**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»**

**На правах рукописи**

**Канцурова Елизавета Степановна**

# СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NIN, ОПРЕДЕЛИВШИЕ ЕГО УЧАСТИЕ В КОНТРОЛЕ РАЗВИТИЯ РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

1.5.21. – Физиология и биохимия растений

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, Долгих Елена Анатольевна

Санкт-Петербург

2025

# Оглавление

Список сокращений ....4
ВВЕДЕНИЕ....5
Глава 1. Обзор литературы....9
1.1. Растительно-микробные симбиозы как стратегия адаптации к изменяющимся условиям среды ....9
1.1.1. Особенности формирования и функционирования симбиозов растений с азотфиксирующими бактериями ....9
1.1.2. Классификация клад растений, формирующих клубеньки....12
1.1.3. Эволюционное развитие растительно-микробного азотфиксирующего симбиоза....16
1.2. Транскрипционный фактор NIN – ключевой регулятор симбиоза....18
1.2.1. NIN функционирует у всех клубенькообразующих видов....18
1.2.2. Транскрипционный контроль клубенькообразования....25
1.2.3. Особенности эволюции транскрипционного фактора NIN как представителя семейства NLP....30
Глава 2. Материал и методы исследования ....38
2.1. Растительный материал ....38
2.2. Бактериальные штаммы и условия культивирования....38
2.3. Обработка растений цитокининами ....39
2.4. Молекулярные методы....40
2.4.1. Получение генетических конструкций ....40
2.4.2. Дрожжевая двугибридная система ....43
2.4.3. Выделение нуклеиновых кислот и ПЦР....43
2.4.4. Подготовка библиотек и секвенирование ....44
2.5. Получение композитных растений....45
2.5.1. Трансформация гороха ....45
2.5.2 Трансформация люцерны....46
2.5.3 Трансформация томата и хмеля....46
2.6. Микроскопия ....48
2.6.1. Фиксация материала ....48
2.6.2. Получение срезов и окраска пропидий иодидом (PI) ....48
2.7. Компьютерные программы и статистические методы ....49
2.7.1. Реконструкция филогенетических деревьев....50
2.7.2. Поиск направляющей РНК....50
2.7.3. Статистические методы....51
Глава 3. Результаты исследований ....53

3.1. Поиск и анализ структурных особенностей транскрипционного фактора NIN, определивших его уникальную роль в контроле развития бобово-ризобиального симбиоза.....53

3.1.1. Филогенетический анализ представителей семейства транскрипционных факторов NLP .....53

3.1.2. Анализ структурной организации транскрипционного фактора NIN у гороха посевного *P. sativum*.....57

3.1.3. Поиск новых ко-регуляторов и белков-мишеней действия транскрипционного фактора NIN в контроле развития бобово-ризобиального симбиоза.....60

3.2. Изучение регуляции транскрипции гена *PsNIN* у гороха *P. sativum*.....64

3.2.1. Поиск регуляторных мотивов в промоторной области гена *PsNIN* у гороха.....66

3.2.2. Анализ активности различных промоторных областей гена *PsNIN* в корнях и клубеньках гороха при симбиозе .....67

3.2.3. Активация промоторных областей гена *PsNIN* в корнях небобовых растений .....69

3.2.4. Комплементация мутанта гороха *nin-1* .....70

3.2.5. Анализ влияния удаленного CE-регуляторного элемента в промоторе гена *NIN* на его регуляцию при обработке растений гороха экзогенным цитокинином.....73

3.3. Роль транскрипционного фактора NIN в регуляции более поздних этапов морфогенеза клубенька у растений гороха.....79

3.3.1. Поиск генов-мишеней, которые могут активироваться транскрипционным фактором NIN, при регуляции морфогенеза клубенька.....79

3.3.2. Изучение роли регулятора SEUSS в развитии меристемы в клубеньках гороха.....89

3.4. Трансформация небобовых растений генетическими конструкциями, содержащими ген *NIN*, и оценка влияния этого гена на развитие таких растений.....92

Заключение .....94

ВЫВОДЫ.....96

Список литературы .....98

ПРИЛОЖЕНИЕ.....119

Благодарности .....125

## Список сокращений

SGE – Semi-Greek Ethylmethanesulfonate

IPD3 – INTERACTING PROTEIN OF DMI3

NIN – NODULE INCEPTION

RWP-RK – Arg (**R**)-Trp (**W**)-Pro (**P**)-X-Арг (**R**)-Lys (**K**) домен

PB1 – Phox и Bem1 домен

ГК – гибберелловая кислота

# ВВЕДЕНИЕ

Началом становления такого направления в биологической науке как изучение микробно-растительных взаимодействий принято считать доклад Антона де Бари, который был прочитан на заседании общества немецких естествоиспытателей в городе Кассель. В докладе рассматривались, прежде всего, ассоциация *Azolla-Anabena* и лишайники, однако те же принципы симбиотических отношений могли быть перенесены на взаимодействие высших растений с представителями бактериального мира. Несмотря на то, что его статья «Явления симбиоза» была опубликована 130 лет назад, интерес к данной теме с годами только усиливается. С ростом научных публикаций, внедрением новых методов, мы все больше узнаем о микробно-растительных взаимодействиях и симбиозе в целом, а вместе с тем увеличивается количество новых нерешенных вопросов.

Согласно докладу «О положении дел в области продовольственной безопасности и питания в мире», около двух миллиардов жителей планеты не имеют возможности постоянно получать достаточное количество безопасной и питательной пищи. Если ничего не изменится, человечество не сможет выполнить поставленную задачу и покончить с голодом к 2030 году. (ФАО, МФСР, ЮНИСЕФ и ВОЗ, 2020). Понимание механизмов становления и организации микробно-растительных взаимодействий позволят справиться с такими глобальными задачами, как повышение устойчивости хозяйственно-ценных растений к абиотическому и биотическому стрессам, экологизация сельского хозяйства, а также повешение продуктивности сельскохозяйственных растений, в том числе с использованием современных методов геномного редактирования, не говоря уже о несомненном вкладе в фундаментальную науку.

Многочисленное семейство бобовых растений включает множество ценных для сельского хозяйства видов, в числе которых пищевые и кормовые культуры. Уникальность растений этого семейства заключается в способности

формировать симбиотические отношения с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями (ризобиями), которые, в свою очередь, способны обеспечивать растение-хозяина азотным питанием без внесения соответствующих удобрений. Взаимодействие начинается с обмена сигналами между партнерами, когда растения выделяют флавоноиды, а у ризобий под их влиянием синтезируются факторы клубенькообразования (Nod-факторы). После передачи сигнала от Nod-фактора в ядро растительной клетки, активируется комплекс транскрипционных факторов, регулирующих дальнейшее развитие и поддержание симбиоза. Одним из ключевых транскрипционных факторов в процессе становления такого симбиоза является транскрипционный фактор NIN (от англ. NODULE INCEPTION), который является специфичным регулятором бобово-ризобиального симбиоза.

Несмотря на то, что этот транскрипционный фактор NIN был открыт более 20 лет назад, его эволюция и особенности регуляции все еще остаются малоисследованными. Помимо фундаментальных знаний о гене *NIN*, который называют ключевым регулятором бобово-ризобиального симбиоза, неизвестно сможет ли его введение в геном небобовых растений стать основой для создания новых симбиотических систем, то есть развития азотофиксирующего симбиоза у широкого круга растений. Это может стать перспективным направлением исследований, так как возделывание трансгенных растений, способных получать один из основных питательных элементов азот с помощью микросимбионтов, сократит в разы затраты на химические азотные удобрения, будет способствовать улучшению окружающей среды, а также сможет послужить решением перечисленных ранее проблем глобального голода.

В связи с этим основной **целью** данного исследования является изучение структурной организации и особенностей регуляции транскрипционного фактора NIN, необходимых для контроля органогенеза и морфогенеза

клубенька при ризобиальном симбиозе, а также сравнительный анализ влияния переноса гена *NIN* в геном небобовых растений и оценка влияния на паттерн активируемых регуляторных белков у таких растений. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Сравнительный анализ структурной организации транскрипционного фактора NIN и его ближайших гомологов белков NLP у бобовых растений, выявление мотивов, определяющих функциональную активность транскрипционного фактора NIN при контроле инфекционного процесса и органогенеза клубеньков.
2. Поиск и изучение новых регуляторов, с которыми взаимодействует транскрипционный фактор NIN в процессе формирования и функционирования клубенька.
3. Поиск и анализ регуляторных последовательностей в промоторной области гена *NIN* гороха посевного, необходимых для регуляции его экспрессии на различных этапах клубенькообразования.
4. Изучение роли транскрипционного фактора NIN в контроле более поздних этапов формирования и функционирования клубенька, регулируемых цитокининами. Выявления новых генов-мишеней транскрипционного фактора NIN, работающих на этих стадиях.
5. Анализ влияния интродукции гена *NIN* гороха в геном небобового растения хмеля на рост и развитие этих растений.

**Положения, выносимые на защиту**

1. Транскрипционный фактор NIN содержит уникальные мотивы в N-концевом GAF-подобном домене белка, характерные для этого регулятора у растений, образующих клубеньки недетерминированного типа.

2. Экспрессия гена *NIN* зависит от удаленного цитокинин-регулируемого CE-элемента (расположен на расстоянии 218 т.п.о. от старт-кодона), GA-элемента (4.5 т.п.о.) и CYC-элемента (3,2 т.п.о.) в промоторе гена *NIN* у гороха. Под влиянием цитокининов и активации экспрессии гена *NIN* через CE-элемент, этот транскрипционный фактор влияет на закладку и более поздние этапы морфогенеза симбиотических клубеньков. Стимуляция экспрессии гена *NIN*, контролируемая гиббереллинами через регуляторный GA-элемент в промоторе этого гена необходима для перехода развития от примордиев к формированию этих органов на корнях растений гороха.

3. В результате интродукции кодирующей последовательности гена *NIN* гороха в геном небобового растения хмеля была впервые показана возможность образования клубенько-подобных структур на корнях этих растений, не образующих симбиозы с азотфиксирующими бактериями.

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1. Растительно-микробные симбиозы как стратегия адаптации к изменяющимся условиям среды

Симбиотические микроорганизмы играют важную роль в жизни растений. Многие почвенные бактерии, обитающие на поверхности побегов и корней растений, способны выделять токсины, что защищает растение-хозяина от растительноядных животных [1,2]. Кроме защиты в результате выделения токсинов, симбиотические бактерии могут ингибировать развитие фитопатогенов, выделяя антибиотики или активируя защитные системы самого растения [3,4]. Такую функцию выполняют, например, ризосферные бактерии, которые обладают совокупностью полезных для растений свойств и получивших название PGPR (от англ. plant growth-promoting rhizobacteria – ризобактерии, стимулирующие рост растений). Они помогают растениям в адаптации к стрессам [5], адсорбции тяжелых металлов [6], способствуют выделению соединений, стимулирующих рост растений [7]. Одной из важных функций микросимбионтов является улучшение минерального питания растений [8].

Понимание механизмов становления и развития растительно-микробных взаимодействий позволят справиться с такими глобальными задачами, как стимуляция устойчивости к абиотическому и биотическому стрессу у хозяйственно-ценных растений, экологизация сельского хозяйства, а также повышение продуктивности сельскохозяйственных растений, не говоря уже о несомненном вкладе в фундаментальную науку.

### 1.1.1. Особенности формирования и функционирования симбиозов растений с азотфиксирующими бактериями

Азот является одним из основных компонентов органических молекул, поскольку входит в состав аминокислот и белков, нуклеиновых кислот,

пирролов и их производных (порфиринов, содержащихся в хлорофиллах, геме гемоглобина и цитохромах). Несмотря на то, что содержание молекулярного азота $N_2$ в атмосфере является достаточно высоким, доступность связанных форм азота ограничена. Биологическая фиксация азота является одним из основных источников связанного азота в процессе круговорота этого элемента в природе. Кроме того, с помощью биологической азотфиксации происходит восполнение связанного азота, потерянного при денитрификации, выщелачивании и других процессах. Биологическая фиксация азота осуществляется благодаря ферменту нитрогеназе, встречающемуся у бактерий и архей и катализирующему восстановление $N_2$ до двух молекул $NH_3$ [9]. В связи с тем, что нитрогеназа инактивируется кислородом, биологическая фиксация азота возможно появилась еще в до кислородную эпоху.

В ходе развития биосферы с изменением состава атмосферы Земли («великого окислительного события») около 2,5 миллиардов лет назад [10], концентрация $O_2$ в атмосфере повышалась, для защиты нитрогеназного комплекса азотфиксирующим бактериям и археям было необходимо занять нишу с анаэробными условиями. Некоторым микроорганизмам удалось использовать пространство с низким содержанием $O_2$ внутри другого, эукариотического организма посредством эндосимбиоза. Основными азотфиксирующими эндосимбионтами принято считать цианобактерии, ризобиальные и актиноризные бактерии [11]. Наряду с этим известно, что некоторые археи выступают в роли симбиотических азотфиксаторов при колонизации внутренних тканей растений [12–15].

Одними из основных известных азотфиксирующих микросимбионтов можно считать цианобактерии. Недавние исследования, посвященные изучению морской одноклеточной водоросли, которая содержит азотфиксирующие органеллы (нитропласты), возможно произошедшие от цианобактерии [16], подтверждают древность этих симбионтов.

Цианобактерии обладают большой симбиотической пластичностью, поскольку способны образовывать симбиозы с совершенно разными хозяевами. Растения-хозяева цианобактерий обычно принадлежат к голосеменным и покрытосеменным растениям [17,18], а также мохообразным [19], что указывает на древние родственные связи и представляет собой одни из первых примеров симбиотических ассоциаций по фиксации азота. Способность цианобактерий к формированию симбиотических отношений передавалась от общего предка, при этом часто происходила потеря азотфиксации и осуществлялся горизонтальный перенос генов внутри таксона [20]. Например, для порядка *Nostocales* показана общая эволюционная история симбиотического взаимодействия, однако также отмечено полифилетическое происхождение внеклеточных симбиозов [21].

Симбиозы с цианобактериями представляют большое разнообразие взаимодействий, включающие облигатные [22–26] и факультативные формы [19,27,28]. Цианобактерии располагаются в слоевищах мхов и лишайников, в межклеточных пространствах коры корня (для голосеменных) и листьев (для папоротников). Вместе с тем, встречаются и внутриклеточные формы у симбионтов покрытосеменных [11].

Азотфиксирующие микросимбионты широко представлены грамотрицательными почвенными протеобактериями, принадлежащими к разным родам порядка *Rhizobiales*, получивших обобщенное название «ризобии» [29]. В азотфиксирующий симбиоз вступают и грамположительные актинобактерии рода *Frankia* [30]. Ризобии и актинобактерии вступают в симбиоз с различными представителями сосудистых растений, часто являющимися ценными для сельского хозяйства. Эти взаимодействия активно изучают в всем мире, поскольку они играют важную роль в развитии аграрного хозяйства.

### 1.1.2. Классификация клад растений, формирующих клубеньки

В процессе эволюции при развитии симбиозов растений с азотфиксирующими бактериями стали появляться специализированные структуры на корнях растений, в которых мог протекать процесс азотфиксации. Одним из первых предшественников таких структур можно считать цианобактериальные зоны на корнях саговников [31–33]. Однако некоторые из семейств растений образуют более сложные симбиотические структуры – специализированные клубеньки, содержащие азотфиксирующие бактерии.

В настоящий момент известно около десяти семейств растений, способных формировать симбиозы с азотфиксирующими бактериями – ризобиями пор. *Rhizobiales* и актинобактериями рода *Frankia*. Способность к актиноризным симбиозам известна для восьми различных семейств: Берёзовые (*Betulaceae*), Казуариновые (*Casuarinaceae*) и Мириковые (*Myricaceae*) из порядка Букоцветные (*Fagales*), Датисковые (*Datiscaceae*) и Кориариевые (*Coriariaceae*) порядка Тыквоцветные (*Cucurbitales*) и Розоцветные (*Rosaceae*), Крушиновые (*Rhamnaceae*) и Лоховые (*Elaeagnaceae*) порядка Розоцветные (*Rosales*) [34]. Ризобиальные симбиозы широко представлены у представителей порядка Бобовоцветные (*Fabales*) и единственным родом Параспония (*Parasponia*) порядка Розоцветные (*Rosales*). Известно, что перечисленные таксономические группы принадлежат к единой кладе Фабид (*Fabids*), однако остается не ясным, имел ли общий предок способность к симбиозу [35] или этот признак появлялся независимо в разных группах [36].

Заражение корней растений бактериями рода *Frankia* может протекать внутриклеточно через корневые волоски или по межклеточному пространству [34]. При колонизации и инфицировании бактериями *Frankia* корневых волосков происходит деление прилежащих к ним клеток коры корня (рис. 1). Инфекционные нити проникают через эти клетки к клеткам перицикла, из

которых в результате реактивации делений клеток возникает зачаток клубенька - примордий. Примордий клубенька растет, происходит его заражение бактериями *Frankia*, посредством так называемых гифо-подобных структур, на концах которых образуются везикулы, в которых и осуществляется азотфиксация. В процессе инфицирования через межклеточное пространство, гифы *Frankia* проникают к делящемся клеткам перицикла, проходя между клетками эпидермиса корня [30].

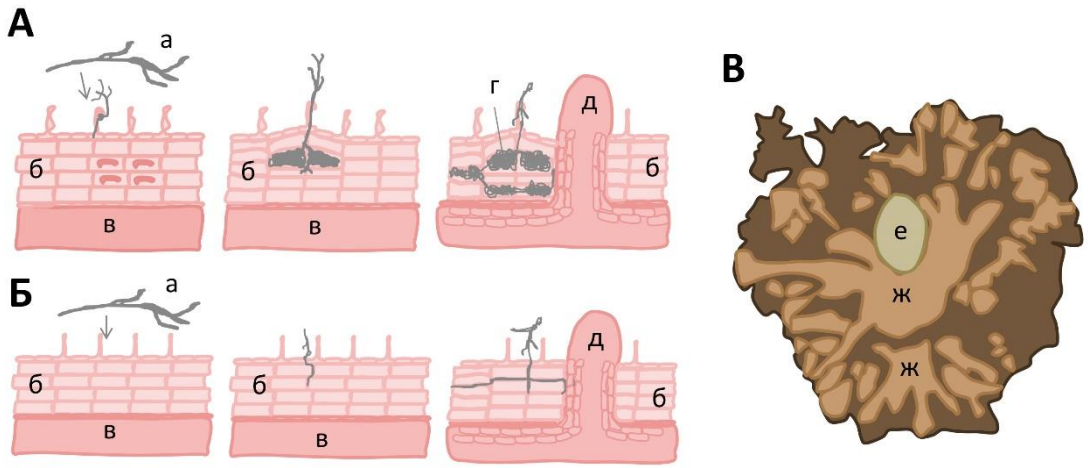


**Рисунок 1. –** Схема заражения актиноризных растений бактериями рода Frankia через инфекционные нити (А) и по межклеточному пространству (Б), а – гифы франкии, б – эпидермис, в – клетки коры, г – зона пре-инфекции, д – зачаток клубенька. В. Внешний вид клубенька ольхи (*Alnus rubra*), е – проводящая система, ж – доли клубенька.

Зрелые клубеньки состоят из множества долей, каждая доля имеет центральный сосудистый пучок, окруженный энтодермой, расширенной корой и перидермой. Морфология клубеньков варьирует у разных растений-хозяев, отличаются также типы везикул у одного и того же штамма при инфицировании разных растений [37]. Важно отметить, что клубеньки, формируемые на корнях растениях *Parasponia* при симбиозе с ризобиями, также состоят из множества долей (рис. 1).

Образование клубеньков на корнях бобовых растений происходит после колонизации корневых волосков ризобиями с последующим проникновением в ткани корня посредством инфекционных нитей и заселением

формирующегося клубенька. Вместе с тем, ризобии могут проникать в ткани корня через разрывы между клетками эпидермиса (наиболее часто в местах выхода боковых корней), что приводит к распространению по межклеточному пространству [38]. Корневые клубеньки бобовых растений относятся к двум типам: детерминированные и недетерминированные (рис. 2). Клубеньки детерминированного типа не имеют выраженных гистологических зон, а меристема существует кратковременно, на протяжении лишь нескольких дней. Бактерии в таких клубеньках претерпевают обратимую дифференцировку, сохраняя способность к размножению. Они встречаются у таких бобовых родов как соя (*Glycine*), фасоль (*Phaseolus*), вигна (*Vigna*), арахис (*Arachis*) а также у лядвенца (*Lotus*).

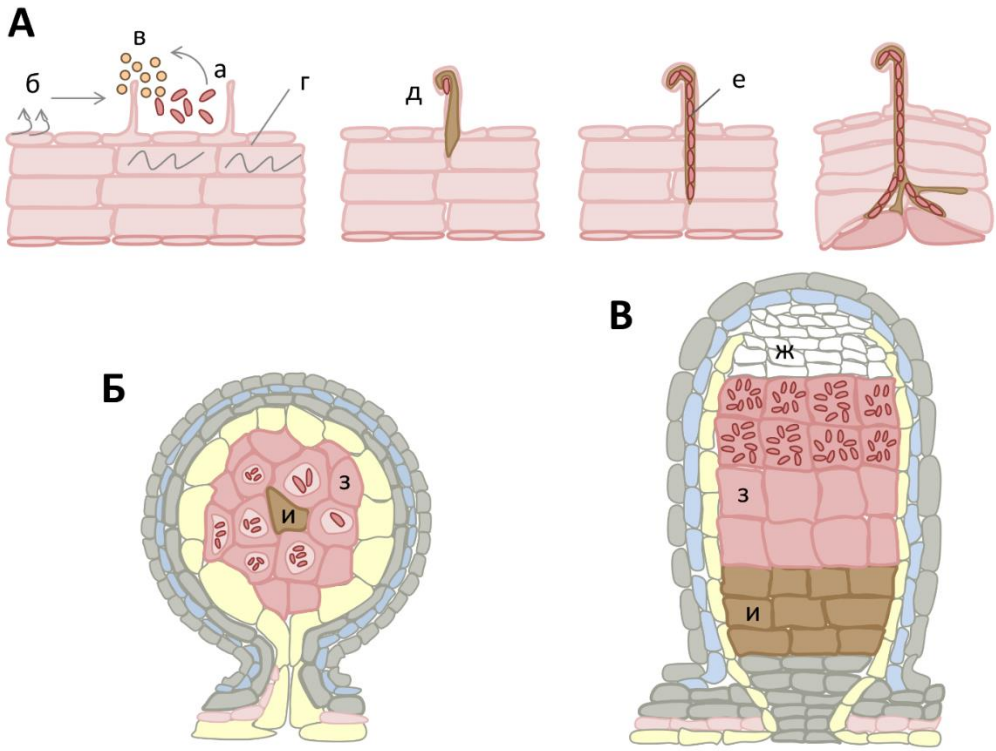


**Рисунок 2.** – А. Схема заражения бобовых растений ризобиями, а – ризобии, б – флаводоиды, продуцируемые растениями, в – Nod-факторы ризобий, г – кальциевые волны, д – скрученный корневой волосок, е – инфекционная нить. Клубеньки детерминированного (Б) и недетерминированного типа (В), ж – зона меристемы, з – зона азотфиксации, и – зона старения.

