Генетика и селекция. – М.: Колос, 1966. – 559 с.
 14. Рубцов М.И., Яртиев А.Г. Генетический фонд кормовых культур и использование его в селекции. – В сб.: «Кормопроизводство», 1976. – Вып. 13.

TRUKHAN V.A., KOZLOV N.N., KOROVINA V.A.

All Russian Williams Fodder Research Institute

RF, 141055, Moscow reg., Lobnya, the Scientific town str., e-mail: vtrukhan@yandex.ru

THE STRATEGIC IMPORTANCE OF THE GENE POOL OF WILD FLORA OF PERENNIAL GRASSES FOR CREATE ENVIRONMENTALLY SAFE AGRICULTURE IN RUSSIA

Aims. In the conditions of changing climate and aggressive impact of anthropogenic factors on the environment preservation of the gene pool of wild flora of perennial grasses, as a source of selective cross-breeding of valuable genetic material, is of strategic importance for ensuring the environmentally safe agriculture in Russia. **Methods.** Expeditionary collection, storage, reproduction and maintenance of the collection in the laboratory and field conditions. **Results.** Collection of perennial grasses of All Russian Williams Fodder Research Institute has more than 6 thousand specimens of wild-growing and cultural plants. **Conclusions.** Collection of perennial grasses can be more efficiently used for creation of highly productive agricultural varieties and hybrids for different soil-climatic zones of Russia.

Key words: biogeocenosis, the gene pool of wild perennial grasses, the initial breeding material, breeding program, ecology.

ШТАРК О.Ю.¹, ОВЧИННИКОВА Е.С.¹, ЛИМПЕНС Э.², ЖУКОВ В.А.¹, БОРИСОВ А.Ю.¹, ФЕДОРОВА Е.Е.², БИССЕЛИНГ Т.², ТИХОНОВИЧ И.А.¹

¹ *Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии)*

Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3, e-mail: oshtark@yandex.ru

² *Университет Вагенингена, лаборатория молекулярной биологии*

The Netherlands, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB, Wageningen

НОВЫЕ ДАННЫЕ О РОЛИ LRR-РЕЦЕПТОРНОЙ КИНАЗЫ SYM19 В ФОРМИРОВАНИИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА И АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ У ГОРОХА

Бобовые обладают уникальной способностью к формированию, по крайней мере, двух мутуалистических эндосимбиозов – бобово-ризобиального симбиоза (БРС) с протеобактериями различных субклассов [1, 2] и арбускулярной микоризы (АМ) с грибами отдела *Glomeromycota* [3]. Симбиозы характеризуются формированием высокодифференцированных внутриклеточных структур (симбиосом или арбускул, соответственно), окруженных симбиотическими мембранами, обеспечивающими тесную метаболическую интеграцию партнеров.

В отличие от анатомически слабовыраженной АМ, при бобово-ризобиальном симбиозе (БРС) образуется новый орган – азотфиксирующий клубенек, процесс развития которого

включает две независимые четко скоординированные между собой подпрограммы: колонизации и органогенеза клубенька [4]. У большинства бобовых колонизация растительных тканей клубеньковыми бактериями происходит через клетку корневого волоска по цитоплазматическому тоннелю, выстроенному растением от клетки к клетке, в результате чего образуется инфекционная нить (ИН) [5]. Считается, что эволюционной основой этого процесса является программа колонизации тканей корня АМ грибами [6]. В то время как арбускулы остаются неразрывно связанными с мицелием [7], при развитии БРС у эволюционно продвинутых бобовых «галегоидного» комплекса, к которым относится горох (*Pisum sativum* L.), происходит

эндоцитозоподобный «захват» клубеньковых бактерий цитоплазмой растительной клетки [4, 8, 9]. Бактерии обособляются от ИН, образуются симбиосомы, внутри которых клубеньковые бактерии необратимо дифференцируются в азотфиксирующую форму – бактериоиды [5]. В органогенезе клубенька гороха участвуют две меристемы: сначала во внутренних слоях корня формируется клубеньковый примордий, затем клубенек растет за счет активности апикальной меристемы [2, 10].