Недетерминированные клубеньки представляют собой структуры, содержащие несколько гистологических зон, включающих постоянную апикальную меристему, зону инфекции и зону азотфиксации. В таких клубеньках ризобии необратимо дифференцируются в бактероиды, переходя в облигатное состояние. Недетерминированные клубеньки характерны для представителей клады IRLC (от англ. Inverted Repeat-lacking Clade, потерявшие протяженные инвертированные повторы в хлоропластном геноме), включающей такие роды как люцерна (*Medicago),* горох (*Pisum),* вика (*Vicia)*, клевер (*Trifolium)* и другие. В клубеньках недетерминированного типа выделяют 5 зон: зона I (апикальная меристема), зона II (зона инфицирования), интерзона II–III (зона, где осуществляется вход бактерий в растительные клетки), зона III (фиксация азота), зона IV (зона старения). Согласно подробной карте морфогенеза клубеньков, полученной для люцерны усеченной *Medicago truncatula,* за первоначальными делениями клеток перицикла и эндодермы следуют деления в клеточных слоях C5 и C4, а также слое C3, который формирует будущую меристему (стадии с I до IV) [39]. Начиная со стадии V и вплоть до стадии VI, формируется многослойная меристема, которая начинает производить дочерние клетки для тканей клубеньков.

Клубеньки бобовых растений характеризуются большим разнообразием форм и видов. В различных исследованиях они группируются по более разнообразные морфологическим типам [40,41]. В частности, встречаются детерминированные клубеньки сферической формы с чечевичками на поверхности, ассоциированные с боковыми или придаточными корнями, а также люпиноидные формы. Недетерминированные клубеньки, в свою очередь, делятся на неразветвленные и разветвленные, и далее группируются по количеству ветвей.

### 1.1.3. Эволюционное развитие растительно-микробного азотфиксирующего симбиоза

Согласно гипотезе единого происхождения клубенькообразующих растений, общий предшественник таких растений мог появиться более 100 миллионов лет назад [35]. Эти растения объединены в азотфиксирующую кладу (от англ. Nitrogen fixation clade (NFC)), однако только 10 из 28 семейств этой клады способны формировать симбиотические клубеньки [42]. При анализе 37 геномов таких растений не было обнаружено общего гена-предшественника, передающегося в ходе эволюции последующим таксонам [43]. В связи с этим можно предположить, что способность растений формировать клубеньковые структуры на корнях возникла не как единожды уникально приобретенный признак, а явилось следствием рекрутирования для программы морфогенеза клубенька уже имеющихся ранее программ развития других латеральных органов растений (например, боковых корней).

Анализ геномов растений из клады NFC, хоть и не показал присутствия некого «общего» предкового гена, однако выявил наличие гена, присутствующим у всех клубенькообразующих растений [43]. Филогенетический анализ подтвердил присутствие гена *NODULE INCEPTION (NIN)*, кодирующего транскрипционный фактор, у всех клубенькообразующих видов и его утрату у растений той же клады, не вступающих в азотфиксирующий симбиоз и не формирующих клубеньки. Разнообразие выявленных делеций в последовательности гена *NIN* у растений клады NFC, не способных к клубенькообразованию, указывает на по меньшей мере восемь независимых эволюционных событий, которые привели к потере функции гена *NIN* [43]. В соответствии с высказанной ранее гипотезой многократного возникновения клубенькообразующих симбиозов [42] было высказано предположение, что симбиоз развивался независимо по меньшей мере несколько раз у представителей клады NFC. Современные данные позволяют интерпретировать распространение симбиоза в кладе NFC как комбинацию

этих двух взаимодополняющих, а не взаимоисключающих моделей. В настоящее время гипотеза о независимом многократном возникновении симбиоза с азотфиксирующими бактериями, которому предшествовало гипотетическое единовременное появление этой способности у общего предка азотфиксирующей клады является общепринятой [35,36,42,44].

Известно, что транскрипционный фактор NIN у бобовых растений необходим для формирования азотфиксирующего клубенька, а также участвует в развитии инфекции [45–47]. Кроме того, подавление экспрессии *NIN* у *Casuarina glauca* (*Fagaceae, Fagales*) нарушало процесс формирования клубеньков [48], что подтверждает важную роль NIN в симбиозе у представителей клады NFC, в том числе у растений-хозяев актиноризных бактерий.

Особый интерес у исследователей вызывает единственный представитель порядка Розоцветные (*Rosales*), образующий симбиоз с ризобиями [49]. Современные исследования показывают, что для контроля формирования симбиоза у растения рода *Parasponia* необходим набор около 290 генов. Однако близкие с параспонией роды Трема (*Trema),* Хмель (*Humulus)* и Конопля (*Cannabis)* не образуют симбиозы с азотфиксирующими бактериями [50]. Интересно, что сравнительный анализ геномов *Parasponia andersonii* и *Trema orientalis* показал схожий набор симбиотических генов (около 290), за исключением нескольких генов, которые утратили свою функциональность у *Trema* [51]. Среди этих «утративших свою функциональность» генов выявлены те, которые кодируют рецептор к Nod-факторам LysM-типа NFP/ NFR, белок RPG, участвующий в развитии инфекции и транскрипционный фактор NIN.

Развитие клубеньков на корнях растений включает в себя множество последовательных этапов: деформации и скручивания корневых волосков (1), образование инфекционных нитей (2), начальные стадии органогенеза клубенька (3), поддержание структуры или морфогенез клубенька и его

функционирование (4). Следует также отметить контроль клубенькообразования по механизму обратной связи, получивший название системной регуляции клубенькообразования, с помощью которой контролируется количество клубеньков [52]. Эти процессы связаны с разными тканями и разделены по времени, однако известно, что транскрипционный фактор NIN играет ключевую роль во всех этих процессах [45–48,53].

Несмотря на то, что важность транскрипционного фактора NIN была показана для различных процессов при развитии клубеньков, остается неясным, как и за счет каких структурных и функциональных особенностей достигается эта универсальность регуляции с участием NIN.

## 1.2. Транскрипционный фактор NIN – ключевой регулятор симбиоза

### 1.2.1. NIN функционирует у всех клубенькообразующих видов

Транскрипционный фактор NIN выявлен у всех актиноризных растений [54,55]. Ген транскрипционного фактора *CgNIN* в корнях растений *Casuarina glauca* специфические экспрессируется в ответ на инокуляцию *Frankia* в актиноризных клубеньках [48]. Фактором, запускающим экспрессию *CgNIN*, считают сигнальные молекулы, секретируемые бактериями рода *Frankia*. Эти сигналы представляют собой небольшие гидрофильные и термостойкие молекулы, не хитиновой природы [56]. Бактериальные сигнальные молекулы запускают в корнях растений колебания в концентрации [$Ca^{2+}$] в околоядерном пространстве и в ядре [50,57], после стимуляции которых за счет еще не выявленных факторов повышается экспрессия *CgNIN*. Активация транскрипционного фактора CgNIN коррелирует с прединфекционной стадией в растущих корневых волосках, однако эта активация уменьшается, как только клетки дифференцируются и начинают фиксировать молекулярный $N_2$. Наиболее высокий уровень активации показан через 24 часа после инокуляции и связан с деформациями корневых волосков, необходимыми для

последующего формирования инфекционной нити [48]. Вероятно, активация транскрипционного фактора CgNIN запускает экспрессию гена субъединицы *CgNF-YA1* (*NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR Y SUBUNIT ALPHA*), который является активатором клеточного цикла [58].

Доменная структура транскрипционного фактора NIN актиноризных растений включает наличие двух функциональных доменов на С-конце [48]. Среди них ДНК-связывающий домен RWP-RK-типа и домен Phox и Bem1 (PB1) на С-конце [59,60]. Эти домены высоко консервативны и сохраняются не только у гомологов транскрипционного фактора NIN, но и у всего семейства NIN-подобных белков – NLP (от англ. NIN-like proteins), основателем которого и является этот регулятор.

Долгое время считалось, что NLP белки с RWP-RK-доменом имеются только у растений, однако в дальнейшем они были также выявлены и характеризованы у зеленых водорослей, а также у *Dictyostelium discoideum*, у грибов, а также у представителя простейших *Amoebozoa* [61], что свидетельствует о древности этого домена. Другое семейство белков с RWP-RK-доменом называется RKD (RWP-RK domain proteins). Оба семейства входят в состав суперсемейства белков с RWP-RK-доменом. Такое название домен получил по наличию консервативной аминокислотной последовательности Arg (**R**)-Trp (**W**)-Pro (**P**)-X-Арг (**R**)-Lys (**K**) (где X - любая аминокислота). Еще в первых работах по белкам с RWP-RK-доменом было высказано предположение о его ДНК-связывающей функции, возможно, на основании сходства этого домена с аминокислотными последовательностями, составляющие так называемые мотив «лейциновые молнии» у некоторых транскрипционных факторов [45].

Еще один консервативный домен PB1 отвечает за взаимодействия с белками, он сохраняется у животных, грибов, амеб и растений, участвует в разнообразных биологических процессах. Домен был впервые обнаружен в активаторе фагоцитарной оксидазы (Phox) p67phox и белке полярности

дрожжей Bem1, отчего и получил свое название. Домены PB1, размером около 80 аминокислот, имеют убиквитин-подобную складку, содержащую две α-спирали и пять β-слоев, и классифицируются по содержанию мотивов типа I и типа II или обоих (тип I / II). Мотив типа I содержит три глутаматных или аспартатных остатка и занимает 5’ конец домена PB1, мотив типа II содержит инвариантный остаток лизина и расположен на 3’ конце [62]. NIN и факторы транскрипции NLP обладают доменом PB1 типа I / II.

Образование клубеньков у *Parasponia* инициируется после узнавания растением липохитоолигосахаридных молекул ризобий, Nod-факторов, рецептором LysM-типа PaNFP (NOD FACTOR PERCEPTION) [63]. Примерно через два дня после инокуляции начинает экспрессироваться ген транскрипционного фактора PaNIN в клетках эпидермы и коры, расположенных чуть выше зоны растяжения в корне, а также в отдельных делящихся клетках перицикла. Накопление транскриптов *PaNIN* также наблюдается в центральной области долей актиноризного клубенька, где будет происходить инфицирование ризобиями, и в перицикле/энтодерме сосудистой сети молодых клубеньков [64]. Известно, что PaNIN у *Parasponia*, также, как и у растений, формирующих актиноризный симбиоз, стимулирует экспрессию гена транскрипционного фактора PaNF-YA1, что говорит о тесном взаимодействии этих двух белков в процессе формирования симбиотических клубеньков. Регуляция PaNIN вероятно происходит за счет связывания транскрипционного фактора PaIPD3/CYCLOPS с промоторной областью гена *PaNIN*, названной CYC-box [65].

Помимо консервативных доменов RWP-RK-типа и PB1 на C-конце, в N-терминальной области NIN находятся 4 домена – I, II, III и IV, функции I и II из которых (составляет GAF-домен), по-видимому, могут быть связаны с взаимодействием с низкомолекулярными лигандами [51]. В отличие от CgNIN или DgNIN актиноризных растений, в структуре PaNIN имеются небольшие делеции в блоках I и II.

Впервые транскрипционный фактор NIN был выявлен в 1999 году у бобового растения *Lotus japonicus,* и стал первым описанным растительным симбиотическим геном, необходимым для контроля развития клубеньков [45]. Эктопическая экспрессия гена *LjNIN* индуцировала деление клеток коры корня, что является начальным этапом органогенеза корневых клубеньков [53]. Транскрипционный фактор NIN у бобовых растений, образующих клубеньки детерминированного типа, имеет характерные структурные особенности доменов, выявленные и у транскрипционного фактора NIN *Parasponia.* Он содержит высоко консервативные домены RWP-RK-типа и PB1, у него также укорочены блоки I и II в N-концевой части белка [66].

В ранее выполненных исследованиях было показано, что экспрессию гена *LjNIN* способны регулировать транскрипционные факторы LjIPD3/CYCLOPS [67] и LjERN1 [68]. Предполагается, что помимо экспрессии в эпидермисе, активация гена *NIN* в коре корня может быть индуцирована мобильным сигналом неизвестной природы, который возникает в процессе передачи сигнала от Nod-фактора после его связывания с рецепторами в эпидермисе, а затем передается в клетки коры [66]. Кроме того, для лядвенца японского *L. japonicus* ранее было показано, что экспрессия гена *NIN* также активируется фитогормоном цитокинином [69]. Показательными стали исследования на мутанте *daphne* у лядвенца *L. japonicus* [70]. У этих мутантов нарушен органогенез клубеньков, но наблюдается образование повышенного количества инфекционных нитей. Кодирующая последовательность гена *NIN* в растениях *daphne* не нарушена, а мутация вызвана большой вставкой на расстоянии около 7 т.п.о. от стартового кодона гена *NIN*. Это позволило предположить наличие цис-регуляторных участков в пределах промоторной области, которые были нарушены транспозоном и были достаточны для формирования инфекционных нитей в эпидермисе (в пределах 7 т.п.о.), но недостаточны для активации деления клеток коры и формирования клубеньков (расположены на большом удалении от стартового кодона около

18 т.п.о.). Кроме того, экспрессия гена *LjNIN* также зависит от дополнительного транскрипционного фактора LjIPN2, который совместно с LjNSP1 и LjNSP2 связывается с промоторной областью гена *LjNIN* на расстоянии около 170 п.о. от стартового кодона у этого гена [71].

Регуляция *NIN* у других растений, образующих клубеньки детерминированного типа изучена менее подробно. Полиплоидный геном сои (*Glycine max*) содержит 4 гена, кодирующих белок NIN. Уровень всех четырех транскриптов специфически повышается в клубеньках через 2 недели после инокуляции. Все четыре копии гена *GmNIN* функционально активны, имеют сайт связывания с IPD3/CYCLOPS (CYC-элемент) в пределах 3 т.п.о. до стартового кода, а также три из них имеют удаленный цис-регуляторный регуляторный мотив, который содержит предполагаемые сайты связывания (CE-бокс) для регуляторов ответа растений на цитокинин – RR B-типа [72].

Растения арахиса (*Arachis hypogaea*) имеют два предполагаемых ортолога гена *AhNIN* с упомянутыми регуляторными CYC- и CE-элементами в промоторе этого гена. Несмотря на схожесть доменной структуры транскрипционного фактора с последовательностями модельных бобовых, *AhNIN* не экспрессируется в эпидермисе корня арахиса [73]. Это, вероятно, связано с уникальным типом инфекции корней арахиса (при котором ризобии проникают в клетки растения через разрывы эпидермиса, а не с помощью инфекционных нитей) и измененной регуляцией начальных стадий инфекции. Такой вывод можно сделать, поскольку регуляторные области в промоторе гена *AhNIN* сохраняют свою функциональность при трансформации другого бобового растения *M. truncatula* (мутанта по гену *nin*) конструкцией, содержащей промотор гена p*AhNIN*.

При всем разнообразии симбиотических клубеньков бобовых растений обычно выделяют два основных типа: детерминированные и недетерминированные [41]. Первый тип клубеньков характерен для тропических бобовых, а второй - для умеренных. Во время образования

недетерминированных клубеньков Nod-факторы индуцируют клеточные деления в перицикле и внутренней коре корня [74], в то время как при образовании детерминированных клубеньков реактивация клеточных делений происходит во внешней коре корня [75]. В клубеньках детерминированного типа ризобии не претерпевают окончательной дифференцировки. Напротив, у бобовых, принадлежащих к кладе с обратным отсутствием повторов (IRLC, от англ. the inverted repeat-lacking clade), насчитывается до 600 генов, кодирующих специфичные для клубеньков богатые цистеином NCR-пептиды (от англ. nodule cysteine rich) [76,77], которые индуцируют дифференцировку бактероидов [78].

Тем не менее, ранние исследования транскрипционного фактора NIN у растений, образующих клубеньки недетерминированного типа не показывают существенных структурных и функциональных изменений в последовательности гена *NIN* по сравнению с клубеньками детерминированного типа. Подробные исследования модельного бобового *M. truncatula* показывают, что *MtNIN* кодирует белок, состоящий из 933 аминокислот, который на 53% и 72% идентичен белкам NIN лядвенца *L. japonicus* и гороха посевного *P. sativum*, соответственно [47]. Несмотря на относительно невысокую общую гомологию аминокислотной последовательности, все три белка NIN *M. truncatula*, *L. japonicus* и *P. sativum* имеют шесть I–VI общих высокогомологичных доменов (I-IV на N-конце и V, VI на C-конце), которые были выделены при анализе транскрипционных факторов NIN, первыми открытыми у лядвенца и гороха [46]. Сохранились также консервативные делеции в N-концевом домене, а домены RWP-RK (V) и PB1 (VI) на C-конце являются высококонсервативными [65]. Положение интронов в гене *MtNIN* сопоставимо со структурой гена *L. japonicus* и гороха, у которых три интрона содержатся в кодирующей области, а четвертый расположен непосредственно в 5'-нетранслируемой области (5’-UTR) [45–47].

Сложность работы транскрипционного фактора NIN связана с тем, что он регулирует как инфекционный процесс в эпидермисе корня, так и формирование клубеньков в удаленных от поверхности тканях корня. Одна из гипотез, объясняющая такую двойственную роль связана с предположением о процессинге белка. Когда длинная форма работает в эпидермисе, а затем после протеолиза укороченная форма перемещается в кору. Другая гипотеза связана с тем, что первичная активация транскрипционного фактора NIN происходит в эпидермисе, а затем появляется новый сигнал, который перемещается в кору и там регулирует органогенез. В настоящее время больше доказательств получено в пользу второй гипотеза.

В частности, впервые на модельном бобовом люцерне усеченной *M. truncatula*, было установлено, что регуляция экспрессии гена *NIN* зависит от присутствия регуляторных мотивов - CYC-бокса и CE-бокса – в промоторе этого гена и может быть связана с разными тканями и этапами развития симбиоза [79]. Важную роль в регуляции NIN у бобовых с недетерминированным типом клубеньков также играют транскрипционные факторы NSP1/2, IPN2 и ERN1 [80]. Показано, что на ранних стадиях развития инфекции при колонизации поверхности корней растений люцерны усеченной, экспрессия гена *MtNIN* увеличивается в клетках эпидермиса, а затем в удаленных от поверхности клетках перицикла и эндодермы и позже распространяется на внутреннюю кору [79]. Вероятно, такая пространственная регуляция (активация в удаленных от поверхности тканях корня) связана с мобильным сигналом, который генерируется в эпидермисе и затем перемещается в перицикл, чтобы активировать там экспрессию *NIN* и стимулировать образование примордия клубенька.

Изменения в особенностях регуляции и структуре транскрипционного фактора NIN можно проследить при анализе NIN у разных растений клады NFC. При переходе от актиноризных растений к *Parasponia*, формирующей симбиоз с ризобиями, в N-концевом домене белка NIN появляются небольшие

делеции в консервативных доменах I и II, которые сохраняются у всех растений, взаимодействующих с ризобиями. С изменением морфологии клубеньков, в частности, при переходе от клубеньков, состоящих из многих долей, к клубенькам, в которых присутствует одна азотфиксирующая зона, наблюдается появление цитокинин-регулируемого элемента в промоторной области гена *NIN* у бобовых растений. Однако остается не ясным, какие отличительные особенности имеет регуляция экспрессии гена *NIN* у бобовых с недетерминированным типом клубеньков при сравнении с бобовыми, образующими детерминированные клубеньки.

### 1.2.2. Транскрипционный контроль клубенькообразования

Растения, относящиеся к кладе NFC, используют консервативный сигнальный путь для инициации развития клубеньков. Развитие клубенька представляет собой многоступенчатый процесс, опосредованный обменом сигналами между партнерами. Важно отметить, что сигнальный путь развития симбиоза для растений с азотфиксирующими бактериями является общим с сигнальным путем, который активируется при более древнем типе эндосимбиоза: с грибами арбускулярной микоризы (АМ) [81]. Симбиоз растений с грибами АМ возник примерно 450 миллионов лет назад [82]. Эндосимбиоз, образующийся при колонизации корней растений грибами АМ, является наиболее распространенной симбиотической ассоциацией в природе [83]. Благодаря данному симбиозу грибы АМ получают от своего хозяина до 20% углеводов, ассимилированных растениями; в свою очередь, они улучшают снабжение растений минеральными питательными веществами, в частности фосфором (P), и в меньшей степени азотом (N), серой (S), калием (K) и другими питательными веществами.

В то время как симбиоз с грибами АМ формирует около 80% наземных растений в мире [84], азотфиксирующие симбиозы представлены, главным образом, бобово-ризобиальным симбиозом. При этом эти два типа симбиоза

имеют массу схожих черт. В частности, сигнальные молекулы, выделяемые грибами АМ и ризобиями, в ответ на растительные стриголактоны и флавоноиды, имеют значительное структурное сходство (Мус-факторы грибов АМ и Nod-факторы ризобий являются липохитоолигосахаридами), также как и рецепторы этих молекул (рецепторы с LysM-мотивами, способные узнавать хитоолигосахаридный остов сигнальных молекул) [85]. Кроме того, наличие «общего сигнального пути» указывает на сходство между двумя основными типами симбиозов [81].

Для бобовых растений известно, что флавоноиды или изофлавоны, продуцируемые растениями, вызывают у ризобий активацию синтеза липохитоолигосахаридных молекул Nod-факторов [86] , которые запускают программу формирования клубеньков в результате реактивации делений дифференцированных клеток корня [87]. Природа выделяемых *Frankia* сигнала не установлена, однако на основании усиления продукции флавоноидов в корнях актиноризных растений [88], можно предположить, что начальные пути развития симбиоза со стороны растения могут быть сходными и принципиально не отличаться от развития симбиоза с ризобиями.

Сигнальные молекулы ризобий Nod-факторы воспринимаются расположенным на мембране гетеродимерным комплексом рецепторных киназ, содержащих LysM-домены (LYK3/NFP у *M. truncatula*; NFR1/NFR5 у *L. japonicus*; K1/Sym10 и Sym37/Sym10 у *P. sativum*) и рецепторов с лейцин-богатыми повторами во внеклеточном домене (MtDMI2, LjSYMRK и PsSym19) [89–94]. Общие компоненты симбиотической передачи сигналов включают убиквитинлигазу E3, индуцированную Nod-фактором (MtPUB1/LjPUB13), которая фосфорилируется DMI2 [95,96]. Комплекс рецепторов к Nod-факторам активирует сигнальный каскад, приводящий к колебаниям уровня кальция в ядре. В этом процессе участвуют катионные каналы, расположенные на ядерной мембране (MtDMI1, LjCASTOR и LjPOLLUX и PsSym8) и кальциевые каналы (CNGC15) [97–99]. Сигнал

кальция декодируется кальций-кальмодулин-зависимой киназой (MtDMI3, LjCCaMK и PsSym9) [100,101]. Кроме того, LjCCaMK/MtDMI3/PsSym9 активирует транскрипционный фактор CYCLOPS (MtIPD3/PsSym33) посредством фосфорилирования, что определяет его способность активировать транскрипцию других транскрипционных факторов, важнейшим из которых является NIN [67,102].

После активации транскрипционного фактора IPD3/CYCLOPS в процессе передачи сигнала от Мус-фактора или Nod-фактора, необходимых для формирования как симбиоза с грибами арбускулярной микоризы (АМ), так и симбиоза с ризобиями, сигнальные пути расходятся. В симбиозе с грибами АМ транскрипционный фактор IPD3/CYCLOPS непосредственно индуцирует экспрессию транскрипционного фактора RAM1 (относится к семейству GRAS-транскрипционных факторов), который действует как основной регулятор развития арбускул [103,104]. В сигнальном пути, ведущем к клубенькообразованию, IPD3/CYCLOPS индуцирует экспрессию гена транскрипционного фактора NIN [105]. Будучи непосредственной мишенью транскрипционного фактора IPD3/CYCLOPS, *NIN* является одним из первых специфичных генов ризобиального симбиоза.

Транскриптомный профиль корневых волосков *M. truncatula* выявил индукцию экспрессии нескольких тысяч генов в ответ на инокуляцию ризобиями [106]. Мутация в гене *NIN* приводит к повышенному скручиванию корневых волосков в ответ на инокуляцию ризобией (компенсаторная реакция на отсутствие инфекции), но у мутантов *nin* не развиваются инфекционные нити и не инициируются клеточные деления, дающие начало примордию клубенька [45].

Деление клеток в примордиях клубеньков коррелирует с накоплением ауксина, и это накопление предшествует первым делениям клеток. В связи с тем, что у мутантов по гену *nin* не происходит накопления ауксина [107], можно сделать вывод о том, что и этот процесс зависим от влияния

транскрипционного фактора NIN. Предполагается, что активация цитокинином в клетках перицикла экспрессии гена *NIN* приводит к локальному накоплению ауксина. Формирование локальных максимумов ауксинов при формировании примордиев клубеньков достигается посредством изменения пространственной и временной экспрессии генов переносчиков ауксинов (PIN) [108] и генов биосинтеза ауксина, регулируемых транскрипционным фактором NIN [109]. В создании локального максимума ауксина также важным является ингибирование их транспорта, зависящее от локального накопления флавоноидов и цитокининов, а также активации рецептора к цитокинину CRE1 [110], экспрессия которого также регулируется транскрипционным фактором NIN [111,112].

Важность других генов, связанных с азотным и фосфорным питанием, а также метаболизмом серы в контроле регуляции экспрессии гена *NIN* требует дальнейшего изучения. Активация более 100 рибосомных генов, которая зависит от транскрипционного фактора NIN, указывает на то, что развитие инфекционных нитей и формирование клубенька требует обеспечения больших потребностей в биосинтезе белка *de novo*. Кроме того, метаболизм серы (S) играет центральную роль в окислительно-восстановительном гомеостазе посредством его включения в глутатион, и его повышенное потребности в глутатионе связаны с необходимостью обеспечивать ремоделирование клеточной стенки во время роста. Наконец, активация процессов ассимиляции фосфора (P) необходима для синтеза ДНК, которая может зависеть от транскрипционного фактора NIN [113]. Однако как регулируются эти процессы транскрипционным фактором NIN при функционировании клубенька и на какие гены-мишени влияет остается еще очень малоисследованным.

Еще одним важным аспектом влияния транскрипционного фактора NIN на рост растений является его участие в регуляции генов биосинтеза гиббереллинов (ГК) и ответа растений на эти гормоны. Экспрессия генов,

связанных с гиббереллинами, была обнаружена в корневых волосках после обработки Nod-фактором и инокуляции ризобиями *Sinorhizobium meliloti* [106]. Несмотря на общеизвестную стимулирующую роль ГК в регуляции деления и роста клеток, повышенные концентрации ГК оказывают негативное воздействие на развитие инфекции. Как следствие, обработанные повышенными концентрациями экзогенной ГК растения имеют пониженное число инфекционных нитей и количество клубеньков [114]. Таким образом, ГК оказывает свое влияние в определенных диапазонах концентраций. Сходным образом, цитокинины могут отрицательно влиять на развитие инфекции, но при этом оказывают стимулирующее влияние на органогенез клубенька [115,116]. С другой стороны, мутанты по биосинтезу гиббереллинов имеют пониженное клубенькообразование [117]. Это свидетельствует о положительной роли гиббереллинов в регуляции органогенеза клубеньков, что скорее всего связано с прямой или опосредованной регуляцией гиббереллинами необходимых для развития клубеньков транскрипционных факторов. Например, известные регуляторы гиббереллинового ответа, белки DELLA, модулируют активность транскрипционных факторов, определяя сборку или распад комплексов этих регуляторов. При этом белки DELLA разрушаются при увеличении уровня гиббереллинов под влиянием изменения внешних условий.

Процесс развития инфекционных нитей требует синтеза и транспортировки компонентов плазматической мембраны, что связано с везикулярным транспортом. В регуляцию этого процесса также может быть вовлечен транскрипционный фактор NIN, что свидетельствует о его необходимости для индукции генов, контролирующих синтез белков и полисахаридов, необходимых для построения мембран и клеточных стенок. На основании этого транскрипционный фактор NIN вовлечен в контроль ризобиальной инфекции. Он необходим для регуляции некоторых генов ранних нодулинов, функция которых связана с модификацией клеточных

стенок растений. Транскрипционный фактор NIN может регулировать экспрессию гена кальций-связывающего белка аннексина Ann1, который локализуется на периферии ядра в инфицированных клетках и отвечает за транспорт кальция в ядро [118].

Разработка новых методических подходов, позволивших повысить чувствительность и специфичность оценки изменений в экспрессии генов в отдельных клетках, позволило предположить возможную роль транскрипционного фактора NIN в контроле экспрессии генов, регулирующих поглощение питательных веществ и их ассимиляцию. Сравнительный анализ транскриптомов мутантов *nin* и исходных сортов растений указывает на то, что транскрипционный фактор NIN может регулировать не только начальные этапы развития симбиоза, но и более поздние процессы в клубеньках, связанные с их функционированием. Однако роль транскрипционного фактора NIN в регуляции более поздних этапов симбиоза остается еще малоизученной.

### 1.2.3. Особенности эволюции транскрипционного фактора NIN как представителя семейства NLP

Транскрипционный фактор NIN является основателем семейства транскрипционных факторов NLP (от англ. NIN-Like Protein) [45]. Сходным образом с другими представителями семейства NLP, транскрипционный фактор NIN может быть вовлечен в регуляцию комплекса генов, обеспечивающих поглощение и ассимиляцию питательных веществ. Согласно современным представлениям о молекулярных механизмах регуляции транскрипционными факторами NLP ответа растений на изменение в среде содержания нитратов и экспрессии нитрат-регулируемых генов, под влиянием связывания нитрата клетками растений может происходить активацию сигнального пути с участием кальция и фосфорилирование ряда кальций-зависимых протеинкиназ CDPK (от англ. calcium-dependent protein kinase). Эти CDPK вызывают фосфорилирование и активацию транскрипционных

факторов NLP и их транслокацию в ядро, где собственно и происходит регуляция экспрессии нитрат-регулируемых генов [119].

Факторы транскрипции NLP содержат уникальные функциональные домены. В ранее опубликованных исследованиях в составе транскрипционных факторов выделяли I, II, III и IV регуляторные домены на N-конце белка, а также ДНК-связывающий домен RWP-RK и белок-связывающий домен Phox и Bem1 (PB1) на C-конце [59,60]. При этом домены I и II транскрипционных факторов NLP непосредственно вовлечены в их нитрат-зависимую регуляцию [120]. Несколько позже на N-конце транскрипционных факторов NLP стали выделять мотивы – 4, 5, 6, 7 и 8. При этом мотивы 4, 5 и 6 соответствуют прежним доменам I и II у этих регуляторов. Они получили обобщенное название GAF-домена (от англ. cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA). Хорошо исследовано, как регулируется нитратом активность представителя этого семейства – транскрипционного фактора AtNLP7 у арабидопсиса. Консервативный остаток серина (S205) между мотивами 4 и 5 фосфорилируется с помощью кальций-зависимых протеинкиназ: CDPK10, CDPK30 и CDPK32 под влиянием нитратов [119]. Высокий уровень гомологии последовательностей GAF-домена наблюдается для всех белков NLP [59]. GAF-домен широко распространен у различных групп организмов, что указывает на его участие в трансдукции сигнала. Большинство GAF-доменов характеризуется связыванием с низкомолекулярными лигандами, включая 2-оксоглутарат, оксид азота NO, цГМФ и нитрат $NO_3^-$ [121]. У сосудистых растений белки с GAF-доменами обнаруживаются в фитохромах, а также участвуют в регуляции путей, связанных с передачей сигнала от этилена [122].

На основании ранее выполненных исследований [59] были изучены филогенетические взаимоотношения между белками NLP разных организмов: двудольных *A. thaliana* и *M. truncatula*, однодольных растений *Brachypodium dystachion* и *Oryza sativa*, а также одноклеточных зеленых водорослей

*Chlamydomonas reinhardtii* и *Volvox carteri*. На основании присутствия RWP-RK-домена выделяют суперсемейство белков RWP-RK. В его состав входят NLP (NIN-like proteins) и RKD (RWP-RK domain proteins). У представителей сосудистых растений белки NLP, помимо RWP-RK-домена, имеют PB1-домен, который отсутствует у NLP водорослей.

Большое разнообразие мотивов присутствует на N-конце белков NLP. Высокий уровень гомологии последовательностей GAF-домена у многих белков NLP, указывает на его важную функциональную роль. Широко распространенный GAF-домен, который имеет профилин-подобную структуру, вероятно, принимает участие в восприятии и передаче сигнала. Большинство идентифицированных GAF-доменов участвуют в связывании лигандов с низким молекулярным весом, включая α-кетоглутаровую кислоту, оксид азота, цГМФ и нитрат, или могут определять гомодимеризацию транскрипционных факторов [121]. Функция GAF-домена у ряда транскрипционных факторов семейства NLP связана с регуляцией азотного статуса растений. Структура GAF-домена существенно изменяется у транскрипционных факторов MtNIN [59] и LjNIN [123] , они содержат только усеченный GAF-домен. Изменение GAF-домена может являться важным эволюционным признаком, указывающим на эволюционные события, определившие появление транскрипционных факторов NIN, тогда как другие домены (RWP-RK и PB1) сохраняют консервативность при сравнении с другими NLP.

Транскрипционные факторы NLP являются основными регуляторами ответа растений на изменение концентрации нитрата в среде, и были охарактеризованы как регуляторы передачи сигнала от нитрата [120]).

Семейство транскрипционных факторов NLP включает множество членов в геномах многих растений [66]. Например, в геноме арабидопсиса выявлено девять генов *AtNLP* (*AtNLP1–9*). Высокое сходство между аминокислотными последовательностями различных транскрипционных

факторов NLP позволяет предположить, что в подавляющем большинстве случаев они обладают избыточными и перекрывающимися функциями в индуцируемой нитратами экспрессии генов.

В частности, было показано, что AtNLP7, один из девяти членов NIN-подобного семейства *A. thaliana*, регулирует ответ растений на нитрат и азотное голодание [124]. Кроме того, AtNLP7 был идентифицирован как основной транскрипционный фактор при генетическом скрининге регуляторов первичного ответа растений на нитрат. Показано, что AtNLP7 связывается с промоторами 851 генов в ответ на увеличение содержания нитрата, при этом он узнает особый сайт связывания в промоторе генов-мишеней. В этом наборе генов, активирующихся AtNLP7, найдены гены, участвующими в метаболизме азота, и являющиеся регуляторами других метаболических путей [125].

Помимо присутствия специфических сайтов узнавания AtNLP7 в промоторах отзывчивых генов, активность AtNLP7 в ответ на присутствие нитрата в основном регулируется на субклеточном уровне. Ранее было показано, что, в то время как AtNLP7 обнаруживается в цитозоле при азотном голодании, увеличение содержания нитрата в среде приводит к перемещению AtNLP7 в ядро в течение нескольких минут. Ни аммоний, ни глютамин, ни другие источники восстановленного азота, не вызывают такое перераспределение. Накопление AtNLP7 в ядре не зависит от регуляции транскрипции, и ингибирование транспорта через ядерную мембрану имитирует азотное голодание [125]. Таким образом, нитрат прямо или косвенно регулирует экспорт AtNLP7 в ядро, что приводит к его быстрому накоплению в ядре. Такое посттрансляционное регулирование подчеркивает важность AtNLP7 для первичного нитратного ответа.

Вторым по изученности NLP можно считать AtNLP6, он наиболее близок к AtNLP7, однако, мутации в *AtNLP6* не вызывают явных дефектов. Тем не менее, мутация *nlp6* в гене, кодирующем AtNLP6, в сочетании с

мутацией *nlp7* усугубляет изменения в экспрессии генов нитратного ответа и в таких мутантах наблюдается нарушение роста [126], что указывает на однонаправленные роли AtNLP6 и AtNLP7. Физиологические функции факторов транскрипции NLP были проанализированы с использованием трансгенных растений *Arabidopsis,* который трансформировали генетической конструкцией для синтеза AtNLP6, слитого с репрессорным доменом SUPERMAN (SUPRD), который обладает способностью подавлять транскрипцию [127]. Растения, в которых синтезируется AtNLP6-SUPRD, демонстрируют сильное торможение роста. Более того, экспрессия большинства нитрат-индуцируемых генов, участвующих в различных клеточных процессах, включая транспорт и ассимиляцию нитратов, углеводный обмен и гормональный ответ, также ингибируется у таких растений. Таким образом, транскрипционные факторы NLP, вероятно, координируют анаболические процессы и рост растений, действуя как главные регуляторы индуцируемой нитратами экспрессии генов. В соответствии с результатами, полученными для мутантов *nlp7* арабидопсиса и растений с синтезом AtNLP6-SUPRD, рост арабидопсиса улучшается за счет избыточной экспрессии гена нативного фактора транскрипции AtNLP7, что подтверждает участие факторов транскрипции NLP в регуляции ответа растений на нитрат и азотное голодание в растениях. Недавно также сообщалось, что у бобовых растений, некоторые транскрипционные факторы NLP регулируют экспрессию чувствительных к действию нитрата генов, участвующих в регуляции поглощения и ассимиляции нитратов, что оказывало влияние на клубенькообразование [128].

Еще одним важным доказательством важной роли NLP арабидопсиса в регуляции ответа растений на нитрат является скрининг белок-синтезирующих дрожжевых библиотек (Y1H) на присутствие белков с чувствительным к нитрату NRE-элементом (от англ. Nitrate-responsive cis-element) длиной 43 п.о. [120]. Оказалось, что все идентифицированные NRE-

связывающие белки *Arabidopsis* принадлежат к семейству NLP. Кроме того, были представлены доказательства того, что N-концевая область, фланкирующая домен RWP-RK, ответственна за активацию AtNLP6 в ответ на передачу сигнала от нитрата. Это может быть согласовано с предлагаемым регулированием с помощью транслокации белка в ядро, так как предсказанная последовательность для ядерного экспорта NES (от англ. nuclear export sequence) у AtNLP7 расположена на N-терминальном конце белка, и гомологичная последовательности присутствует и у AtNLP6.

Транскрипционные факторы NLP широко распространены среди многих групп растений. Так, в 2018 году были идентифицированы девять NLP кукурузы (ZmNLP1-ZmNLP9) и охарактеризована структура этих генов [129]. Кроме того, одни и те же группы NLP у разных видов растений выполняют схожие функции, а также имеют сходные способы регуляции, такие как транскрипционная и посттрансляционная регуляция. Например, экспрессия генов *AtNLP4*, *AtNLP5*, *AtNLP8* и *AtNLP9* у *A. thaliana* [59], *ZmNLP3* и *ZmNLP7* у *Zea mays* [129], *TaNLP1* и *TaNLP2* у *Triticum aestivum* [130] вызвана азотным голоданием. ZmNLP6 и ZmNP8 у кукурузы, как правило, подвергались положительной регуляции при увеличении содержания азота в среде [131]. У риса экспрессия *OsNLP4* снижается под влиянием абиотического стресса и индуцируется при низком содержании фосфатов в среде [59]. Вместе с тем, экспрессия гена *OsNLP1* быстро индуцируется при азотном голодании в корнях риса [132]. С другой стороны, в отличие от AtNLP7, ZmNLP6, ZmNLP8, OsNLP3 и OsNLP4, которые перемещаются между ядром и цитоплазмой [125,129,131], AtNLP8 конститутивно локализуется в ядре, что указывает на механизм, отличный от механизма влияния AtNLP7. Анализ этих результатов указывает на то, что и некоторые другие NLP реагируют на изменение содержания азота в среде как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровнях.

Развитие симбиотических клубеньков на корнях бобовых тесно связано с наличием доступного азота в среде. Известно, что избыточное количество нитрата в почве негативно регулирует образование клубеньков – в этих условиях растения избегают затрат, связанных с формированием клубеньков [133]. Высокие уровни нитратов ингибируют выработку флавоноидов, участвующих в синтезе Nod-фактора [134], развитие ризобиальной инфекции, органогенез и рост клубеньков, а также активность азотфиксации [135]. Кроме того, высокое содержание нитратов ускоряет старение или распад клубеньков [136].

Исследования мутанта с нарушением реакции на нитраты *nrsym1* растения *L. japonicus* показали, что этот признак обусловлен мутацией в гене *LjNLP4* [137]. Мутант *nrsym2* характеризуется мутацией в гене *LjNLP1* и показывает более строгий фенотип, чем *nrsym1* [138]. Однако, только двойные мутанты *Ljnlp4-1 Ljnlp1* показывают полную резистентность к нитратам при клубенькообразовании. Это связано с тем, что гены с регулируемой LjNLP4 экспрессией в основном перекрывались с генами, зависимыми от регуляции LjNLP1, в то время как для LjNLP1 были обнаружены специфичные гены-мишени. Одним из известных механизмов подавления экспрессии генов под влиянием LjNIN, является связывание LjNLP4 с LjNIN через домен PB1 [138]. Кроме того, увеличение экспрессии *LjNLP4* в формирующихся примордиях и клубеньках в ответ на обработку нитратами приводит к конкурентному связыванию с CLE-пептидом RS2 (негативным регуляторным пептидом, активируемым под влиянием нитрата), которое проходит более специфично, чем с транскрипционным фактором NIN [137].

Для бобовых с недетерминированным типом клубеньков также показана ключевая роль NLP1 и NLP4 в нитрат-индуцированной регуляции клубенькообразования. Транскрипционный фактор MtNLP1 может подавлять опосредованную транскрипционным фактором NIN экспрессию гена рецептора к цитокинину CRE1 у растений *Nicotiana benthamiana* и *M.*

*truncatula* [128], что снижает стимулирующий эффект цитокининов на образование клубеньков. Кроме того, MtNLP1 непосредственно связывается с нитрат-регулируемым элементом (NRE) в промоторе гена *MtCEP1* – регуляторного пептида, повышающего восприимчивость к ризобиальной инфекции и образованию клубеньков [139]. Транскрипционный фактор MtNLP1 так же, как и LjNLP4, связывается с транскрипционным фактором NIN через PB1-домен и это, по-видимому, затрудняет взаимодействие с генами-мишенями для NIN [128].

Функциональные особенности NLP1 и их антагонистические отношения с NIN вызывают большой интерес, поскольку эти белки обладают близким филогенетическим родством [65]. Более того, распространено представление о возможной ранней дупликации предшественника генов *NIN* и *NLP1* на основании кластеризации их последовательностей.

Таким образом, NLP является большой группой очень схожих транскрипционных регуляторов, влияющих на опосредованную действием нитратов экспрессию генов у большого числа видов растений. Высокая консервативность этих генов оставляет открытым вопрос о происхождении самого гена *NIN*, имеющегося только у определенной группы растений. Нет сомнений в том, что приобретение транскрипционного фактора NIN явилось важным эволюционным приобретением клады NFC, что отличает их от других видов растений. Однако остается открытым вопрос о том, какие структурные особенности белка и особенности регуляции экспрессии этого гена появились у транскрипционного фактора NIN, что сделало его столь уникальным и отличающимся по функциям от других представителей семейства NLP.

# Глава 2. Материал и методы исследования

## 2.1. Растительный материал

Основной объект исследования горох посевной *Pisum sativum* лабораторной линии SGE [140], а также мутанты этой линии были взяты из коллекции ВНИИСХМ (Санкт-Петербург, Россия). В растениях SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) [141,142] и SGEFix$^-$-5 (*ipd3/cyclops*) [143–145] происходит мутация гена *PsSym33/MtIPD3/LjCYCLOP* в позициях 1356 и 318 соответственно, частично или полностью редуцируя важные сайты для работы гена, вследствие чего фенотипы SGEFix$^-$-2 и SGEFix$^-$-5 представляют собой не строгий и строгий мутант соответственно. Также в работе была использована линия SGENod$^-$-3 (*nin-1*) – мутанты по гену *PsNIN*, в результате транзиции в позиции 160, глутамин преобразовался в стоп-кодон. Эта мутация привела к утрате всех функциональных доменов NIN и определила фенотип SGENod$^-$-3 (*nin-1*) как не образующий клубеньки [46]. Горох посевной *P. sativum* французского сорта Cameor использовался для определения активности промоторных областей гена *PsNIN*. Сорт Finale гороха посевного использовался в качестве матрицы для амплификации фрагментов, участвующих в синтезе белков в том числе при взаимодействии в ДДС и скрининге.

Люцерна усеченная *Medicago truncatula* A17 была использована в качестве материала для амплификации промоторных областей гена *MtSEUSS* и получения композитных растений.

Для изучения функционирования транскрипционного фактора NIN в корнях небобовых растений использовали растения *Solanum lycopersicum* сорта Carmello и проростки *Humulus lupulus* сорта Cascade.

## 2.2. Бактериальные штаммы и условия культивирования

Для получения конструкций были использованы компетентные клетки

штаммов *E. coli* XL-blue MRF, DH5a, TOP10 и DB3.1, рост этих штаммов осуществлялся при 37°C на питательной среде LB.

Трансформацию растений проводили *Agrobacterium rhizogenes* Arqua 1. Штамм выращивали при 28°C на агаризованной среде TY [146] с добавлением спектиномицина в конечной концентрации 0,05 мг/мл. Инокуляцию растений проводили штаммами *Rhizobium johnstonii* bv. *viciae* RCAM3841 для гороха линии SGE и Cameor, *Rhizobium ruizarguesonis* bv. *viciae* RCAM1026 для растений хмеля и *Sinorhizobium meliloti* 2011 для растений люцерны. Ризобии выращивались при 28°C на агаризованной среде YEM [147], содержащей стрептомицин в конечной концентрации 0,5 мг/мл. После бактериальный инокулюм рос в жидкой среде B-[148] с добавлением стрептомицина при постоянном перемешивании на скорости 220 об/мин и температуре 28°C до плотности OD600 = 1.

### 2.3. Обработка растений цитокининами

Семена SGE и SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) стерилизовали серной кислотой в течение 10 мин, промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой и оставляли набухать в воде при умеренном перемешивании на 40–60 мин, затем семена переносили на чашки с 1%-ным водным агаром и стратифицировали при + 4 °C в течение ночи для равномерного прорастания.

Семена проращивали при комнатной температуре в темноте 5–6 дней, после чего переносили в горшки с вермикулитом, пропитанные средой Jensen, и выращивали в климатической камере (Binder, Туттлинген, Германия) при 21°C с фотопериодичностью 16 часов/8 часов и влажности 64%. Проростки гороха инокулировали *R. johnstonii* RCAM3841 по 2 мл на растение. Через 5 дней растения обрабатывали 6-БАП в нескольких конечных концентрациях, таких как 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ и 15 мкМ, и объемом 50 мл на горшок (цитокинины разводили стерильной дистиллированной водой). Обработку проводили через день, контрольные растения поливали в том же объеме

стерильной дистиллированной водой. Клубеньки собирали через 14 дней для цитологического анализа и анализа экспрессии генов.

## 2.4. Молекулярные методы

### 2.4.1. Получение генетических конструкций

#### 2.4.1.1. Конструкции для локализации экспрессии промоторов генов *NIN* и *SEUSS*

Для изучения локализации активности промотора гена *NIN* гороха, амплифицировали различные участки промоторных областей, находящихся на значительном расстоянии друг от друга (см. список праймеров). В качестве матрицы для амплификаций была использована очищенная ДНК гороха сорта Cameor, выделенная из листьев с использованием CTAB.

Амплификацию промоторной области размером 4100 п.о., включающей сайты посадки IPD3/CYCLOPS и NSP1/2 проводили с помощью высокопроизводительной полимеразы Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™, США). Последовательности CE-элемента (456 п.о.) и GA-элемента (173 п.о.), а также фрагмента pPsNIN-GA-CYC (4273 п.о.) получили с использованием Pfu-полимеразы MBUsion (МБС-Технология, Новосибирск). Для клонирования этих элементов в промежуточный вектор использовали набор pENTR™/D-TOPO™ (Thermo Scientific™, США), содержащий вектор pENTR с сайтами для LR-рекомбинации attL1-attR2r. Дальнейшее объединение фрагментов этих участков производилось методом overlap-extension ПЦР, перекрывание pPsNIN-CE-GA составило 15 нуклеотидов, pPsNIN-CE-CYC – 34 нуклеотида и pPsNIN-CE-GA-CYC – 173 нуклеотида, которые составляют полную последовательность pPsNIN-GA.