Формирование БРС и АМ контролируется сигнальным путем, компоненты которого были идентифицированы с использованием генетических подходов [4]. Микросимбионты выделяют диффундирующие липохитоолигосахаридные молекулы [5, 11], узнавание которых специфическими растительными рецепторами приводит к запуску общего сигнального каскада (от англ. «Common Symbiotic Pathway», CSP). В клетках корня детектируются так называемые «кальциевые волны», активируемые LRR-рецепторной киназой SYM19/DMI2/SYMRK (от англ. «Leucine-Reach Repeats» - богатые лейцином повторы) при участии катионного канала SYM8/DMI1/CASTOR/POLLUX [4, 12]. «Кальциевые волны» воспринимаются кальций/кальмодулин-зависимой киназой SYM9/DMI3/CCaMK [12], которая совместно с белком SYM33/IPD3/CYCLOPS [13, 14] активирует экспрессию последующих симбиотических генов, кодирующих транскрипционные факторы. Нокаут-мутации в генах, кодирующих перечисленные белки, обычно приводят к нарушению проникновения АМ грибов и ризобий в эпидермис и органогенеза клубенька [4, 12, 13].

Материалы и методы

В работе использована мутантная линия гороха RisFixA (*sym41*), индуцированная на генотипе Finale в результате ЭМС-мутагенеза [17]. Семена гороха стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 10 мин и проращивали перед посадкой. Инокуляцию производили штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248lacZ [18]. Полив растений осуществляли раствором без азота [19]. Для изучения развития АМ использовали инокуляционную систему со шнитт-луком (*Allium schoenoprasum* L.) [20], с модификациями. В качестве грибного партнера был использован изолят *Glomus intraradices* N. C. Schenck & G. S. Sm., BEG144.

Анализ развития БРС и АМ производили с использованием световой микроскопии. Анализ развития ИН производили через 16 дней после

Недавние исследования продемонстрировали, что белки CSP, в частности, DMI2 [8]) и IPD3 [13, 14], также важны для формирования симбиосом в клубеньках.

У гороха получен ряд мутантов с нарушениями различных стадий развития симбиосом [4]. С целью получения дополнительной информации о молекулярных механизмах формирования симбиотических компартментов, данное исследование было посвящено изучению мутанта гороха *sym41*, характеризующегося нарушением выхода бактерий из ИН и дифференцировки бактериоидов [15]. В отношении развития БРС мутант *Sym41* проявлял фенотип, сходный с фенотипом мутанта по гену *Sym33*, кодирующему SYM33/IPD3/CYCLOPS, однако комплементационный анализ продемонстрировал, что эти мутанты представляют разные гены [15, 16].

С целью идентификации гена *Sym41*, в данной работе был использован феномен обширной синтении геномов гороха и модельного бобового *Medicago truncatula* Gaertn. С помощью картирования и последующего клонирования *Sym41* в данном исследовании было установлено, что *sym41* представляет «слабую» мутантную аллель гена *Sym19*, кодирующего LRR-рецепторную киназу. Изучение экспрессии гена *Sym19* у мутанта *sym41* в комплексе с его детальным фенотипическим анализом в отношении развития БРС и АМ позволили выявить различные роли SYM19 в формировании этих двух симбиозов, а также разницу в уровнях этого белка, требуемых для успешного развития симбиотических структур на уровне примордия/коры корня и эпидермиса.

инокуляции. Фиксацию и окрашивание тканей корня проводили согласно [21]. Для анализа структуры клубеньков готовили полутонкие срезы [22]. Количественную оценку АМ производили по Трувелю [23] с использованием окрашивания по методике [24].

Для картирования мутации *sym41* растения поколения F₂ от скрещивания линии RisFixA (*sym41*) и NGB1238 (*Sym41*) выращивали без азота и оценивали расщепление по признаку: белые клубеньки Fix⁻ vs. розовые клубеньки Fix⁺. Из листьев каждого растения индивидуально выделяли тотальную ДНК с использованием СТАВ-метода [25]. Условия анализа косегрегации фенотипа Fix⁻ *sym41* с молекулярными CAPS-маркерами приведены в работе Е.С. Овчинниковой [22].

Для проведения количественной ПЦР «в реальном времени» из 21-дневных клубеньков линий *sym41* и Finale (WT) выделяли РНК по методике [9]. В качестве референсного гена использовали *Ubiquitin*. Последовательности праймеров приведены в работе Е.С. Овчинниковой [22].

Тест на аллелизм проводили на материале F₁ от скрещивания линии RisFixA (*sym 41*) с линиями P6 (*sym19*) и Sprint2Nod3 (*sym19*). Ре-

зультаты теста оценивали на основании признаков: 1) количество клубеньков; 2) белые клубеньки Fix⁻ vs. розовые клубеньки Fix⁺.

Трансформацию гороха производили с использованием штамма *Agrobacterium rhizogenes* ARqual, несущего конструкцию *DMI2p::DMI2-GFP* [8, 22].

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием SigmaStat 3.5 для Windows (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.).