Для определения локализации активности промотора гена *MtSEUSS* была амплифицирована промоторная область 3500 п.о. до стартового кодона. Реакцию проводили с использованием полимеразы MBUsion (МБС-Технология, Новосибирск) на матрице ДНК *M. truncatula* A17. Было проведено два раунда амплификации в результате которых фрагмент был фланкирован

последовательностями для рекомбинации по сайтам attB1 и attB2r. Полученная последовательность была перенесена в промежуточный вектор pDONR221 посредством реакции с Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Scientific™, США).

Для всех перечисленных фрагментов конечным вектором доставки стал pKGW-GGRR, полученный из лаборатории молекулярной биологии растений университета Вагенингена. Методом рекомбинации с использованием набора Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Scientific™, США) были получены конструкции, содержащие бактериальный ген *β-глюкуронидазы (GUS)* под промоторами генов *NIN* и *SEUSS*.

#### 2.4.1.2. Конструкции для комплементации мутанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*)

На основании того, что конститутивная экспрессия гена *PsNIN* в растениях мутанта SGENod$^-$-3 (nin-1) не приводит к комплементации мутации, были получены конструкции с промоторами, содержащими следующие регуляторные элементы pPsNIN-CE-CYC и pPsNIN-CE-GA-CYC. Для этого последовательность была амплифицирована в двух раундах ПЦР с использованием Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™, США) на матрице уже полученных pENTR векторов с пришиванием адаптеров attB4-attB1r. Для рекомбинации по сайтам attB4 и attB1r в вектор pDONR_P4-P1r использовали набор Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Scientific™, США).

Кодирующая последовательность гена транскрипционного фактора NIN гороха амплифицировали с использованием Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™, США) на матрице кДНК клубеньков гороха линии SGE через 14 дней после инокуляции ризобией RCIAM 3841 (SGE 14д пи). Продукт ПЦР размером 2766 п.о. с использованием набора pENTR™/D-TOPO™ (Thermo Scientific™, США) был встроен в вектор pENTR, содержащий сайты для последующей рекомбинации attL1-attR2r. В том же векторе была получена последовательность кодирующей части гена *PsNIN* с

модификацией N-концевого домена. Были амплифицированы три фрагмента с перекрывающимися участками. В качестве матрицы использовали кДНК двухнедельных клубеньков SGE, реакцию проводили Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™, США). Полученные два фрагмента 381 п.о. от стартового кодона и 2066 п.о. С-концевого фрагмента гена *PsNIN* и один фрагмент GAF-подобного домена гена *PsNLP1* (451 п.о.) были поочередно соединены в условиях overlap-extension ПЦР. Перекрывание для всех фрагментов составило 30 нуклеотидов.

В качестве третьего компонента системы был использован коммерческий вектор pEN-R2-*T35S*-L3, содержащий последовательность терминатора вируса мозаики цветной капусты T35S.

С использованием получившихся конструкций была проведена рекомбинация по множественным сайтам рекомбинации с помощью LR Clonase™ II Plus (Thermo Scientific™, США) в конечный вектор pKGW-RR-MGW, содержащий сайты рекомбинации attR4 и attR3, полученный из университета Вагенингена (Нидерланды).

**2.4.1.3.Конструкции для скрининга с помощью дрожжевой двугибридной системы (ДДС)**

Полноразмерную кодирующую последовательность гена *PsNIN* гороха использовали для оценки взаимодействий белков в дрожжевой двугибридной системе (ДДС). Амплификацию проводили на матрице кДНК клубеньков растений гороха сорта Finale через 21 день после инокуляции ризобиями (*Rrv* RCAM1026) с помощью набора Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™, США) с помощью праймеров, содержащих последовательности для рекомбинации по сайтам attB1 и attB2r. Посредством двух раундов рекомбинации фрагмент был сначала перенесен в вектор pDONR221 набором Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Scientific™, США), а после в вектор pDEST32 по сайтам attL1 и attR2r с использованием набора Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Thermo

Scientific™, США). Все олигонуклеотиды разработаны с использованием программ Vector NTI и DNA Star и синтезированы компанией Евроген (www.evrogen.com).

### 2.4.2. Дрожжевая двугибридная система

Для скрининга библиотек клонированных фрагментов комплиментарной ДНК (кДНК), которые транслируются в клетке, в дрожжевой двугибридной системе был использован оптимизированный протокол трансформации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма pJ69-4A. Компетентные клетки дрожжей, содержащие вектор pDEST32 с кодирующей последовательностью гена *PsNIN* сорта Finale, были трансформированы созданной нами ранее библиотекой кДНК в векторе pDEST22 в количестве 20 мкг на реакцию. Библиотека была получена на основе РНК, выделенной из корней гороха *P. sativum* сорта Finale, инокулированных ризобией *R. ruizarguesonis* RCAM1026 [149]. В качестве контроля использовали компетентные клетки дрожжей, содержащие пустой вектор pDEST32, трансформированные той же библиотекой. Трансформированные клетки росли на среде SC-LTH с содержанием 3-аминотриазола в концентрации 10 мМ. Также более 100 колоний были селектированы на средах SC-LTA, SC-LTH с 3-аминотриазолом в концентрации 50мМ и 100 мМ. После был сделан соскоб чашек, содержащих колонии после трансформации библиотекой без жесткой селекции и отселектированных колоний. Из клеток дрожжей был выделен пул плазмидной ДНК для варианта без селекции и второй пул для селектированных колоний.

### 2.4.3. Выделение нуклеиновых кислот и ПЦР

Двухнедельные клубеньки дикого типа SGE и SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) без обработки и обработанные 10 мМ 6-БАП измельчали в жидком азоте и выделяли суммарную РНК с помощью реактива PureZol (Bio-Rad Laboratories,

USA) согласно протоколу производителя. Для удаления геномной ДНК использовали DNAse I (Thermo Fisher Scientific, USA).

Плазмидную ДНК дрожжей выделяли с использованием буфера, содержащего сорбитол и зимолеазу. Клетки ресуспендировали в буфере и выделяли на колонках (Евроген, Россия). Поскольку NGS-секвенирование библиотек проводится для небольших фрагментов ДНК, плазмиды разрушали с помощью ультразвука при амплитуде 60 в течение 30 минут. После обработки ультразвуком ДНК наносили на 1% агарозный гель, разгоняли в 1х ТАЕ-буфере и для каждой библиотеки вырезали фрагмент от 200 до 300 п.о. Фрагменты из агарозного геля выделяли в йодиде натрия (NaI) с использованием $SiO_2$.

Большинство фрагментов после электрофореза в агарозном геле выделяли коммерческим набором Cleanup Standard (Евроген, Россия). Бактериальные векторы выделяли коммерческими наборами Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) и набор для выделения плазмидной ДНК из бактерий, diaGene (diaGene, Россия).

Для предотвращения образования ДНК-петель при амплификации промоторных областей использовали протокол, в котором отжиг и элонгация объединены и происходили в два этапа. Амплификации других фрагментов проводили в стандартных условиях, подбирая условия для отжига праймеров согласно Tm калькулятору (NEB, США). Количественный ПЦР в режиме реального времени проводили в системе CFX96 с использованием 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия).

### 2.4.4. Подготовка библиотек и секвенирование

Подготовку библиотек для РНК-секвенирования растений SGE Fix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) проводили с использованием набора для очистки мРНК – NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module, набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina и набора праймеров NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 2) (New England Biolabs,

Роули, Массачусетс, США). На всех стадиях материал очищали с помощью гранул AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, Калифорния, США).

Подготовку проб для секвенирования дрожжевых библиотек клонированных фрагментов кДНК проводили с использованием набора для подготовки ДНК NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina и набора праймеров NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1) (New England Biolabs, Роули, Массачусетс, США). Секвенирование последовательностей ДНК для проверки конструкций проводили в компании Евроген, а также с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

## 2.5. Получение композитных растений

### 2.5.1. Трансформация гороха

Семена гороха посевного лабораторной линии SGE, мутанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*) и сорта Cameor были стерилизованы концентрированной серной кислотой в течение 7 минут и промыты стерильной дистиллированной водой несколько раз. Далее семена помещали на 1% водный агар и проращивали 4-5 дней в темноте при комнатной температуре.

На 4-5 день после стерилизации проростки трансформировали методом подколки. В зоне гипокотиля совершали прокол до середины стебля, после чего на поранение наносили небольшое количество *A. rhizogenes* Arqua 1, содержащие вектора для агробактериальной трансформации. Проростки были перенесены на агаризованную среду Jensen, корни трансформированных растений закрывали от света и помещали в климатическую камеру на 9-10 дней с фотопериодом 16ч/8ч, температурой 21°C и относительной влажностью 40. После трансформанты переносились в более объемные сосуды на среду Jensen и росли 7 дней в тех же условиях. После не трансгенные корни были обрезаны, и растения перемещены в вермикулит фракции 0,8 см, пропитанный средой Красильникова-Кореняко, где через несколько дней проводили

инокуляцию ризобией, по 2 мл культуры плотностью OD600 = 1 под каждое растение. Корни композитных растений снимали через 21 день после инокуляции.

### 2.5.2 Трансформация люцерны

Семена стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 12-14 минут до появления красных точек. После промывали стерильной дистиллированной водой 6 раз, обрабатывали 15 % гипохлоритом натрия NaOCl (0,1 М) в течение 1,5 мин и также промывали. Стерильные семена помещали на 1% водный агар, закрывали от света и стратифицировали при температуре +4°С в течение суток, после чего перемещали в комнатную температуру на 2 дня.

Корни проростков помещали на квадратные чашки Петри 16 см с питательной средой Fahraeus [150] между фильтровальной бумагой. Закрытые чашки оборачивали крафт-бумагой в зоне расположения корней для затенения и переносили в климатическую камеру. Трансформацию проводили через 48 часов после переноса на свет.

Проростки трансформировали штаммом *A. rhizogenes* Arqua 1 посредством среза в области гипокотиля и нанесения бактериальной массы на место поранения. После растения оставляли в тех же условиях, что и при проращивании. Через 10 дней растения переносили в аналогичные условия на среду Emergency с добавлением 0,3 мг/мл антибиотика цефотаксима, где держали до появления трансгенных корней. Композитные растения люцерны переносили в вермикулит, пропитанный 0,5×Fahraeus [150] и через два дня инокулировали *S. meliloti* с оптической плотностью суспензии OD600 = 1.

### 2.5.3 Трансформация томата и хмеля

Семена томата сорта Carmello и хмеля сорта Cascade стерилизовали 15 % гипохлоритом натрия NaOCl (0,1 М) в течение 5 мин, далее промывали 6 раз дистиллированной стерильной водой и выдерживали в 10 % $H_2O_2$ в течение 2

мин. После этого промывали семена 3 раза большими объемами стерильной воды. Стерилизованные семена помещали в чашки Петри на агаризованную среду Мурасиге-Скуга (МС) без сахарозы [151] и выдерживали в темноте в течение одних суток при 4 °С. Далее чашки переносили в условия комнатной температуры и проращивали в темноте в течение 5-7 суток. Молодые проростки переносили в стерильные сосуды (объем 400 мл) для выращивания растений со средой МС, содержащей 3 % сахарозу, и культивировали при 21°С, 60 % влажности и фотопериоде 16 ч свет/8 ч темнота 7-8 суток.

Проростки, давшие побеги обрезали в области гипокотиля и трансформированы штаммом *A. rhizogenes* Arqua 1 посредством нанесения небольшого количества бактериальной массы на место поранения. Трансформированные проростки (4-5 шт.) помещали на агаризованную среду МС без сахарозы в чашку Петри между двумя листами фильтровальной бумаги, смоченной в стерильной дистиллированной воде. Область корней на чашках закрывали фольгой. Чашки помещали в фитотрон и культивировали в вертикальном положении при температуре 21 °С, 60 % влажности и с фотопериодом 16 ч свет/8 ч темнота в течение 10-14 суток до появления каллуса. После этого растения переносили на среду МС с сахарозой (3 %), содержащую 0,3 мг/мл антибиотика цефотаксима и дополнительно инкубировали в тех же условиях в течение 5-10 суток до появления трансгенных корней. Композитные растения переносили в вермикулит, политый 0,5× средой Fahraeus, и инкубировали в условиях повышенной влажности (прикрывали прозрачными полиэтиленовыми пакетами) в течение 2-3 суток (21 °С, 16 ч свет/8 ч темнота). Затем растения инокулировали по 2 мл на растение штаммом *R. ruizarguesonis* CIAM1026 с оптической плотностью суспензии OD600 = 0,5 для растений томата и OD600 = 1 для хмеля.

## 2.6. Микроскопия

### 2.6.1. Фиксация материала

Клубеньки для световой микроскопии фиксировали в свежеприготовленном растворе 3 % параформальдегида в 1/3 концентрации буфера MTSB с добавлением 0,25% глутаральдегида, 0,3% Tween-20, 0.3% Triton-X-100. Для оптимального проникновения фиксатора воздух из ткани откачивали трижды по 7 мин с 15 мин интервалом при 0,9 бар, используя вакуумный насос ME 1C (Vacuubrand, Германия) и оставляли на ночь при 4 °C.

Для электронной микроскопии клубеньки фиксировали в растворе 2,5% (v/v) глутарового альдегида (EMS, Хэтфилд, Пенсильвания, США) и 2% (w/v) формальдегида (EMS, Хэтфилд, Пенсильвания, США) в 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,4) в течение ночи и после фиксации в ледяном 2% растворе OsO4 (EMS, Хэтфилд, США) в том же буферизовали в течение 1,5 ч. Образцы обезвоживали последовательно в этаноле и ацетоне и заливали эпоксидной смолой EmBed 812 (EMS, Хэтфилд, Пенсильвания, США). Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие срезы были сделаны с использованием ultratome EM UC7 (Leica, Вена, Австрия). Полутонкие срезы окрашивали 20% раствором эпоксидной тканевой краски с толуидиновым синим и основным фуксином (EMS, Хэтфилд, Пенсильвания, США) в 50% этаноле и наблюдали под световым микроскопом DM2500 (Leica, Вена, Австрия). Ультратонкие срезы окрашивали на сетках 2%-ным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца Рейнольдса. Изображения были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Токио, Япония), оснащенного боковой камерой Veleta (Olympus, Токио, Япония) при напряжении 80 кВ. Работы проводились в ресурсном центре Санкт-Петербургского Государственного Университета.

### 2.6.2. Получение срезов и окраска пропидий иодидом (PI)

Срезы клубеньков толщиной 50 мкм для световой микроскопии и 100 мкм для электронной были изготовлены на автоматическом прецизионном

ротационном микротоме Microm HM-360. Срезы 50 мкм окрашивали PI в темноте для визуализации ядер. Срезы просматривали с применением микроскопа Carl Zeiss Axio Imager с галогенным осветителем и камеры Axiocam 712 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Обработку снимков производили с помощью программного обеспечения ZEN 3.4 Blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и Adobe Photoshop 2021 (Adobe Inc, США).

### 2.7. Компьютерные программы и статистические методы

Полученные транскриптомные считывания для эксперимента с обработкой мутантов *ipd3/cyclops* были обрезаны адаптерами Illumina. Дополнительно, концы считывания были обрезаны по качеству секвенирования (оценка phred33 < 20) с использованием Trimmomatic [152]. Для получения количества прочитанных как для транскрипта, так и для гена файлы fastq были дополнительно обработаны с помощью пакета RSEM [153] с использованием транскриптома, сгенерированного из генома v1a Pisum sativum [154]) в качестве эталона. Дифференциальную экспрессию проводили на полученной матрице необработанного подсчета 9 отдельных образцов с использованием пакета DESeq2 R [155]. Транскрипты считались дифференциально экспрессируемыми с скорректированным значением p <0,05 и абсолютным значением log2 (кратное изменение)>2. Анализ онтологии генов [156] анализ обогащения набора генов проводили с использованием пакета GSEABase R [157] со значениями отсечения: отношение шансов>2 и значение p <0,05.

Для анализа результатов секвенирования после скрининга библиотеки кДНК в дрожжевой двугибридной системе проводили выравнивание прочтений, очищенных от служебных последовательностей, на референсный геном гороха v1a *Pisum sativum* сорта Cameor [154] и сорта ZW6 [158] с помощью программы HISAT2. Для подсчета количества прочтений, приходящихся на каждый ген, использовали программу FeatureCounts. Для нормализации полученных данных количество прочтений было представлено

в виде RPKM (Reads per kb million). Далее для каждого гена было подсчитано соотношение RPKM в образце по отношению к контрольным образцам и отобраны те гены, для которых это соотношение было выше 5. Для выбранных таким образом генов была проведена трансляция в аминокислотную последовательность для оценки сохранения правильной рамки считывания.

### 2.7.1. Реконструкция филогенетических деревьев

Аминокислотные последовательности транскрипционного фактора NIN взяты у таких видов как *Cicer arietinum, Lathyrus sativus, Lens culinaris, Melilotus albus, Meducago truncatula, Pisum sativum, Trifolium pratense, Vicia faba, Cajanus cajan, Glycine max, Lupinus angustifolius, Lotus japonicus, Phaseolus vulgaris, Vigna angularis*.

Выравнивание аминокислот производилось с использованием алгоритма ClustalW. Филогенетические взаимоотношения генов семейства NLP и NIN были реконструированы с использованием метода максимального правдоподобия и матричной модели JTT [159]. Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в бутстреп-тесте (1000 повторений), показанном рядом с ветвями [160]. Исходные деревья для эвристического поиска были автоматически сгенерированы путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с использованием модели JTT, а затем выбора топологии с более высоким значением логарифмического правдоподобия. Эволюционный анализ был проведен в MEGA11 [161] и при использовании онлайн-сервиса IQTREE [162] и дальнейшей визуализацией в iTOL [163].

### 2.7.2. Поиск направляющей РНК

Для гена *MtSEUSS* (MtrunA17_Chr1g0159441) сделали анализ доменной структуры с помощью ресурса InterProScan. В границах функционального домена подбирали направляющую РНК, отдавая предпочтение началу LIM-домена. Подбор осуществляли в программе CRISPOR [164], Выбраны

направляющие со score > 0,5 и расположением в начале предполагаемого домена. Далее отобраны те, у которых нецелевые мишени имеют несоответствия до 6 нуклеотидов от последовательности PAM (если мишени обнаружены в составе CDS) и те, что не дают большое количество вторичных структур (TSL; GSL 0; CBP < 7; TBP < 12; IBP <6).

Выбранные последовательности были проанализированы с помощью программы Cas-OFFinder [165], при этом для каждой был проведен дополнительный поиск неспецифичных мишеней (офф-таргетов). При этом указывали PAM 5'-NRG-3', несоответствие в количестве трех нуклеотидов и максимальные возможные размеры ДНК- и РНК-петель, возникающие при комплементации направляющей последовательности к мишени. Расчет количества наиболее вероятных офф-таргетов проводили в программе RStudio. Полученные офф-таргеты для каждой направляющей РНК выравнивали с помощью BLAST на референсный геном во избежание сдвига рамок считывания других генов.

### 2.7.3. Статистические методы

При анализе структуры корней использовали данные трех независимых биологических экспериментов (4-5 растений на повторность одного варианта обработки). Длину корней и количество клубеньков подсчитывали отдельно с помощью однофакторного анализа ANOVA. Поскольку для всех вариантов не было одинакового количества измерений, между всеми группами был проведен попарный t-критерий для определения различий внутри групп.

Для подсчета клеток для каждого варианта использовали пятнадцать медианных срезов из трех разных повторов эксперимента. Для всей выборки был проведен однофакторный дисперсионный анализ по проценту деформированных инфекционных нитей и количеству зарегистрированных бактериальных истечения из инфекционных нитей отдельно, что показало высокий уровень значимости для обеих групп (p-значение <0,001). Далее, для расчета разницы внутри групп по каждому из показателей был проведен

апостериорный тест Тьюки-Крамера с использованием таблиц критических значений стьюдентизированного диапазонного распределения (q) для семейной альфа 0,5. Анализ изменений экспрессии генов проводили на основании одного повторения. Значения Ct (Cq) сводили в общую таблицу, нормированную экспрессию пересчитывали для каждого технического повторения отдельного гена. После этого был проведен стандартный однофакторный анализ ANOVA и апостериорный тест Тьюки-Крамера.

# Глава 3. Результаты исследований

## 3.1. Поиск и анализ структурных особенностей транскрипционного фактора NIN, определивших его уникальную роль в контроле развития бобово-ризобиального симбиоза

### 3.1.1. Филогенетический анализ представителей семейства транскрипционных факторов NLP

Суперсемейство транскрипционных факторов с RWP-RK-доменом (ДНК-связывающий домен) включает два семейства NLP (NIN-like proteins) и RKD (RWP-RK domain proteins). При этом транскрипционный фактор NIN является основателем семейства NLP (от англ. NIN-like proteins).

Первые попытки проведения филогенетического анализа для представителей семейства NLP были сделаны для модельных растений *Arabidopsis* (AtNLP1-9), риса (OsNLP1-3) и бобового растения *L. japonicus* (LjNLP1-5) [66]. Помимо ДНК-связывающего RWP-RK-домена, все транскрипционные факторы семейства NLP имеют достаточно консервативный PB1-домен на С-конце и характерные для этого семейства I, II, III и IV-домены на N-конце белка [45].

С целью реконструкции филогенетических отношений между членами семейства NLP у бобовых растений, нами на первом этапе исследований был проведен поиск в базах данных аминокислотных последовательностей NIN и других NLP у гороха посевного *P. sativum* (Ps), модельных растений люцерны усеченной *M. truncatula* (Mt) и лядвенца японского *L. japonicus* (Lj) и представителей семейства *Cannabaceae – Parasponia andersonij* (Pan), *Trema orientalis* (To) (рис. 3).

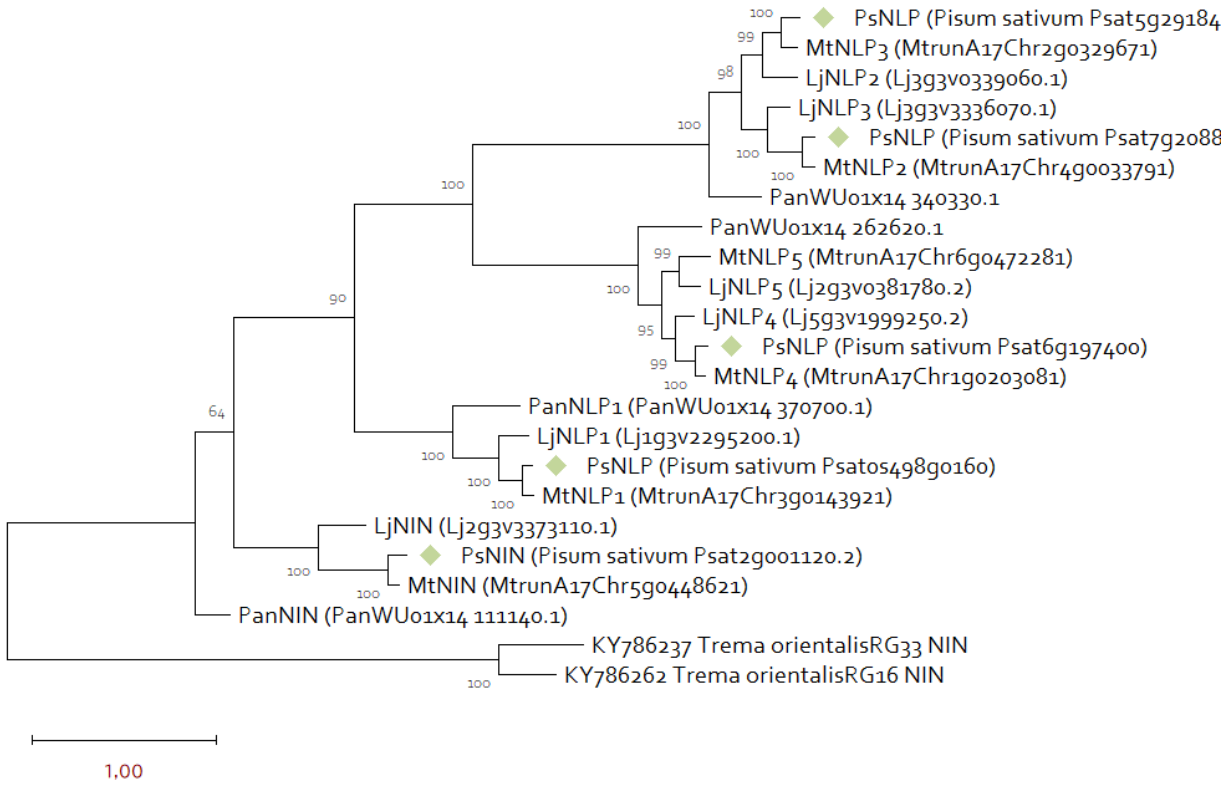


**Рисунок 3**. – Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основе аминокислотных последовательностей белков семейства NLP для растений *P. sativum*, *M. truncatula*, *L. japonicus*, *P. andersonii* и *T. orientalis*. Числа обозначают поддержку ветвей на основе 1000 итераций метода bootstrap. Ромбами отмечены последовательности NLP гороха посевного.