Результаты и обсуждение

Анализ развития БРС. Установлено, что мутант отличается сниженным количеством клубеньков. Вместе с тем, у мутанта образуется в 2 раза меньше ИН, при этом, нарушения развития ИН выявляются более чем в 7 раз чаще, чем у исходной линии. Световая микроскопия полутонких срезов клубенька показала, что у мутанта в зоне инфекции (в апикальной части клубенька) нарушены развитие ИН и дифференцировка бактериоидов. Данный фенотип явно демонстрирует необходимость гена в развитии, как инфекции, так и симбиотических компартментов. Тем не менее, в основании клубенька мутанта обнаруживались развитые симбиосомы.

Анализ развития АМ. Показано, что у линии гороха *sym41* мутация проявляется в более низкой скорости микоризации корней, формировании на корнях мутанта гипертрофированных апрессориев и повышении их количества (через 16 дней культивирования), а также более низкой скорости формирования арбускул, по сравнению с исходным генотипом Finale. В то же время предварительный анализ структуры

клеток, содержащих арбускулы, не выявил нарушений в развитии арбускул у мутанта (Зубкова Л.А., неопубликованные данные).

Идентификация гена *Sym41*. С использованием межвидовых маркеров была проведена генетическая локализация гена *Sym41* на генетической карте гороха. На основании результатов картирования, а также фенотипической характеристики мутанта, было предположено, что мутантный ген *sym41* может представлять собой слабую мутантную аллель гена *Sym19*, локализованного в том же районе генетической карты гороха. Созданный на основе последовательности *Sym19* молекулярный маркер продемонстрировал полное сцепление с мутантным фенотипом *sym41*. Последовательность гена *Sym19* была амплифицирована на ДНК гороха линий Finale (WT) и RisFixA (*sym41*) и секвенирована, в результате чего была найдена мутация (A→G) в 3'-сайте сплайсинга интрона 9 в гене *Sym19* (рис. 1).

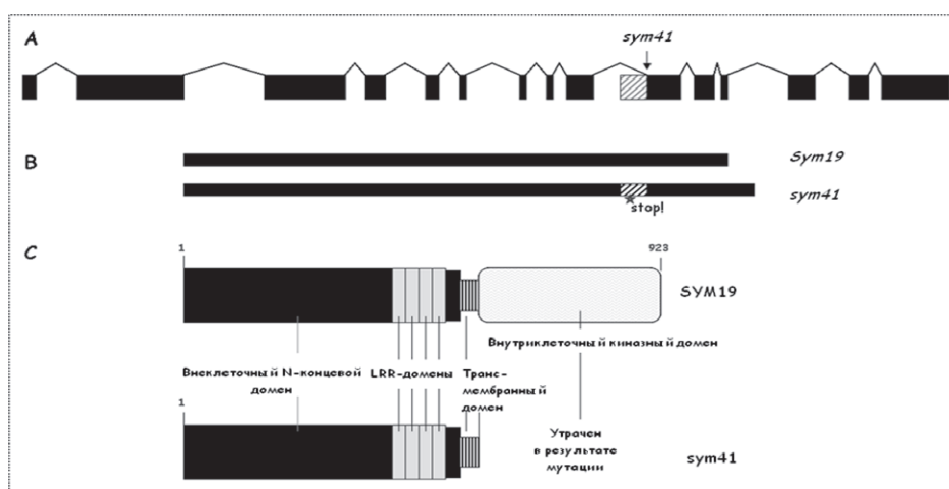


Рис. 1. Структура гена *Sym19* и кодируемого им белка. А – экзон-интронная структура гена *Sym19*; В – транскрипты гена *Sym19* у линии «дикого типа» Finale и мутантной линии RisFixA (*sym41*); С – доменная структура нормального белка SYM19 и его укороченной версии (SYM41)

С использованием количественной ПЦР «в реальном времени» выявлено, что мутация у *sym41* приводит к образованию нового стоп-кодона и, в свою очередь, к синтезу укороченного белкового продукта, лишенного киназного домена. В то же время у мутанта образуется около 11 % нормальных транскриптов, соответствующих WT. Таким образом, подтверждено, что *sym41* представляет слабую мутантную аллель гена *Sym19*.

Комплементационный анализ мутации sym41. Для дополнительного подтверждения того, что *Sym41* действительно кодирует LRR-рецепторную киназу SYM19, использовали классический тест на аллелизм и комплементацию *sym41* гомологичной последовательностью *DMI2* *M. truncatula*. Тест на аллелизм между линией *sym41* и линиями P6 (*sym19*) и Sprint-2Nod-3 (*sym19*) показал, что фенотип растений F1 не отличается от мутантного фенотипа *sym41*, что подтверждает гипотезу об аллельности *sym41* и *sym19*. С использованием световой микроскопии было установлено, что клубеньки мутанта *sym41*, трансформированные конструкцией *DMI2p::DMI2-GFP*, и клубеньки линии Finale (WT) имеют сходную гистологическую структуру, что строго свидетельствует о том, что ген *Sym41* кодирует SYM19/DMI2.