Для укоренения филогенетического дерева использовали аминокислотную последовательность псевдогена *TaNIN* тремы *T. orientalis*, который лишился функциональности из-за делеции на 5’-конце кодирующей последовательности гена, что привело к утрате части N-концевого домена этого белка [51]. Было выявлено, что наблюдается кластеризация последовательностей NIN и NLP1, NLP2 и NLP3, а также NLP4 и NLP5 у использованных для анализа бобовых растений и представителей коноплевых – *Parasponia andersonii*. У модельного растения люцерны усеченной *M. truncatula* в геноме было выявлено 5 генов *MtNLP1-5* и сам *MtNIN*. Наиболее близкая гомология была выявлена нами для MtNIN и MtNLP1. Ранее

проведенный в другой работе филогенетический анализ для *M. truncatula* также показал, что NIN имеет наиболее близкую гомологию с NLP1 [65].

Анализ экспрессии 5 генов *NLP* и *NIN*, представленный в геномном атласе *M. truncatula* [109] показывает, что ген *MtNLP1* экспрессируется на высоком уровне в клубеньках и корнях, *MtNLP2* чрезвычайно высоко и избирательно экспрессируется в клубеньках, *MtNLP3* экспрессируется в клубеньках и листьях, *MtNLP4* высоко экспрессируется в листьях, корнях и стеблях, тогда как для *MtNLP5* не выявлено значимых изменений в экспрессии в разных тканях.

Функциональная роль MtNLP1 остается малоизученной, однако некоторые исследования указывают на роль MtNLP1 как основного антагониста MtNIN при формировании клубеньков при высоких концентрациях нитратов [128]. MtNLP2 играет положительную роль в симбиотической фиксации азота, предположительно связанную с регуляцией экспрессии гена леггемоглобина в клубеньках [166], но для MtNLP3 отсутствуют данные о функционировании в клубеньках и корнях. Известно, что функция транскрипционного фактора MtNLP4 связана с подавлением клубенькообразования при высоких концентрациях нитрата в среде [128,167], однако для MtNLP5 на данный момент нет определенных данных о его функционировании. В связи с этим, на основании представленной кластеризации можно предположить, что она, вероятно, связана с участием белков в однонаправленных процессах (например, NLP2 и NLP3, а также NLP4 и NLP5) при регуляции роста и развития растений, а также контроле клубенькообразования при симбиозе.

Реконструкция филогенетических отношений для близких гомологов NIN и NLP1 указывают на возможную дупликации предкового гена и последующую параллельную эволюцию. Подобное распределение ветвей на филогенетическом дереве также характерно и для PaNIN и PaNLP1 *P.*

*andersonii*., что говорит о древности этого события дупликации и неофункционализации.

Для выявления филогенетических отношений для представителей семейства NLP у гороха посевного *P. sativum* нами также было построено более подробное дерево с использованием большего количества растений и представленное в приложении (рис 1 Приложения). Помимо гороха, люцерны усеченной и лядвенца, нами были использованы последовательности NLP *Phaseolus vulgaris* (Pv), *Cicer arietinum* (Ca), *Lathyrus sativus* (Ls), *Lens culinaris* (Lc), *Melilotus albus* (Ma), *Trifolium pratense* (Tp), *Vicia faba* (Vf), *Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Lupinus angustifolius* (Lan), *Vigna angularis* (Van), четырех растений из семейства *Cannabaceae – Parasponia andersonij* (Pan), *Trema orientalis* (To), *Humulus lupulis* (Hl) и *Cannabis sativa* (Cs), а также *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os) и *Solanum lycopersicum* (Sl) и проведен филогенетический анализ для этих последовательностей. У гороха было выявлено 4 последовательности PsNLP1-PsNLP4 и 1 PsNIN (табл. 1).

**Таблица 1**. Соответствие идентификаторов генов *PsNLP* гороха посевного сорта Cameor генома версии v1 [154] и их названий

| Идентификатор | Название гена |
|---|---|
| Psat2g001120 | *PsNIN* |
| Psat0s498g0160 | *PsNLP1* |
| Psat7g208800 | *PsNLP2* |
| Psat5g291840 | *PsNLP3* |
| Psat6g197400 | *PsNLP4* |

Дополнительное дерево было построено для подтверждения того, что выявленные для небольшого количества растений филогенетические связи являются достоверными, а не следствием использования разных подходов для построения филограммы. Проведенный анализ показал сходную кластеризацию белков семейства NLP и позволил выявить ближайшие

гомологи PsNLP для транскрипционного фактора PsNIN у гороха (табл.1). На основании проведенного анализа ближайшим гомологом PsNIN действительно оказался PsNLP1.Таким образом, нами был определен ближайший гомолог PsNIN у гороха (PsNLP1), который был использован в дальнейших экспериментах для сравнительного изучения тех модификаций в белке NIN и особенностей регуляции кодирующего этот белок гена, которые определили его рекрутирование для контроля развития симбиотических клубеньков.

### 3.1.2. Анализ структурной организации транскрипционного фактора NIN у гороха посевного *P. sativum*

Согласно классификации авторов, впервые выявивших транскрипционный фактор NIN у бобовых растений, помимо консервативных RWP-RK и PB1 доменов на С-конце, в составе белков семейства NLP присутствуют 4 домена – I, II, III и IV на N-конце [45]. Более поздние работы выделили в составе этих 4 доменов несколько мотивов – 4, 5, 6, 7, 8 и 9 [59]. При этом 4, 5 и 6 мотивы составили так называемый GAF-домен, который по прежней классификации соответствует части I и II доменам. GAF-домен может вовлекаться в связывание с различными субстратами, такими как оксоглутарат, нитрат, цАМФ и т.д. Транскрипционный фактор NIN имеет некоторые отличия от всех NLP, включая NLP1, в GAF-домене (в мотивах под номерами 4, 5 и 6) [59]. У всех NLP эти мотивы присутствуют в полном размере, поэтому долгое время считалось, что у NIN они усечены.

Известно, что под влиянием обработки нитратом у растений *A. thaliana* активируется сигнальный путь с участием кальция, который влияет на регуляцию $Ca^{2+}$-зависимых протеинкиназ CDPK (от англ. calcium-dependent protein kinase). Среди них протеинкиназы AtCDPK10, AtCDPK30 и AtCDPK32 фосфорилируют консервативный остаток серина в 4 мотиве GAF-домена транскрипционных факторов NLP (серин 205 в AtNLP7), что приводит к транслокации NLP в ядро и активации нитрат-регулируемых генов [119].

Множественное выравнивание факторов транскрипции NLP для использованных нами большого набора растений показало наличие консервативного серина у всех NLP. Более того, множественное выравнивание позволило определить расположение аминокислоты серина (S) между 4 и 5 мотивами. Однако у транскрипционных факторов NIN этот консервативный S не выявляется, возможно из-за утраты функциональности.

Анализ растений семейства *Cannabaceae* - параспонии, тремы, хмеля и конопли [51] показал, что у тремы, хмеля и конопли, которые не образует симбиоз и имеют дефектный NIN, утрачиваются именно мотивы 4, 5 и 6 (GAF-домен). Мы предположили, что именно со структурными особенностями этих мотивов и может быть связана функциональная активность NIN.

Нами было проведено выравнивание (рис. 4), целью которого являлось выявить различие этих мотивов у NIN и NLP у использованных для анализа растений. Для более обширного анализа были взяты не только последовательности из доступных баз данных, но и были определены последовательности 4, 5 и 6 мотивов (GAF-домена) у таких бобовых растений, как донник *Melilotus officinalis*, чина *Lathyrus sativus*, вика *Vicia faba* и вавиловия *Vavilovia formosa*. Для этого был проведен подбор вырожденных праймеров для амплификации последовательностей, кодирующих соответствующие мотивы 4, 5 и 6 N-терминального домена транскрипционного фактора NIN.

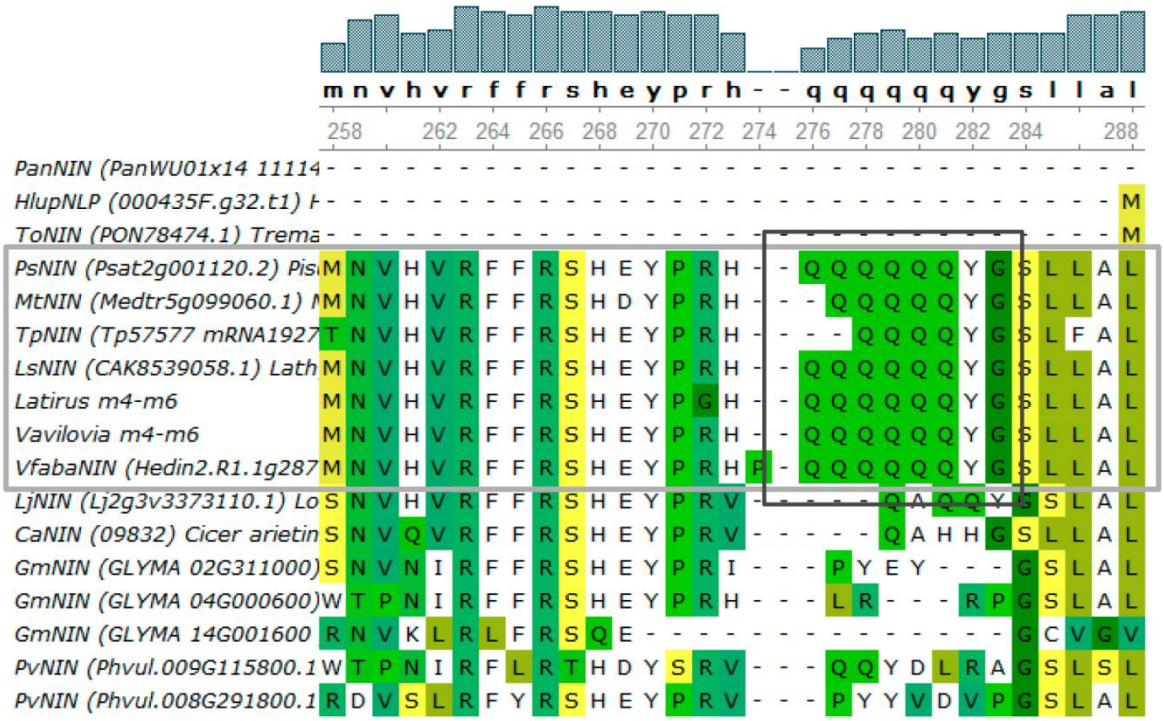


**Рисунок 4**. Выравнивание последовательностей мотивов 4, 5 и 6 транскрипционных факторов NIN бобовых растений, а также тремы и хмеля с использованием алгоритма ClastalW. Для выравнивания из баз данных были взяты последовательности *H. lupulus*, *T. orientalis*, *P. sativum*, *M. truncatula*, *L. japonicus*, *P. andersonii*, *G. max*, *P. vulgaris*, *C. arietinum* и *T. pratense*. Последовательности мотивов 4, 5 и 6 растений *Melilotus officinalis*, *Lathyrus sativus*, *Vicia faba* и *Vavilovia formosa* были амплифицированы и секвенированы. В рамке отмечены последовательности NIN у растений, образующих недетерминированные клубеньки.

Выравнивание показало, что 4, 5 и 6 мотивы у NIN довольно консервативны при сравнении с NLP1, однако мотив 5 имеет аминокислоты характерные только для NIN, что свидетельствует, на наш взгляд, об их функциональной значимости. Анализ 5 мотива по базе PFAM показал, что он может регулироваться цАМФ. Мы также наблюдали паттерн повторяющихся остатков глицина только у последовательностей, относящихся к растениям с недетерминированным типом клубеньков. Выравнивание большего числа аминокислотных последовательностей транскрипционного фактора NIN у разных бобовых подтвердило уникальность этого паттерна, а также выявило

возможный консерватизм 6 мотива у бобовых с недетерминированным типом клубеньков (рис. 2 Приложения).

Мы предполагаем, что именно со структурными особенностями 5 мотива (и возможно 6 мотива), в GAF-домене связана функциональная активность NIN в регуляции бобово-ризобиального симбиоза, кроме того, с ним может быть связано и определение типа клубенька: детерминированные и недетерминированные.

### 3.1.3. Поиск новых ко-регуляторов и белков-мишеней действия транскрипционного фактора NIN в контроле развития бобово-ризобиального симбиоза

Наличие особого 5 мотива на N-конце транскрипционного фактора NIN может указывать на его возможное участие в белок-белковых взаимодействиях. С целью поиска ко-регуляторов и мишеней транскрипционного фактора NIN нами был проведен скрининг библиотек клонированных фрагментов кДНК, которые транслируются в клетке, корней гороха сорта Finale, полученных на 7 день после инокуляции, с помощью дрожжевой двугибридной системы, совмещенный с последующим высокопроизводительным секвенированием. В результате анализа были отобраны последовательности, показавшие повышенное количество прочтений в варианте взаимодействия с NIN по отношению к контрольным пробам (табл. 2). Для дальнейшего изучения были выбраны только последовательности, содержавшие открытые рамки считывания. В таблице представлены идентификаторы по двум базам данных гороха (v1 и v2), с помощью которых были проаннотированы выбранные последовательности.

**Таблица 2**. Характеристика белков, показавших взаимодействие с транскрипционным фактором NIN.

| Идентификатор по геному гороха v1 | Идентификатор по геному гороха v2 | Аннотация |
|---|---|---|
| Возможное участие в модификации ТФ NIN | | |
| Psat3g012960 | LOC127132450 | ГТФаза SAR1a |
| Psat7g175520 | LOC127106575 | убиквитин-NEDD8-подобный белок RUB2 |
| Psat2g132960 | LOC127119698 | UDP-арабинопиранозмутаза 1 |
| Psat6g163280 | LOC127092269 | дисульфид-изомераза A6 |
| Psat6g091520 | LOC127092014 | субтилизин-подобная протеаза SBT3.6 |
| Участие в регуляции метаболизма и синтезе белка | | |
| Psat2g043640 | LOC127118309 | белок, ассоциированный с нуклеолярным комплексом 4 |
| Psat5g044440 | LOC127088173 | уропорфириноген-III синтаза |
| Psat5g238360 | LOC127086214 | ФЕП-карбоксилаза |
| Psat1g157000 | LOC127073615 | белок прямого антипатогенного действия PR10-подобный |
| Psat1g168680 | LOC127075557 | пероксидаза E5-подобная |
| Psat2g006640 | LOC127117565 | гомолог EMC8/9 |
| Psat2g033920 | LOC127118188 | рибосомальный белок RPLP0-like |
| Psat7g239160 | LOC127108490 | металлотионеин-подобный белок 1 |

Выявленные нами белки были аннотированы на основании поиска гомологов у других бобовых растений в базе данных NCBI, что позволило предположить их возможные функции при симбиозе.

Некоторые белки, показавшие взаимодействие с NIN, могут непосредственно участвовать в модификации, а следовательно, и регуляции активности транскрипционного фактора NIN (табл. 2). Согласно литературным источникам, ГТФаза SAR1a (гомолог Psat3g012960) участвует в развитии корневых волосков в корнях ячменя посредством контроля везикулярного транспорта между мембранами ER и аппаратом Гольджи [168]. ГТФазы могут оказывать значительное влияние на активность белков при их модификации. Для убиквитин-NEDD8-подобного белка RUB2 (гомолог Psat7g175520) выявлено снижение содержания во время роста семян фасоли [169]. Убиквитинилирование может быть одним из факторов, влияющих на стабильность белка. Для УДФ-зависимой арабинопиранозмутазы 1 (Psat2g132960) показана важная роль в регуляции метаболизма клеток и их деления [170]. УДФ-зависимая модификация белков – один из распространенных способов изменения их активности. Протеин дисульфид-изомераза A6 (PDIA6) активируется при солевом стрессе у люцерны и может выполнять роль шаперона, который необходим для правильного фолдинга белков [171]. Субтилизин-подобная протеаза SBT3.6 может участвовать в посттрансляционной модификации белка. Возможность протеолиза транскрипционного фактора NIN была предсказана в нескольких работах [172].

Некоторые из выявленных нами белков могут быть вовлечены в регуляцию кислородного статуса и метаболизма клубеньков. Для растений вигны *Vigna unguiculata*, инокулированных штаммом ризобий с делетированным геном *nifQ* (кодирует фрагмент нитрогеназы) было показано накопление уропорфирина III в пурпурно-красных клубеньках, что может коррелировать с усиленной функцией уропорфириногена III-синтазы (гомолог Psat5g044440) [173]. Фосфоенолпируват карбоксилаза (ФЕП-карбоксилаза (гомолог Psat5g238360) играет важную роль в регуляции углеводного метаболизма в фиксирующих азот клубеньках. В клубеньках происходит

накопление С4-органических кислот, которые синтезируются у растений и необходимы для поддержания метаболизма ризобий. ФЕП-карбоксилаза катализирует превращение фосфоенолпирувата (ФЕП) в С4-кислоту – оксалацетат. Металлотионеин-подобный белок 1 (гомолог Psat7g239160) синтезируется на высоком уровне в корнях и азотфиксирующих клубеньках актиноризных растений [174]. Функция этого белка тесно связана с регуляцией содержания активных форм кислорода. Подавление экспрессии гена, кодирующего металлотионеин 1А у растений фасоли (PvMT1A), приводило к достоверному снижению количества клубеньков [175]. В частности, Р0-подобный рибосомальный белок (Psat2g033920) участвует в контроле синтеза белка.

Индукция белков прямого антипатогенного действия (PR-белков, от англ. pathgenesis-related) класса 10, может быть связана с регуляцией защитных реакций у растений в процессе клубенькообразования [176,177]. Кроме того, известно, что белок прямого антипатогенного действия PR10 (гомолог Psat1g157000) может накапливаться в клетках корня в ответ на инокуляцию ризобиями [178]. Пероксидаза Е5 (гомолог Psat1g168680) может быть также вовлечена в регуляцию защитных реакций у растений в ответ на инокуляцию [179]. Следовательно, транскрипционный фактор NIN может взаимодействовать с рядом белков, способных регулировать метаболические процессы у растений и ответ на стресс. Механизмы этого остаются малоизученными, но возможно, посттрансляционная модификация NIN приводит к появлению фрагментов белка NIN, которые имеют каталитическую активность.

Таким образом, на основании проведенного анализа нами было впервые выявлено наличие уникального 5 мотива на N-конце транскрипционного фактора NIN у гороха и других бобовых с недетерминированным типом клубеньков, а также определен круг белков, с которыми может непосредственно взаимодействовать NIN с помощью дрожжевой

двугибридной системы. Подобные белки могут регулировать активность NIN и влиять на метаболизм клеток клубенька, а некоторые могут выступать и в качестве ко-регуляторов самого транскрипционного фактора NIN. Это указывает на новые регуляторные механизмы, определившие уникальную роль NIN в контроле развития симбиоза у бобовых растений.

### 3.2. Изучение регуляции транскрипции гена *PsNIN* у гороха *P. sativum*

Помимо участия в регуляции симбиоза с помощью белок-белковых взаимодействий, ключевую роль может играть и регуляция экспрессии гена транскрипционного фактора NIN. Следует отметить, что ранее проведенные эксперименты по комплементации Nod$^-$- мутантов *nin* модельных растений люцерны усеченной и лядвенца японского с помощью конструкции, содержащей кодирующую последовательность гена *NIN* под конститутивным промотором гена 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S, p35S), не приводили к восстановлению формирования азотфиксирующих клубеньков [180]. Сходным образом наши эксперименты по комплементации мутанта гороха SGENod$^-$-3 (*nin-1*) конструкцией p35S::*NIN* с помощью агробактериальной трансформации не привели к восстановлению его функции. Это указывало на наличие «специфичных» регуляторных последовательностей в промоторе гена *NIN*. В связи с этим, нам необходимо было определить присутствие таких регуляторных элементов в промоторе гена *NIN*, необходимых для контроля клубенькообразования.

Как уже было отмечено в обзоре литературных данных, на начальных этапах развития симбиоза, связанных в первую очередь с развитием инфекции, экспрессия гена *NIN* у модельных растений *M. truncatula* и *L. japonicus*, регулируется транскрипционным фактором IPD3/CYCLOPS и комплексом транскрипционных регуляторов NSP1/NSP2, которые связываются с

регуляторными CYC- и NSP1-элементами в промоторе гена *NIN* (сайтом узнавания и посадки этого транскрипционного фактора) у бобовых.

Однако оказалось, что активации гена *NIN* через CYC-бокс недостаточно для контроля дальнейших процессов клубенькообразования. Комплементация мутанта люцерны по гену *nin* с помощью конструкции, содержащей промотор с регуляторным CYC-элементом (около 4 т.п.о.) и кодирующей последовательностью гена *NIN* (pNIN-CYC::*NIN*), приводила только к восстановлению развития инфекционных нитей, но не клубенькообразования [79]. Ранее предполагалось, что после активации транскрипционного фактора NIN в эпидермисе, этот белок расщепляется и его укороченная форма перемещается в кору корня, где активирует органогенез. Однако в настоящее время стало известно, что после активации экспрессии гена *NIN* в эпидермисе под влиянием IPD3/CYCLOPS, может происходить выработка некоего дополнительного сигнала X (возможно нового транскрипционного регулятора или микроРНК), который перемещается из эпидермиса в кору и там активирует морфогенез клубенька. В коре этот неизвестный фактор влияет на накопление цитокининов, которые дополнительно специфично стимулируют экспрессию гена *NIN* через другую регуляторную область – CE-элемент в промоторе этого гена. Это приводит к активации транскрипционных факторов, таких как NF-YA1, B1 и C1, стимулирующих пролиферацию клеток коры и образование примордия клубенька [53]. Установлено, что CE-элемент у модельных бобовых растений находится на большом удалении от стартового кодона (от -15 до 20 т.п.о.) гена *NIN*. С этим боксом предположительно связываются регуляторы цитокининового ответа RR Б-типа, что необходимо для контроля органогенеза клубенька. Однако как регулируется экспрессия гена *NIN* у гороха, и какие регуляторные элементы в этом участвуют, оставалось неизвестным и было изучено в нашей работе.