LRR-рецепторная киназа SYM19/DMI2/SYMRK (и ее ортологи) является одним из ключевых белков, участвующих в процессе колонизации корня микроорганизмами при формировании различных мутуалистических симбиозов, таких как АМ, БРС и актиноризные клубеньки [4, 12, 26]. Также установлена роль этого белка в формировании симбиосом в клубеньках бобовых [8]. Данное исследование продемонстрировало, что ЭМС-мутант гороха *sym41*, представляет слабую мутантную аллель гена *Sym19*, ортологичного *DMI2/SYMRK*, и позволило выявить новые механизмы формирования симбиотических компартментов симбиоза.

На основании фенотипического анализа, проведенного в данной работе, в целом, подтверждающего результаты более ранних исследований [10, 15], было выявлено, что мутация у *sym41* приводит к нарушению обеих подпро-

грамм развития БРС у гороха, таких как колонизация (от клетки эпидермиса – корневого волоска до терминальной стадии – формирования симбиосом) и органогенез клубенька. Однако обнаружение у данного мутанта нормальных симбиосом в основании клубенька позволяет предположить, что мутация, приводящая к существенному снижению уровня экспрессии гена *Sym19*, затрагивает процесс их формирования только в зонах клубенька, сформированных в результате активности его апикальной меристемы. Таким образом, на уровне примордия/коры корня для успешного формирования симбиоза требуется более низкий уровень экспрессии *Sym19*. Ранее было показано, что уровень экспрессии гомологичного гена *DMI2* у *M. truncatula* в корнях почти в 2 раза ниже, чем в апикальной части клубенька [8].

Установлено, что в процессе формирования АМ у гороха мутация в этом гене приводит к существенному снижению уровня колонизации. Образование гипертрофированных апрессориев свидетельствует о нарушении прохождения грибом эпидермального барьера [27]. В то же время процесс развития арбускул, локализующихся во внутреннем слое коры, у *sym41* не нарушен. Обнаружение у *Lotus japonicus* мутанта *symrk-14* в гене, ортологичном *Sym19* гороха, имеющего сходный фенотип с *sym41* в отношении развития АМ [20], подтверждает предположение о том, что развитие симбиоза в эпидермисе требует более высоких доз белка SYM19/DMI2/SYMRK по сравнению с клетками коры. Однако сходный эффект на формирование симбиосом и дифференцировку бактериоидов у *symrk-14* лядвенца не был описан.

В целом, недавние работы по изучению растительных мутантов, дефектных в общих симбиотических генах, дают четкие доказательства того, что компоненты общего сигнального пути, контролирующего ранние симбиотические ответы, также важны на более поздних этапах развития БРС. Решение вопроса о том, каким образом CSP регулирует формирование симбиосом, лежащее в основе БРС, является темой будущих исследований.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Соглашение № 8056), грантов: президента РФ (НШ-337.2012.4), РФФИ (12-04-01687; 12-04-32126; 13-04-01702; 13-04-01703), NWO Centre of Excellence (047.018.001).