### 3.2.1. Поиск регуляторных мотивов в промоторной области гена *PsNIN* у гороха

На первом этапе работы нами была взята для анализа последовательность размером около 50 т.п.о. до стартового кодона для гена *NIN* у гороха. Нам удалось показать, что сайт посадки транскрипционного фактора NSP1 находится на расстоянии 800 п.о. от старт-кодона гена *PsNIN*, последовательность CYC-регуляторного элемента расположена на расстоянии 4 т.п.о. от стартового кодона, позже в своих конструкциях мы использовали последовательность промоторной области размером 4 т.п.о от старт-кодона гена *PsNIN* до CYC-регуляторного элемента, таким образом включив в последовательность промотора CYC- и NSP-регуляторные элементы. Однако попытки найти CE-элемент в пределах 50 т.п.о. не позволили его обнаружить. Мы предположили, что возможный регуляторный элемент находится на большем удалении от стартового кодона. В связи с этим для анализа был взята последовательность от старт-кодона гена *PsNIN* до следующей открытой рамки считывания, длиной более 220 т.п.о. и, действительно, в пределах этой последовательности нам удалось найти CE-регуляторный элемент на расстоянии около – 218 т.п.о. от стартового кодона (рис. 5). Для проверки функциональной роли этих регуляторных участков было решено создать генетическую конструкцию, в которой CE- и CYC-элементы находятся в цис-положении в пределах промотора размером около 5 т.п.о., слитый с геном *NIN* или репортерным геном бактериальной β-глюкуронидазы (*GUS*). Ранее для растений люцерны усеченной была показана функциональная активность промотора, содержащего CE- и CYC-регуляторные элементы в цис-положении [79].

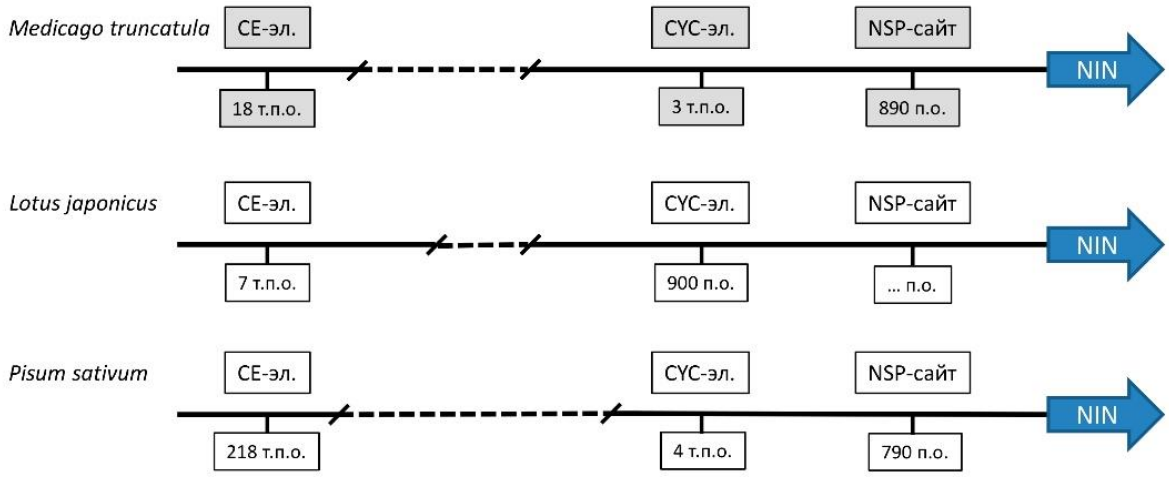


**Рисунок 5**. – Расположение известных промоторных элементов генов *MtNIN*, *LjNIN* и *PsNIN*. Серым цветом отмечены сайты, известные по литературным источникам. Белым цветом отмечены последовательности регуляторных элементов, обнаруженные в результате биоинформатического анализа в данном исследовании.

Нам удалось создать такие генетические конструкции (pPsNIN-CE-CYC::*GUS* и pPsNIN-CE-CYC::*NIN*) и использовать их для оценки локализации активности промотора и для комплементации мутантов гороха по гену *nin-1*. Мы также использовали генетические конструкции, которые содержали отдельно CE- (pPsNIN-CE::*GUS*) и CYC-регуляторные элементы (pPsNIN-CYC::*GUS*) для проверки их избирательной активности.

### 3.2.2. Анализ активности различных промоторных областей гена *PsNIN* в корнях и клубеньках гороха при симбиозе

Для локализации активности промоторов гена *NIN* нами были получены композитные растения гороха посевного, трансформированные полученными генетическими конструкциями. Анализ композитных растений гороха проводили через 3 недели после инокуляции штаммом *R. johnstonii* RCAM 3841. По свечению репортерного белка DsRED были отобраны трансгенные корни с клубеньками и инкубированы с субстратом для β-глюкуронидазы (GUS) - X-gluc для окрашивания (рис. 6)

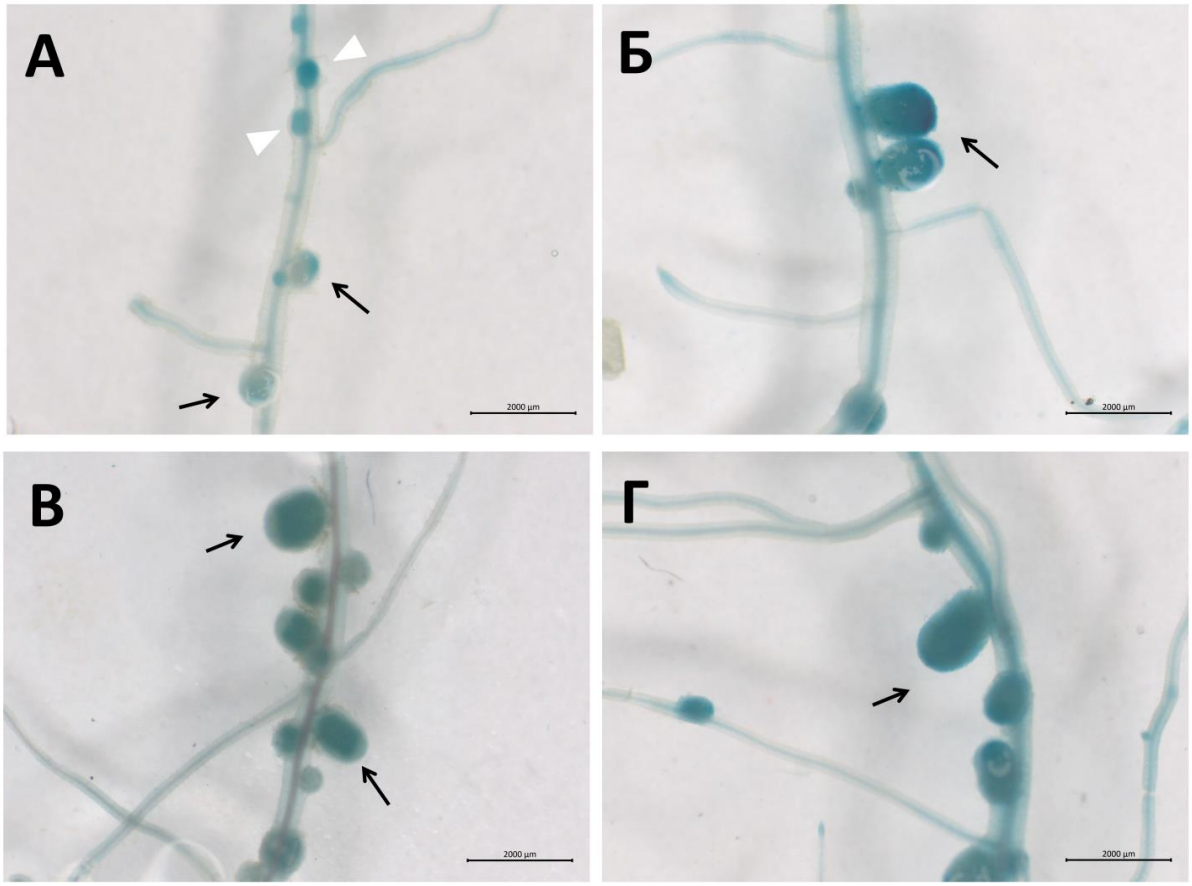


**Рисунок 6**. – Локализация активности промоторов pPsNIN-CE*::GUS* (А), pPsNIN-CYC*::GUS* (Б) и pPsNIN-CE-CYC*::GUS* (В, Г). Черными стрелками показаны клубеньки, белыми треугольниками отмечены примордии клубеньков. Для каждой конструкции было получено 9-12 композитных растений, на фотографиях представлены типичные для каждой конструкции окрашивания. Шкала 2000 мкм.

Окрашивание выявило активность промотора pPsNIN-CE*::GUS* (содержащего только CE-элемент, размер 0,5 т.п.о.) преимущественно в примордиях клубеньков и в зоне апикальной меристемы клубенька. Это свидетельствовало о том, что активация экспрессии гена *PsNIN* через CE-регуляторный элемент происходит в цис-положении. Анализ трансгенных корней гороха, трансформированных конструкциями pPsNIN-CYC::*GUS* (4 т.п.о.) и pPsNIN-CE-CYC*::GUS* (около 5 т.п.о.), показал четкую локализацию GUS-окрашивания по всему клубеньку, однако в случае использования конструкции pPsNIN-CE-CYC*::GUS* интенсивность окрашивания была выше и наблюдалась, в том числе и в корнях.

### 3.2.3. Активация промоторных областей гена *PsNIN* в корнях небобовых растений

Помимо локализации активности промотора гена *NIN* у бобовых растений, мы проверили работу полученных конструкций pPsNIN-CE::*GUS*, pPsNIN-CYC::*GUS* и pPsNIN-CE-CYC::*GUS* и на небобовых растениях (рис. 7). Несмотря на то, что как таковой транскрипционный фактор NIN у томатов отсутствует, у этих растений транскрипционный фактор SlNLP1 имеет достаточно близкое сходство последовательности с NIN бобовых растений. Кроме того, в геноме растений томата имеется транскрипционный фактор IPD3/CYCLOPS, который участвует в развитии симбиоза с грибами арбускулярной микоризы [181]. Этот анализ мог позволить определить специфическую роль этих регуляторных элементов для бобовых растений.

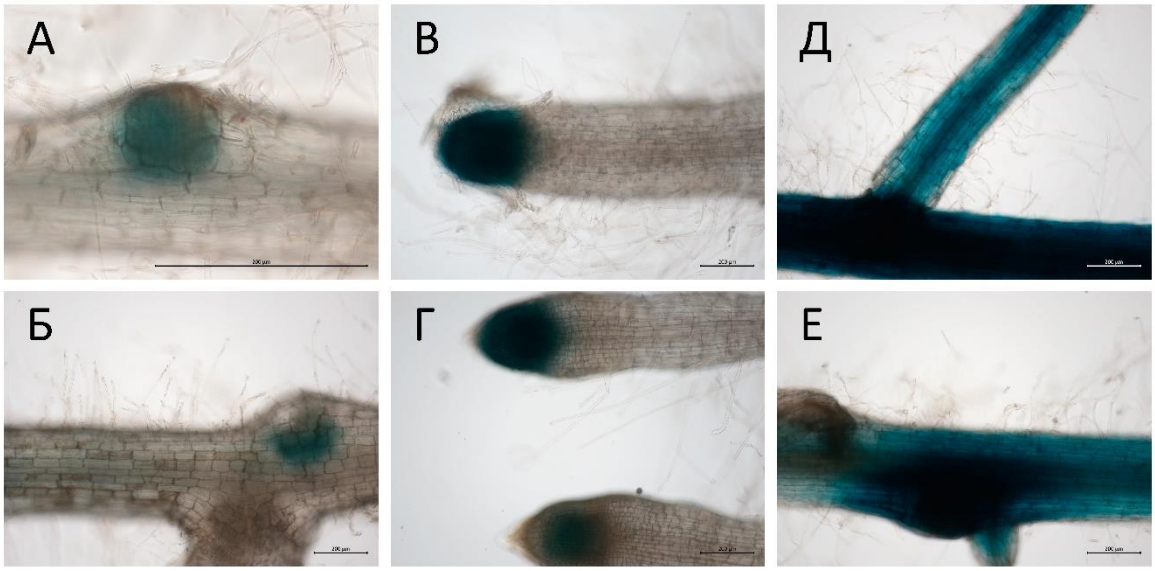


**Рисунок 7.** – Локализация активности промоторов pPsNIN-CE::*GUS* (А, Б), pPsNIN-CYC::*GUS* (В, Г) и pPsNIN-CE-CYC::*GUS* (Д, Е) в трансгенных корнях композитных растений томата. Шкала 200 мкм.

Нам удалось показать, что локализация активности pPsNIN-CE::*GUS* была связана с примордиями боковых корней, что согласуется с активностью этого цис-регуляторного элемента в корнях гороха. Такая локализация может быть связана с несимбиотическими регуляторными путями, влияющими на

распределение цитокининов во время формирования новых органов. Для pPsNIN-CYC*::GUS* была выявлена активация только в кончиках корней. Однако при использовании конструкции pPsNIN-CE-CYC*::GUS* наблюдали сильную активацию этого сложного промотора по всей длине корней даже у небобовых растений. Это позволяет сделать вывод о том, что появление регуляторных CE- и CYC-элементов в промоторе гена *NIN* у бобовых могло быть заимствовано у небобовых растений, которые использовали эти элементы для регуляции белков семейства NLP.

### 3.2.4. Комплементация мутанта гороха *nin-1*

С помощью конструкций, содержащих промоторы гена *PsNIN* с разными регуляторными элементами и саму кодирующую последовательность гена *PsNIN,* нами была также проведена комплементация мутанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*) (рис. 8). У мутанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*) наблюдается нарушение развития симбиоза на самых ранних стадиях – происходят только скручивания корневых волосков, но ни инфекционные нити, ни клубеньки не образуются. В качестве контроля мы использовали конструкцию p35S::*GUS*, содержащую ген β-глюкуронидазы (GUS) под конститутивным промотором. Трансгенные корни полученных композитных растений собирали через 4 недели после инокуляции штаммом *R. johnstonii* RCAM 3841.

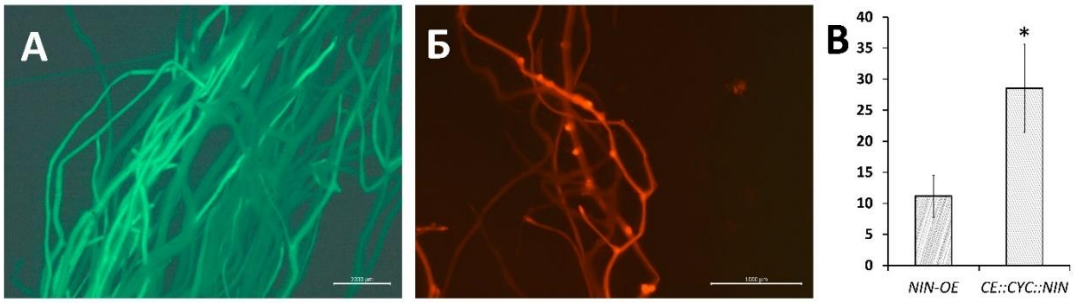


**Рисунок 8**. – Трансгенные корни мутанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*), трансформированные конструкциями, содержащими p35S::*NIN* (А) и pPsNIN-CE-CYC*::NIN* (Б). Шкала 200 мкм. На рисунке В изображена гистограмма, демонстрирующая количество примордиев в контрольных и опытных корнях. Планки погрешности показывают ошибку среднего для 4-8 растений в двух биологических повторностях. P-value < 0,05.

Оказалось, что при трансформации растений мутанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*) генетической конструкцией, в которой последовательность гена *PsNIN* находилась под конститутивным промотором гена 35S, нам не удалось выявить каких-либо отличий от нетрансформированных растений мутанта. Однако при трансформации растений мутанта гороха *nin-1* конструкцией, в которой ген *PsNIN* находился под нативным промотором, содержащим оба регуляторных CE- и CYC-элемента (5 т.п.о.) в цис-положении мы наблюдали значительное увеличение количества закладываемых на корнях растений мутанта примордиев, однако они останавливались в своем развитии на ранних стадиях и формирования функциональных клубеньков не наблюдалось. Мы предположили, что для развития полноценных эффективных клубеньков у растений гороха требуется наличие еще каких-либо регуляторных элементов в составе промотора гена *NIN,* поскольку проведенные эксперименты с более протяженным промотором на люцерне усеченной приводили к комплементации мутанта по гену *nin* [79].

Более детальный анализ промоторной области гена *PsNIN* гороха позволил нам выявить еще один регуляторный элемент, который находится между CE- и CYC-регуляторными элементами. Это регуляторный элемент может активироваться гиббереллинами (GA-элемент) (рис. 3 Приложения) [182]. Сравнительный анализ показал, что в полученных нами конструкциях, где в цис-положении в промоторе находились CE- и CYC-элементы, не содержалось этого мотива, в отличие от конструкций для комплементации мутанта *nin-1* растений люцерны усеченной. Таким образом, нам удалось показать, что регуляция экспрессии гена *NIN* у гороха может быть еще более сложной и находится также под влиянием гиббереллинов.

Мы использовали более протяженный промотор гена *PsNIN*, содержащий гиббереллин-зависимый GA-элемент (5.5 т.п.о.), который входил в состав конструкции с CE- и CYC-элементами в цис-положении и провели повторную комплементацию мунтанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*) (рис. 9).

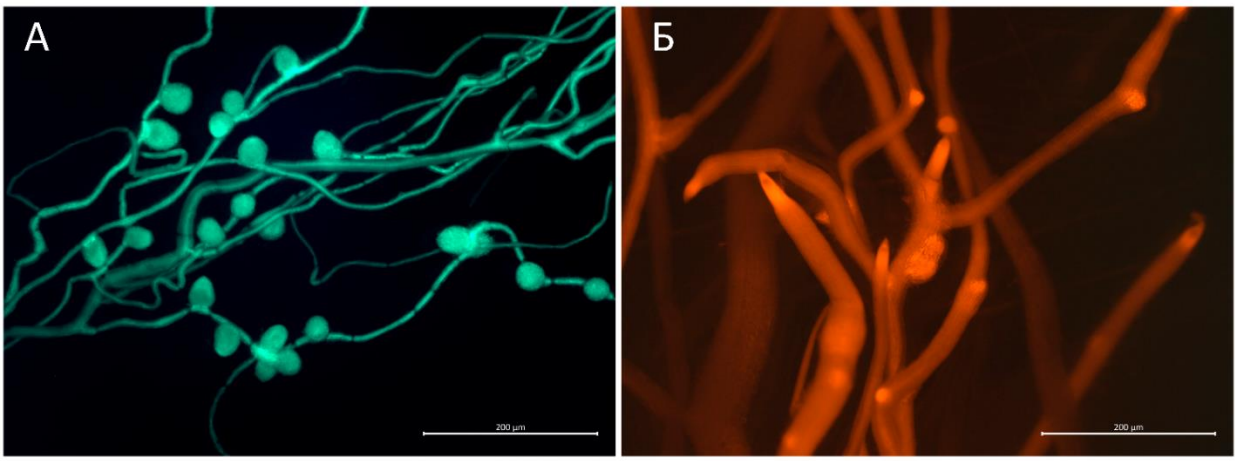


**Рисунок 9**. – Трансгенные корни гороха линии SGE дикого типа (А) и мутанта этой линии SGENod$^-$-3 (Б), трансформированные конструкциями, которые содержали p35S::*GUS* (А) и pPsNIN-CE-GA-CYC*::NIN* (Б). Шкала 200 мкм

Результатом проведенных исследований стало появление клубеньков (рис. 9Б), что не наблюдалось при интродукции гена *PsNIN* под регуляцией промотора, содержащего только CE- и CYC-элементы. Это указывает на то, что дополнительная регуляция гиббереллинами экспрессии гена транскрипционного фактора NIN, может быть важной для дальнейшей стимуляции формирования клубенька из его примордия. Исследования показывают, что регуляция гиббереллинами важна для образования клубеньков [182]. Ранние эксперименты по комплементации мутантов *nin* растений люцерны усеченной [79] содержали этот регуляторный мотив в составе изучаемых промоторных областей, что не позволяло оценить его значимость в органогенезе клубеньков. Это дало нам уникальную возможность изучить влияние каждого из регуляторных элементов на экспрессию гена и функционирование транскрипционного фактора NIN.

По-видимому, регуляция экспрессии гена *NIN* посредством гиббереллинового мотива важна для преодоления «контрольной точки» при развитии клубенька из примордия. Как мы отмечали ранее, гиббереллины важны для развития клубеньков [183]. По всей видимости, транскрипционный фактор NIN может принимать непосредственное участие в этой регуляции. Это объясняет наличие остановившихся в развитии примордиев на корнях

мутанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*), когда для комплементации использовали конструкцию с последовательностью гена *PsNIN* под регуляцией промотора, только с CE- и CYC-элементами. Увеличение количества примордиев в этом случае может быть связано с тем, что, вероятно, отсутствие GA-элемента в промоторе гена *NIN* может влиять и на системную регуляцию. Ранее участие гиббереллинов и транскрипционного фактора LjNIN в системной регуляции клубенькообразования было показано для лядвенца японского (*Lotus japonicus*) [182].

### 3.2.5. Анализ влияния удаленного CE-регуляторного элемента в промоторе гена *NIN* на его регуляцию при обработке растений гороха экзогенным цитокинином

Известно, что транскрипционный фактор IPD3/CYCLOPS связывается с CYC-элементом в промоторе гена *PsNIN*, что обеспечивает активацию его экспрессии и регуляцию инфекционного процесса при симбиозе [67,68,105]. Мутанты гороха *ipd3*/*cyclops* формируют редкие неэффективные клубеньки (Fix$^-$- фенотип) по сравнению с растениями дикого типа [184–186]. Эти клубеньки остаются незараженными вследствие блокирования выхода бактерий из инфекционных нитей.

Напротив, у мутанта по гену *nin* полностью блокируется и развитие инфекционных нитей, и органогенез клубенька (Nod$^-$-фенотип), хотя NIN вовлекается в передачу сигнала после IPD3/CYCLOPS. Эти различия в фенотипе мутантов *ipd3*/*cyclops* и *nin*, указывают на наличие дополнительных путей активации гена *NIN* (не только посредством IPD3/CYCLOPS), но и другие, которые сохраняются у мутанта по гену *ipd3/cyclops*. Это может быть связано с активацией промотора гена *NIN* через CE-регуляторный элемент цитокининами и регуляторами цитокининового ответа RR Б-типа [70]. Такая активация происходит у бобовых с недетерминированным типом клубеньков в удаленных от поверхности клетках перицикла и эндодермы, а затем и

клетках внутренней коры. Следовательно, использование мутантов *ipd3*/*cyclops* дает уникальную возможность изучить, как происходит регуляция гена *NIN* посредством цитокинина через CE-элемент при органогенезе клубеньков.

Ранее было показано, что содержание цитокинина и экспрессия гена *NIN* значительно снижены в клубеньках мутанта SGEFix$^-$-2 по гену *ipd3/cyclops* [187]. На основании этого мы предположили, что в активации гена *NIN* важную роль могут играть цитокинины. В связи с этим нами были проведены эксперименты по обработке экзогенным цитокинином (6-бензиламинопурином, 6-БАП) мутанта SGEFix$^-$-2 по гену *ipd3/cyclops* для изучения особенностей регуляции гена *NIN* при развитии симбиоза через CE-бокс.

Известно, что концентрации цитокинина 6-БАП в диапазоне 1-10 мкМ могут стимулировать образование клубеньков у *M. sativa* и растений гороха, в то время как в диапазоне 20-25 мкМ из-за индукции выработки этилена в ответ на обработку происходило ингибирование образования клубеньков [188,189]. В нашем исследовании был проведен морфологический и ультраструктурный анализ клубеньков мутантов гороха SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), обработанных повышающимися концентрациями экзогенного 6-БАП в диапазоне от 1 до 15 мкМ [190]. Экзогенный цитокинин стимулировал общее увеличение количества клубеньков у мутанта (рис. 10). Это соответствовало представлению о том, что увеличение концентрации цитокинина стимулирует индукцию NIN в перицикле, эндодерме и внутренней коры, что способствует закладке новых клубеньков у мутанта.

Несмотря на то, что цитокинин в повышенных концентрациях может ингибировать развитие корней, в наших экспериментах у дикого типа и мутанта не было обнаружено существенного негативного влияния на длину первичных и боковых корней после добавления в среду 10 мкМ БАП (рис. 4

Приложения). Это указывало на то, что использованные концентрации цитокинина были близки к физиологическим.

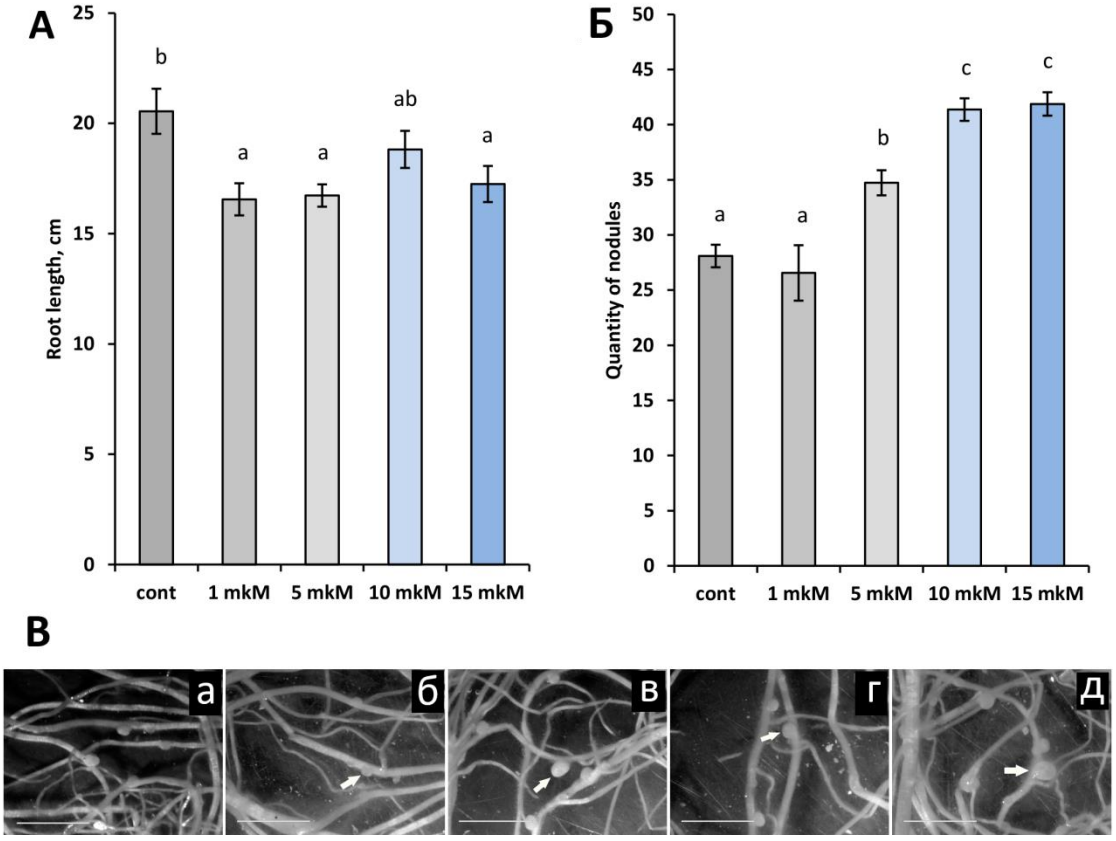


**Рисунок 10.** – Длина корней (А) и количество клубеньков (Б) у мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), не обработанных (контроль, а) и обработанных повышающимися концентрациями цитокинина 6-БАП: 1 мкМ (б), 5 мкМ (в), 10 мкМ (г) и 15 мкМ (д). На графиках показаны средние значения трех независимых экспериментов. Планки погрешности представляют стандартные ошибки среднего значения (SEM) для трех повторностей. Буквы указывают на статистически значимые различия, основанные на одностороннем дисперсионном анализе (one-way ANOVA), за которым следует post-hoc тест Тьюки. Клубеньки обозначены белыми стрелками. Было отмечено визуальное увеличение размера клубеньков. Масштабная шкала - 50 мм [190].

Вместе с тем, мы также показали, что под влиянием обработки цитокинином клубеньки у мутанта SGEFix$^-$-2 по гену *ipd3/cyclops* увеличивались в размерах, начиная с концентрации от 5 до 15 мкМ (рис. 10С и рис. 11). Для анализа развития инфекционных нитей и распространения ризобий в тканях клубенька использовали серийные срезы серединной части

клубеньков SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) растений, обработанных повышающимися концентрациями цитокинина, и сравнивали с контрольными образцами без обработки (рис. 11).

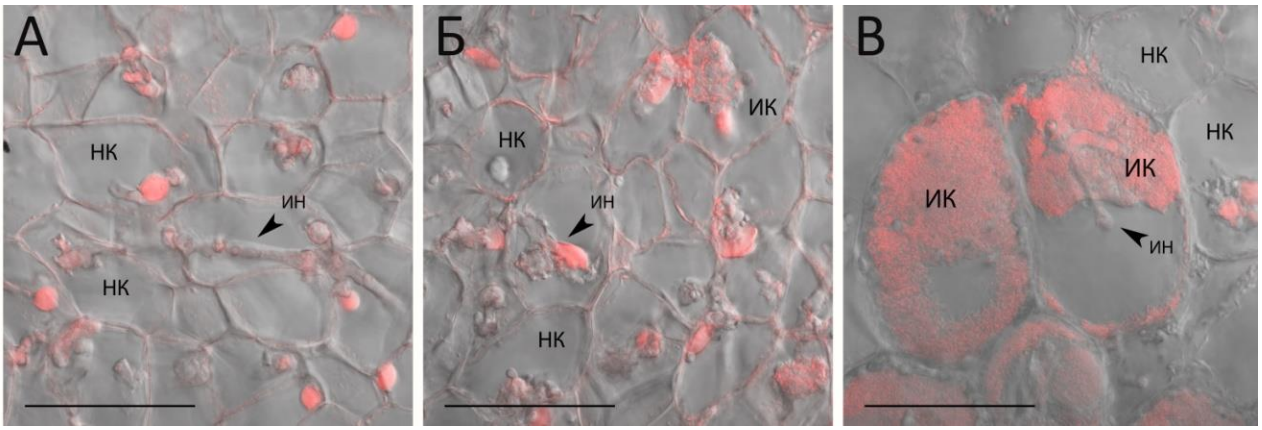


**Рисунок 11**. – Анализ срезов клубеньков мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/*cyclops), не обработанных (А) или обработанных повышающимися концентрациями цитокинина 6-БАП 5 мкМ (Б) и 10 мкМ (В) с помощью конфокальной микроскопии. Бактерии и ядра растительных клеток окрашивали с использованием пропидия йодида. Инфицированные (ИК) и неинфицированные клетки (НК), инфекционные нити (ИН) отмечены на рисунке. Изображения увеличены в 63 раза и имеют масштаб 50 мкм.[190]

Общее количество инфицированных клеток, обусловленное выходом бактерий в ткани клубенька, а также морфологию растущих нитей оценивали в центральной зоне клубеньков, которая может соответствовать зоне “инфекции” в клубеньках дикого типа (рис. 11, рис. 5 Приложения).

Морфология инфекционных нитей в клубеньках мутантных растений на фоне обработки цитокинином была изменена, что часто приводило к появлению инфекционных нитей с измененной структурой (sac-подобной) при обработке 5, 10 и 15 мкМ 6-БАП по сравнению с контрольными клубеньками растений мутанта без обработки цитокинином (рис. 11А). Вместе с тем, увеличенное количество клеток, в которых происходил выход бактерий, наблюдалось в клубеньках мутантных растений, обработанных 6-БАП, начиная с 5 мкМ и достигая максимума при 10 мкм по сравнению с другими концентрациями в наших экспериментальных условиях (рис. 11Б). Это

подтвердило, что обработка 10 мкМ 6-БАП может оказывать наиболее выраженный стимулирующий эффект на инфекционный процесс – развитие инфекционных нитей и выход ризобий из них у мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) (рис. 12).

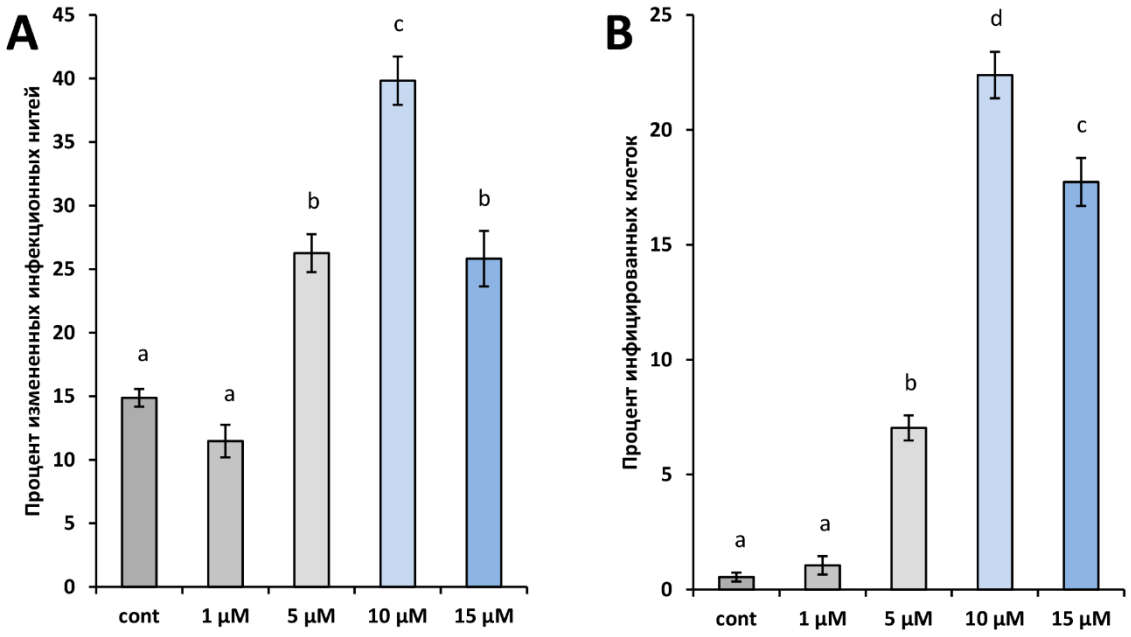


**Рисунок 12**. – Количество инфекционных нитей с измененной морфологией (sac-подобных)(А) и процент инфицированных клеток (Б) в клубеньках растений мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), не обработанных (контроль) или обработанных повышенными концентрациями цитокинина 6-БАП: 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ и 15 мкМ. Графики представляют средние значения для 15 срезов, полученных из 5 клубеньков в каждом варианте. Планки погрешностей представляют стандартные ошибки среднего значения (SEM) для всех повторов. Разные буквы указывают на статистически значимые различия на основе ANOVA, за которыми следует post-hoc тест Тьюки.[190]

Этот фенотип был подтвержден с помощью ультраструктурного анализа с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (рис. 13). В клубеньках мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), не обработанных цитокинином, бактерии в основном остаются внутри «заблокированных» инфекционных нитей (рис. 12А), что соответствовало ранее описанному фенотипу для этого мутанта [184]. В клетках клубеньков с редкими случаями выхода ризобий, их развитие останавливалось на ранних стадиях и

дифференцировки бактерий в бактероиды не наблюдалось [191]. Таким образом, детальный гистологический анализ и анализ с помощью ПЭМ позволили нам выявить ультраструктурные изменения в клубеньках у мутанта SGEFix⁻-2 (*ipd3/cyclops*), обработанного цитокинином. Такая обработка стимулировала выход бактерий из инфекционных нитей, и после обработки цитокинином в клубеньках можно было обнаружить повышенный процент инфицированных клеток, главным образом в ответ на обработку 10 мкМ БАП (рис. 11В и рис. 13Б, 13В).

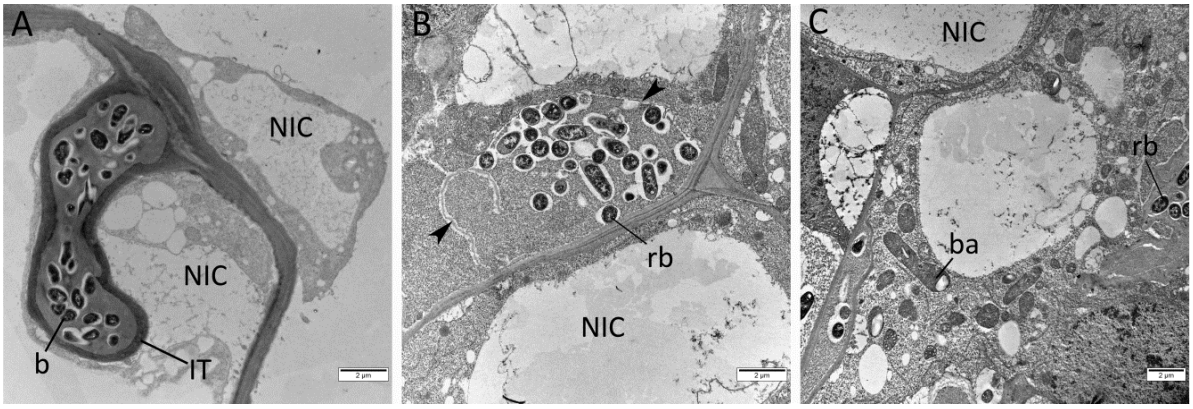


**Рисунок 13**. – Анализ клубеньков у растений мутанта SGEFix⁻-2 (*ipd3/cyclops*), не обработанных (А) или обработанных 10 мкМ цитокинина 6-БАП (В, С), с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Выявлены заметные различия между клетками клубеньков у обработанных и не обработанных растений мутантов, в которых увеличивался выход бактерий из инфекционных нитей (В, С). На изображении А показана инфекционная нить (IT) с бактериями (b) внутри нее, окруженная неинфицированными клетками (NIC). Стрелки указывают на фрагментированные стенки инфекционной нити. Изображения (В, С) показывают инфицированные клетки, высвобождающие бактерии (rb) и бактероиды (ba). На рисунке также показаны соседние неинфицированные клетки (NIC). Все рисунки приведены в масштабе 2 мкм.[190]

Ранее в клубеньках двух мутантов гороха по гену *ipd3/cyclops* - SGEFix⁻-2 и SGEFix⁻-5 было выявлено существенно сниженное содержание цитокининов по сравнению с клубеньками дикого типа [187]. Более того, у мутантов была значительно снижена и экспрессия гена *NIN*. Работы на *M. truncatula* показали, что транскрипционный фактор NIN может активировать

экспрессию гена *CRE1*, кодирующего рецептор к цитокинину, в формирующихся клубеньках [112]. В связи с этим мы предположили, что помимо активации гена *NIN* цитокининами при закладке примордиев клубеньков, транскрипционный фактор NIN, в свою очередь, сам может влиять на накопление цитокининов в клубеньках на более поздних этапах и, следовательно, может регулировать и более поздние этапы симбиоза. Однако роль транскрипционного фактора NIN в контроле более поздних этапов развития симбиоза через с участием цитокининов оставалась практически неизученной. Этому и была посвящена следующая часть нашей работы. Используя экзогенную обработку мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) цитокинином, мы попытались выяснить какие мишени может регулировать NIN на более поздних этапах морфогенеза клубенька под влиянием этого гормона.

## 3.3. Роль транскрипционного фактора NIN в регуляции более поздних этапов морфогенеза клубенька у растений гороха

### 3.3.1. Поиск генов-мишеней, которые могут активироваться транскрипционным фактором NIN, при регуляции морфогенеза клубенька

В связи с тем, что обработка экзогенным цитокинином мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) гороха показала видимые морфологические изменения в структуре клубеньков, нами были проанализированы изменения в экспрессии генов, связанные с этой обработкой. С использованием транскриптомного подхода нами был проведен сравнительный анализ дифференциальной экспрессии генов в клубеньках растений гороха дикого типа SGE и мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) (рис. 14), а также для клубеньков мутанта без обработки и после обработки цитокинином 6-БАП (рис. 15) [192].

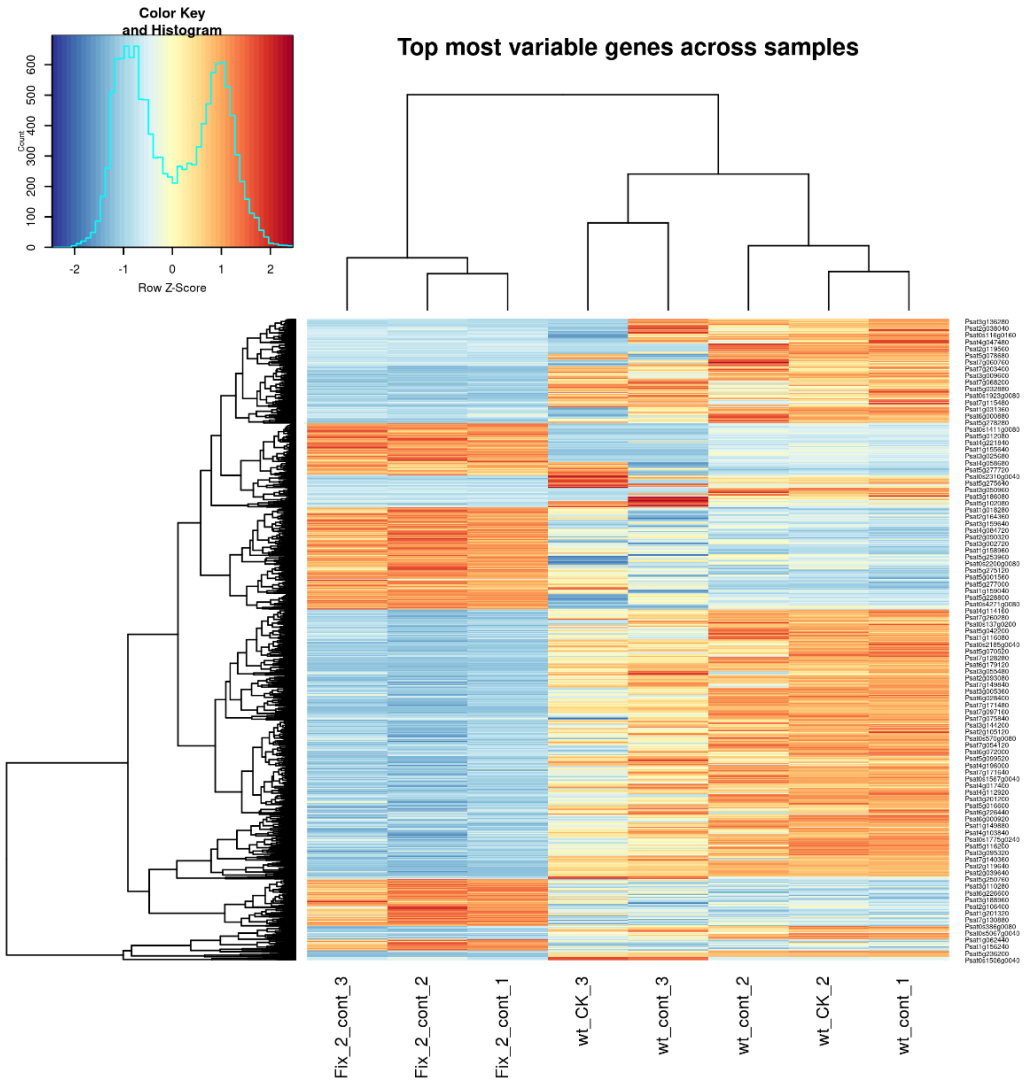


**Рисунок 14**. – Сравнительный анализ дифференциальной экспрессии генов в клубеньках гороха дикого типа SGE и мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*). Тепловая карта представляет дифференциально экспрессируемые гены в клубеньках растений дикого типа и мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) в виде нормализованных значений после стабилизации различий в количестве прочтений для каждого гена. Данные по трем независимым биологическим повторностям были объединены для каждого варианта – SGEFix$^-$-2 и клубеньков дикого типа (wt).[192]

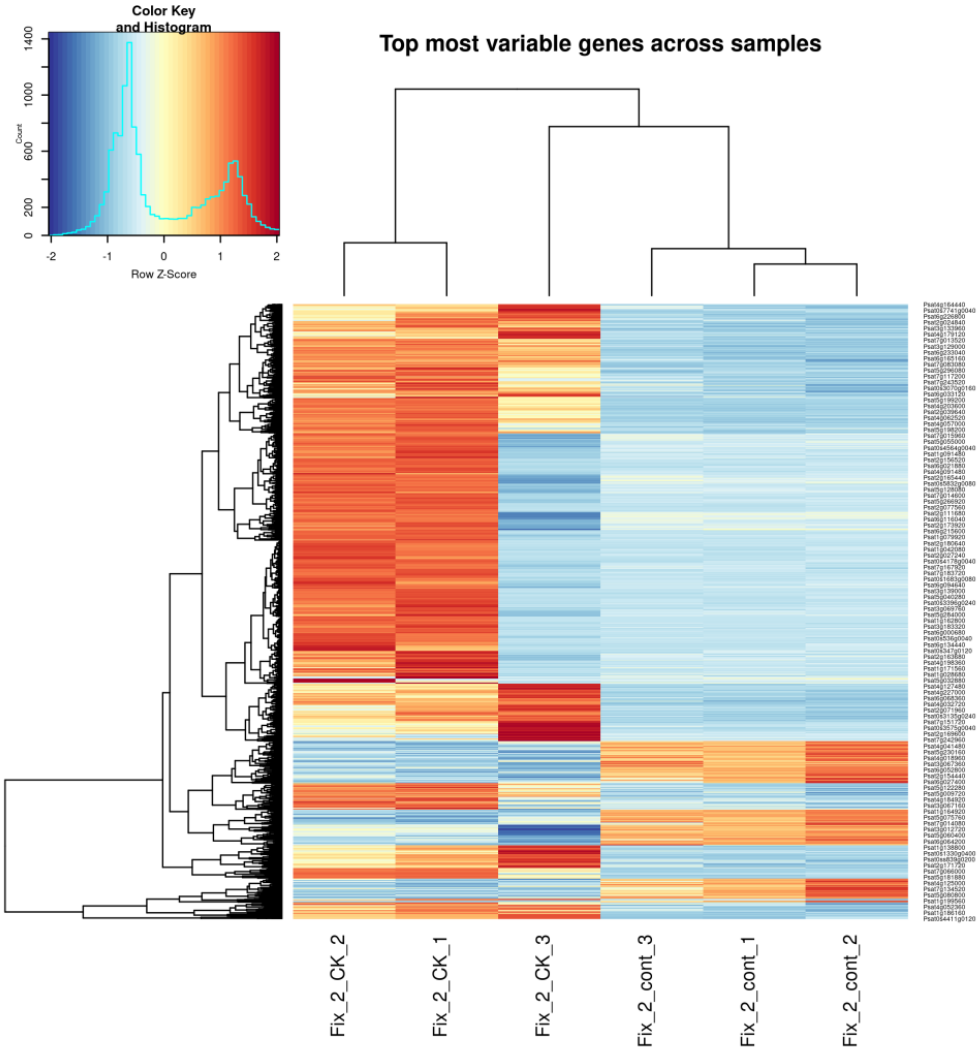


**Рисунок 15**. – Анализ дифференциальной экспрессии генов в клубеньках растений мутанта SGEFix⁻-2 (*ipd3/cyclops*), без обработки и при обработке 10 мкМ 6-БАП. Тепловая карта представляет набор дифференциально- экспрессируемых генов в клубеньках растений мутанта SGEFix⁻-2 (*ipd3/cyclops*), необработанных и обработанных цитокинином (CK), в виде нормализованных показателей прочтений отдельных генов к общему количеству прочтений. Данные трех независимых биологических повторностей были объединены для каждого варианта – клубеньки SGEFix⁻-2 (*ipd3/cyclops*) без обработки и после обработки цитокинином (CK).[192]

Анализ показал увеличение экспрессии 1391 генов в клубеньках гороха дикого типа SGE по сравнению с клубеньками мутанта SGEFix⁻-2 (*ipd3/cyclops*), в тоже время экспрессия 570 генов увеличивалась в ответ на обработку цитокинином у мутанта SGEFix⁻-2 (*ipd3/cyclops*) по сравнению с

клубеньками мутанта без обработки (рис. 6 Приложения). Более того, 303 гена сходным образом активировались в обоих наборах (рис. 6 Приложения). Так как 303 гена составляют около 22% от общего числа генов с повышенным уровнем экспрессии в клубеньках дикого типа по сравнению с мутантом (1391 с повышенным уровнем экспрессии), можно предположить, что цитокинин действительно играет важную роль в регуляции поздних стадий развития клубеньков у гороха. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о существенных различиях в содержании цитокинина между клубеньками дикого типа и мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) [187].