Литература

1. Balachandar D. Raja P., Kumar K. et al. Non-rhizobial nodulation in legumes // *Biotechnol. Molec. Biol. Rev.* – 20. Vol. 2. – P. 49–57.
2. Sprent, J.I., James, E.K. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 144. – P. 575–581.
3. Schüßler A. Schwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution // *Mycol. Res.* – 2001. – Vol. 105. – P. 1413–1297.
4. Provorov N.A., Shtark O.Y., Zhukov V.A. et al. Developmental genetics of plant-microbe symbioses. – NY, USA: Nova Science Publishers, 2010. – 152 p.
5. Brewin N.J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2004. – Vol. 23. – P. 293–316.
6. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – Vol. 6. – P. 763–775.
7. Genre A., Bonfante P. Building a mycorrhiza cell: how to reach compatibility between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. // *J Plant Interact.* – 2005. Vol. 1. – P. 3–13.
8. Limpens E., Mirabella, R., Fedorova, E. et al. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2* // *PNAS USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 10375–10380.
9. Limpens E., Ivanov, S., van Esse, W. et al. Medicago N₂-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity // *Plant Cell.* – 2009. – Vol. 21. – P. 2811–2828.
10. Voroshilova V.A., Demchenko K.N., Brewin N.J. et al. Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads // *New Phytol.* – 2009. – Vol. 181. – P. 913–923.
11. Maillet F., Poinso V., André O. et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza // *Nature.* – 2011. – Vol. 469. – P. 58–64.
12. Oldroyd G.E., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – Vol. 59. – P. 519–546.
13. Horváth B., Yeun, L. H., Domonkos, A. et al. *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses // *MPMI.* – 2011. – Vol. 24. – P. 1345–1358.
14. Ovchinnikova E., Journet, E. P., Chabaud, M. et al. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* Spp. // *MPMI.* – 2011. – Vol. 24. – P. 1333–1344.
15. Morzhina E.V., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y. et al. Four developmental stages identified by genetic dissection of pea (*Pisum sativum* L.) root nodule morphogenesis // *Plant Science.* – 2000. – Vol. 155. – P. 75–83.
16. Borisov A.Y., Barmicheva, E.M., Jakobi, L.M. et al. Pea (*Pisum sativum* L.) mendelian genes controlling development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza // *Czech J. Genet. Plant Breed.* – 2000. – Vol. 36. – P. 106–110.
17. Engvild K.C. Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea, *Pisum sativum* // *Theor Appl Genet.* – 1987. – Vol. 74. – P. 711–713.
18. Geurts R., Heidstra, R., Hadri, A.E. et al. *Sym2* of pea is involved in a nodulation factor-perception mechanism that controls the infection process in the epidermis // *Plant Physiol.* – 1997. – Vol. 115. – P. 351–359.
19. Borisov A.Y., Rozov, S.M., Tsyganov, V.E. et al. Sequential functioning of *Sym13* and *Sym31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // *Mol. Gen. Genet.* – 1997. – Vol. 254. – P. 592–598.
20. Demchenko K., Winzer, T., Stougaard, J. et al. Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation // *New Phytol.* – 2004. – Vol. 163. – P. 381–392.
21. Boivin C., Camut, S., Malpica, C. et al. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. // *Plant Cell.* – 1990. – Vol. 2. – P. 1157–1170.
22. Ovchinnikova E. Genetic analysis of symbiosome formation // PhD thesis, Wageningen, The Netherlands, 2012.
23. Trouvelot A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle / Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds.) *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae.* – INRA, Paris, 1986. – P. 217–221.
24. Vierheilig H., Coughlan, A.P., Wyss, U. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – P. 5004–5007.
25. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 5. – P. 69–76.
26. Markmann K., Parniske M. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? // *Trends Plant Sci.* – 2009. – Vol. 14. – P. 77–86.
27. Kistner C., Winzer T., Pitzschke A. et al. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis // *Plant Cell.* – 2005. – Vol. 17. – P. 2217–2229.

SHTARK O.Y.¹, OVCHINNIKOVA E.S.¹, LIMPENS E.², ZHUKOV V.A.¹,
BORISOV A.Y.¹, FEDOROVA E.E.², BISSELING T.², TIKHONOVICH I.A.¹

¹ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology

St.-Petersburg, Pushkin, Podbelskogo sh., 3, e-mail: oshtark@yandex.ru

² Wageningen University, Laboratory of Molecular Biology

The Netherlands, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB

NEW DATA ON THE ROLE OF LRR-RECEPTOR KINASE SYM19 DURING LEGUME-RHIZOBIA SYMBIOSIS AND ARBUSCULAR MYCORRHIZA FORMATION

Aims. This study was aimed to identify a role of regulatory symbiotic gene presented by a pea (*Pisum sativum* L.) mutant allele *sym41* in nodule and arbuscular mycorrhiza (AM) development. **Methods.** Light microscopy, synteny-based mapping, RT-PCR, and complementation analyses were used. **Results.** AM fungal colonization was shown to be impaired at the epidermis whereas arbuscule formation in the cortex was not affected. Rhizobial infection and symbiosome formation were most strongly affected in apical nodule meristem-derived cells. The gene *Sym41* was revealed to encode the common symbiotic LRR-receptor kinase SYM19. The mutation in *sym41* causes a strong reduction (~90 %) of wild-type transcript levels in the mutant. **Conclusions.** A novel essential role for SYM19 in symbiosome differentiation was revealed. A higher demand for SYM19 levels was suggested for microbial infection of cells of apical meristem/epidermis than of primordium/cortex.

Key words: *Pisum sativum* L., legume-rhizobia symbiosis, arbuscular mycorrhiza, LRR-receptor kinase.