Нами был использован анализ обогащения дифференциально-экспрессирующихся генов в терминах генной онтологии (gene ontology (GO)), чтобы выяснить, какие биологические процессы могут изменяться в клубеньках мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) по сравнению с клубеньками дикого типа и на какие процессы в клубеньках этого мутанта влияла обработка цитокинином (рис. 16 и рис. 17 соответственно). Анализ дифференциально-экспрессирующихся генов, повышающих экспрессию в клубеньках дикого типа по сравнению с клубеньками мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), выявил гены ферментов, расщепляющих полисахариды, такие как крахмал, а также участвующих в биосинтезе белков, аминокислот и нуклеиновых кислот (рис. 16). Вместе с тем, была показана значительная активация генов, продукты которых регулируют транспортные процессы через плазматическую мембрану и мембраны органелл. Стимуляция процессов кальций-зависимого связывания фосфолипидов предполагает, что пути передачи сигнала, активируемые кальцием и вторичными метаболитами, могут быть вовлечены в регуляцию развития эффективных симбиотических клубеньков. Стимуляция активности путей, регулирующих окислительно-восстановительные процессы, также была показана преимущественно в эффективных клубеньках дикого типа.

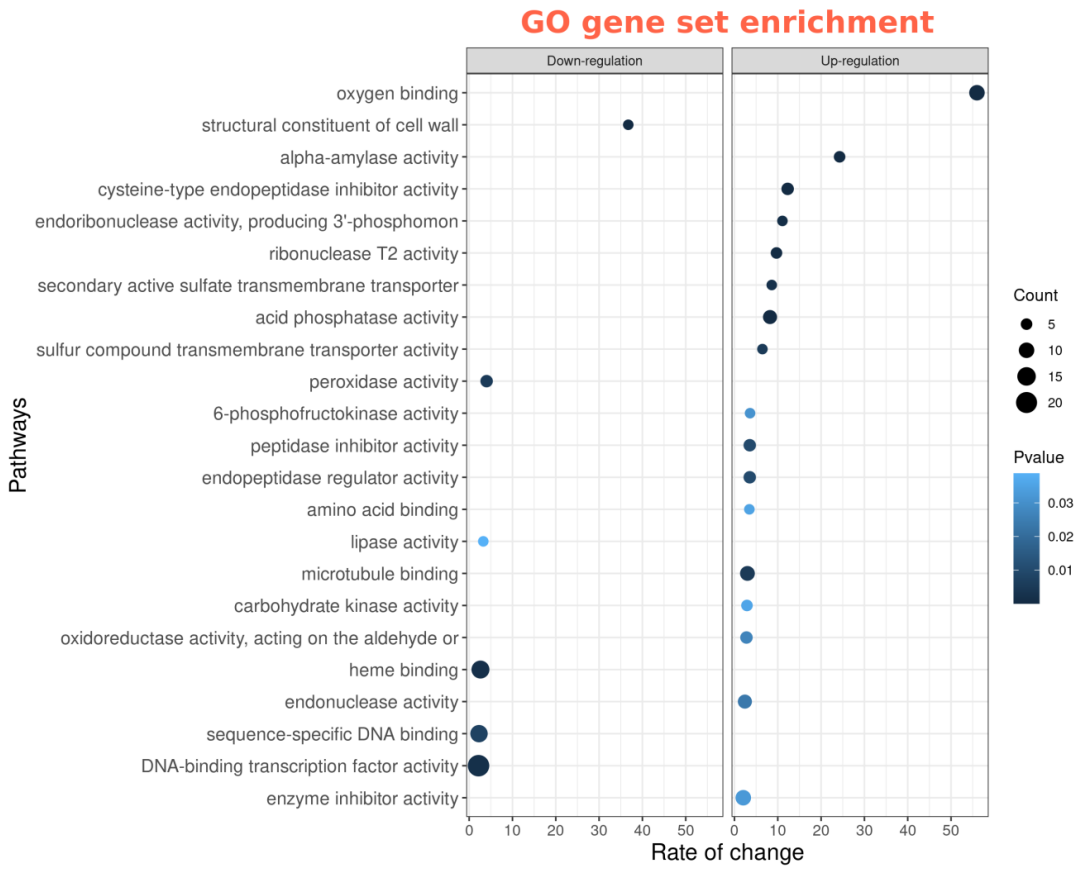


**Рисунок 16**. – Основные регулируемые процессы в клубеньках растений гороха дикого типа SGE по сравнению с клубеньками мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) (повышенная и пониженная экспрессии отдельно), выраженные в терминах генной онтологии.[192]

После обработки цитокининами в клубеньках мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) повышалась экспрессия генов, продукты которых участвуют в процессах, связанных с реакцией на стресс (рис. 17). Среди этих процессов наибольшие изменения были показаны для "активности рибонуклеазы Т2", которая связана с реакцией на патогены и абиотический стресс у растений [193,194], и регуляции образования активных форм кислорода, которые активируются у растений при стрессе [195]. Важно отметить, что среди генов, экспрессия которых увеличивается в клубеньках растений дикого типа по сравнению с клубеньками мутанта, также преобладают гены, регулирующие образование активных форм кислорода.

**Рисунок 17**. – Основные регулируемые процессы в клубеньках растений мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), обработанных цитокинином (повышенная и пониженная экспрессии отдельно) по сравнению с растениями без обработки, выраженные в терминах генной онтологии.[192]

Мы также обнаружили, что обработка цитокинином существенно влияла на процессы транспорта ионов калия, а экспрессия генов, регулирующих этот процесс, существенно снижалась в ответ на обработку цитокинином. Согласно недавно опубликованным данным [195], симбиосомы и вакуоли инфицированных клеток характеризуются дефектами $K^+$ баланса, что связано с «неправильным» расположением некоторых ионных каналов растений. Подробный поиск среди дифференциально экспрессируемых генов показал, что экспрессия нескольких генов, кодирующих переносчики калия и каналы (Psat4g076320, Psat0s3462g0080), была значительно снижена в клубеньках мутанта в ответ на обработку цитокинином. Аналогичным образом, экспрессия Psat4g076320 и нескольких других генов, связанных с процессами

"связывания ионов калия", также была снижена в клубеньках дикого типа по сравнению с мутантными клубеньками.

Около 40% от общего числа генов с увеличенным уровнем экспрессии в клубеньках дикого типа (по сравнению с клубеньками мутанта) соответствовали активируемым генам у мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) под влиянием обработки цитокинином (рис. 6 Приложения). Наряду с изменением общего количества клубеньков у мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) под влиянием обработки цитокинином, эти данные свидетельствуют о значительной роли цитокинина в регуляции более поздних стадий развития клубеньков. Среди дифференциально экспрессирующихся генов нами были выявлены гены, кодирующие транскрипционные факторы NSP1 (Psat0s741g0280), NIN (Psat2g001120), EFD (Psat7g259160) и RSD (Psat3g136520), уровень экспрессии которых существенно возрастал в клубеньках дикого типа по сравнению с клубеньками мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), а также в клубеньках мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) в ответ на обработку цитокинином. Это позволяет предположить, что эти факторы транскрипции могут быть вовлечены в регуляцию поздних стадий развития клубеньков и активируются цитокинином. Кроме того, дифференциально увеличивалась экспрессия известных маркеров релиза бактерий таких как SYMREM (Psat7g034920) [196,197], DNF2 (Psat7g125720) [198], ENOD5 (Psat0s2403g0080) [199].

Среди генов, увеличивающих свою экспрессию как при сравнении с диким типом, так и при обработке экзогенными цитокининами, был выделен целый ряд генов, кодирующих секретируемые пептиды и их переносчики, которые также играют важную роль в регуляции клубенькообразования [200]. Мы определили более тридцати различных пептидов и несколько переносчиков, в том числе гомолог NOD25 (Psat5g172760), который, по всей видимости, отвечает за доставку растительных белков в симбиасому [201]. Показано, что для некоторых генов секретируемых пептидов характерна

ранняя (для гомолога Psat1g012320 ENOD-GRP5) или совместная (для гомолога Psat7g232640 NOD-GRP4) экспрессия с генами леггемоглобинов [202], которые также были обнаружены в обоих наборах данных (8 генов).

Анализ транскриптома показал увеличение экспрессии 9 генов, регулирующих выход бактерий из инфекционных нитей, а также генов белков теплового шока, которые могут играть важную роль в адаптации бактерий к стрессовым условиям внутри организма-хозяина [203] и способствуют азотфиксации [204,205]. Мы также обнаружили дифференциальную экспрессию генов, кодирующих ферменты, участвующие в модификации и перестройке клеточных стенок (полигалактуроназа Psat1g095040 [206]; sieve Element Occlusion, SEO, Psat6g128360, [207], пектинэстераза Psat5g307240) и связанный с дифференцировкой бактероидов белок NPD1 (Psat5g300880) [208].

В обоих наборах данных повышалась экспрессия нескольких генов переносчиков ауксинов, которые могут принимать участие в формировании зональности клубенька посредством регуляции транспорта ауксинов. Среди них ABC-переносчик B-типа (Psat5g070480), участвующий в реакции на ризобиальную инфекцию [209]. В числе генов, которые участвуют в гормональной регуляции, мы наблюдали увеличение экспрессии генов, кодирующих регуляторы ответа на этилен (Psat6g119880, Psat1g200920, Psat7g259160), регулятор цитокининового ответа гомолог ARR11 (Psat4g192080) и гены, связанные с ответом на абсцизовую кислоту (Psat1g124320). Дифференциально увеличивалась экспрессия генов, продукты которых участвуют метаболизме растительных клеток. В их числе компоненты дыхательной цепи (цитохромы), ферменты цикла трикарбоновых кислот (Psat7g179960), а также большое количество генов, продукты которых участвуют в синтезе аминокислот и белков. Увеличивали свою экспрессию и гены, связанные с регуляцией клеточного цикла, модификацией хроматина

(Psat5g096280 [210]), репликацией ДНК (Psat3g073800) и биосинтезом нуклеотидов (Psat2g085400) [211])

Одним из заметных эффектов влияния экзогенно добавленного цитокинина на клубеньки мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) было увеличение размера этих симбиотических органов (рис. 10). Более того, увеличение количества инфицированных клеток в клубеньках, по-видимому, влияет на их размер (рис. 11). Рост и дифференцировка растительных клеток приводят к их увеличению, что опосредуется активацией эндоредупликации под влиянием регулятора CCS52 в клубеньках [212,213]. Однако особенности генетической и гормональной регуляции, которые определяют переход клубеньков к дифференцировке, остаются еще малоисследованными у бобовых растений.

На основании количественного ПЦР, совмещенного с обратной транскрипцией, были исследованы уровни экспрессии *CCS52* и известных регуляторов морфогенеза клубеньков в клубеньках SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) в ответ на обработку цитокинином (рис. 18). После обработки разными концентрациями экзогенным цитокинином (в диапазоне от 1 до 15 мкм) мы наблюдали увеличение экспрессии гена *PsCCS52A* (Psat0s3705g0040), а также гена *PsCRE1* (Psat7g004720), кодирующего рецептор к цитокинину. Экспрессия гена *PsKNOX3* (Psat6g028400), кодирующего транскрипционный фактор, который может быть вовлечен в регуляцию биосинтеза цитокинина, а также гены *IPT3*, *LOG1* и *LOG2*, необходимые для синтеза цитокинина, показали сходные паттерны активации [214,215]. Кроме того, гены *PsNIN* (Psat2g001120) и *PsBELL1-2* (Psat4g090560), кодирующие факторы транскрипции, показали активацию экспрессии, зависимую от концентрации добавляемого цитокинина, в соответствии с предыдущими данными о регуляции цитокинином экспрессии этих генов у других бобовых растений [69,216,217].

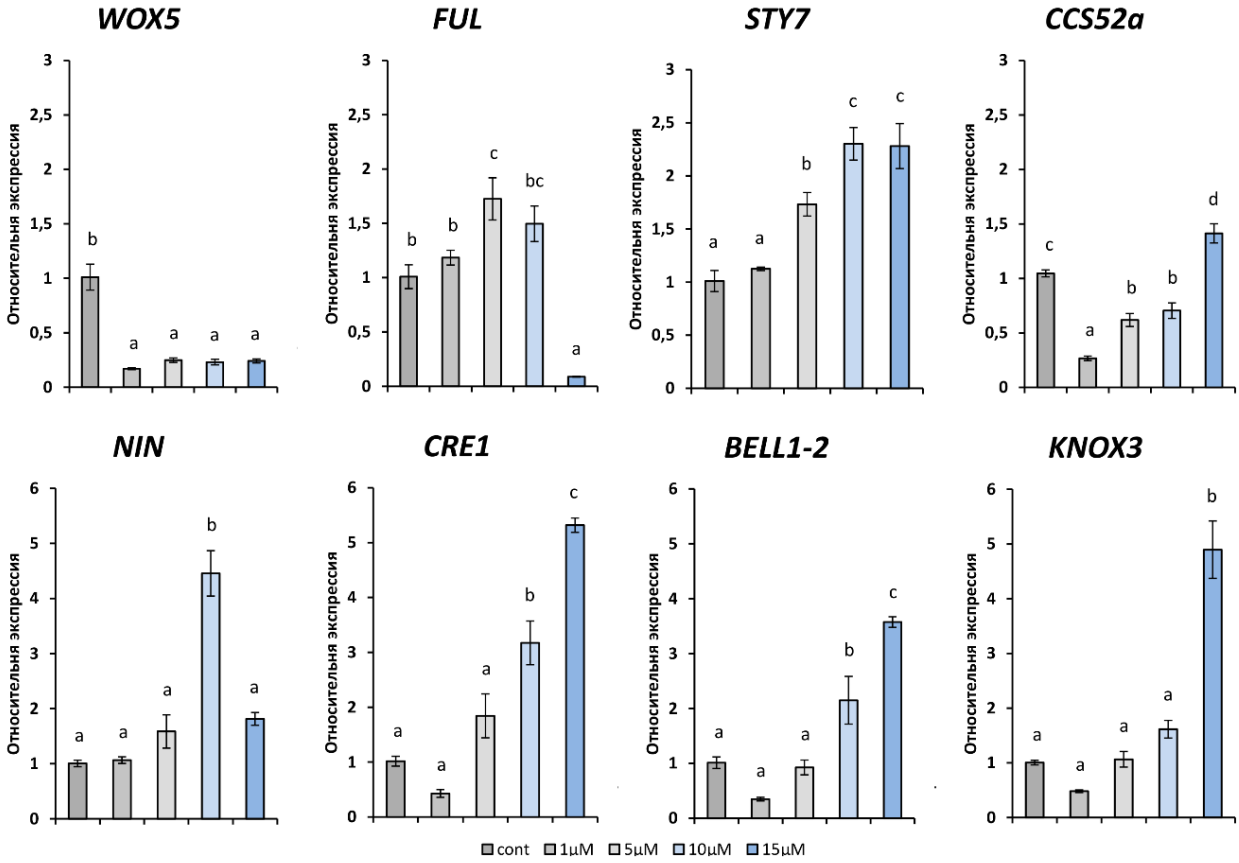


**Рисунок 18**. – Уровни экспрессии генов *WOX5*, *NIN*, *CCS52a*, *CRE1*, *BELL1-2*, и *KNOX3*, участвующих в регуляции развития клубеньков, а также новых идентифицированных генов, кодирующих регуляторы транскрипции STY7 и AGL (FUL), в клубеньках растений мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), не обработанных (контроль) или обработанных повышающимися концентрациями цитокинина 6-БАП: 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ и 15 мкМ (через 14 дней после инокуляции). В качестве контроля использовали клубеньки необработанных растений SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*). Экспрессия была нормализована по отношению к конститутивно экспрессируемому гену убиквитину. Для каждого гена уровень экспрессии в клубеньках необработанных растений мутанта был принят равным 1 (контроль), а уровень экспрессии в клубеньках растений мутанта при обработке цитокинином, был представлен как отношение к контролю. Анализ изменений в экспрессии генов был проведен на основе трех биологических повторностей. На рисунке представлены результаты одной биологической повторности из трех, а также стандартная ошибка среднего значения (SEM) для трех технических повторностей. Разные буквы указывают на статистически значимые различия, основанные на одностороннем дисперсионном анализе (one-way ANOVA), за которым следуют результаты post-hoc теста Тьюки.[190]

Стимуляция экспрессии *CCS52* под влиянием цитокинина соответствовала данным для растений *Arabidopsis,* у которых цитокинин посредством активации регулятора цитокининового ответа Б-типа - RR2 может непосредственно повышать экспрессию гена *CCS52A1*, кодирующего активатор комплекса убиквитин-лигазы (работающую в анафазе) и вызывающий деградацию регуляторов клеточного цикла [218,219]. У арабидопсиса этот регулятор координирует рост корней, способствуя переходу клеток корня к эндоредупликации и ограничивая пролиферацию клеток в меристеме корня. Нами было показано, что такая регуляция цитокинином регулятора CCS52 может быть связана с более поздними стадиями развития клубеньков.

### 3.3.2. Изучение роли регулятора SEUSS в развитии меристемы в клубеньках гороха

Одним из генов, дифференциально-экспрессирующихся в клубеньках растений дикого типа по сравнению с клубеньками мутанта, а также в клубеньках мутанта под влиянием обработки цитокинином стал SEUSS-подобный белок (Psat6g039480). Он является транскрипционным регулятором в растениях и обеспечивает сборку мультимерных регуляторных комплексов. Влияние SEUSS на развитие стебля, листьев и корней, а также на формирование репродуктивных тканей было впервые показано у арабидопсиса и некоторых других модельных растений [220]. Было высказано предположение, что этот регулятор может быть связан с определением тканеспецифичности у растений [221]. Например, в развивающемся цветке регулятор SEUSS физически взаимодействует с несколькими ДНК-связывающими белками с MADS-доменами (APETALA1, SHORT VEGETATIVE PHASE1 и AGAMOUS-LIKE24), которые регулируют последующее развитие органов [222,223]. Вместе с тем было показано, что гомологи SEUSS у арабидопсиса влияют на распределение ауксина в побеге зародыша [224].

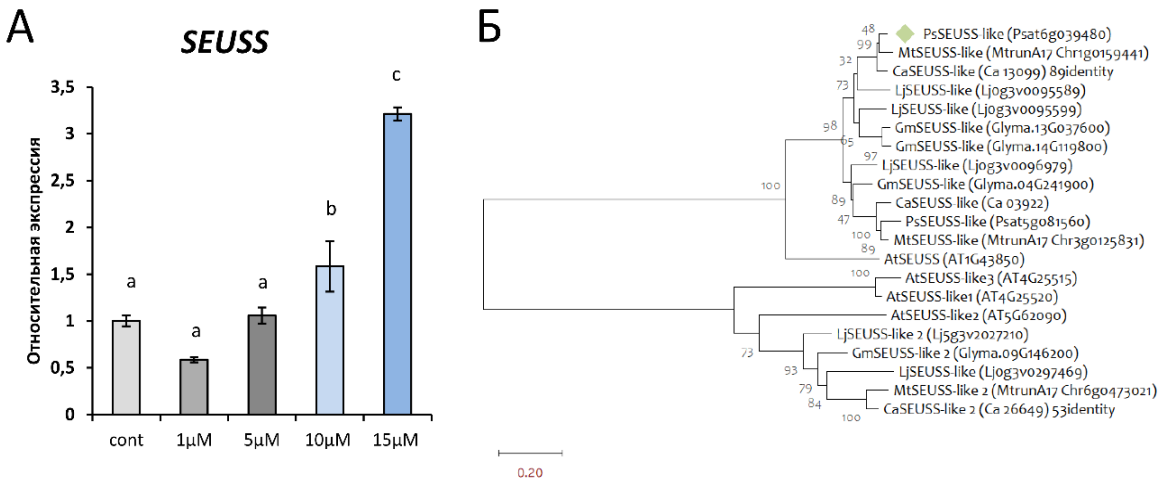


**Рисунок 19**. – А. Уровни экспрессии гена *SEUSS* в клубеньках мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*), не обработанных (контроль) или обработанных повышающими концентрациями цитокинина. Экспрессия нормализована по отношению к конститутивно экспрессируемому гену убиквитина. Анализ изменений в экспрессии генов был проведен на основе трех биологических повторностей. Представлены результаты одной из трех биологических повторностей, а также стандартная ошибка среднего (SEM) для трех технических повторностей. Разные буквы указывают на статистически значимые различия, основанные на одностороннем дисперсионном анализе (one-way ANOVA), за которым следуют результаты post-hoc теста Тьюки. Б. Реконструкция филогенетических отношений SEUSS и SEUSS-подобных белков у гороха, люцерны, лядвенца, нута, сои и арабидопсиса. Числа обозначают поддержку ветвей на основе 1000 итераций метода bootstrap. Ромбами отмечена выявленная в анализе последовательность.

Анализ экспрессии гена *SEUSS* (рис. 19А) в клубеньках мутанта показал последовательное её увеличение в ответ на обработку экзогенным цитокинином в повышающихся концентрациях. Известно, что у арабидопсиса, активация SEUSS транскрипционным фактором SCARECROW приводит к стимуляции экспрессии гена меристем-специфичного транскрипционного фактора WOX5 [225]. Мы полагаем, что SEUSS может иметь непосредственное отношение к регуляции морфогенеза клубенька, поскольку ранее проведенные исследования выявили важную роль транскрипционного фактора WOX5 в формировании клубеньков у гороха и люцерны усеченной [226]. Вместе с тем, недавно была показана и специфичная роль другого транскрипционного фактора SCARECROW в регуляции органогенеза

клубеньков у бобовых растений [227]. Филогенетическое дерево (рис. 19Б), построенное нами, показывает расположение найденного SEUSS-подобного белка гороха в одной кладе с AtSEUSS арабидопсиса, что может говорить о важной роли этого регулятора в контроле морфогенетических процессов.

Более того, экспрессия гена *SEUSS* может напрямую регулироваться транскрипционным фактором NIN. Исследования по ко-иммунопреципитации хроматина у лядвенца японского *L. japonicus* [113] выявили наличие гомологичного гену гороха, гена *SEUSS* среди тех, которые активируются транскрипционным фактором NIN у этого бобового. Действительно, проведя первичный анализ промоторной области выявленного гена *SEUSS* у гороха, мы нашли сайт посадки для транскрипционного фактора NIN (рис. 20).

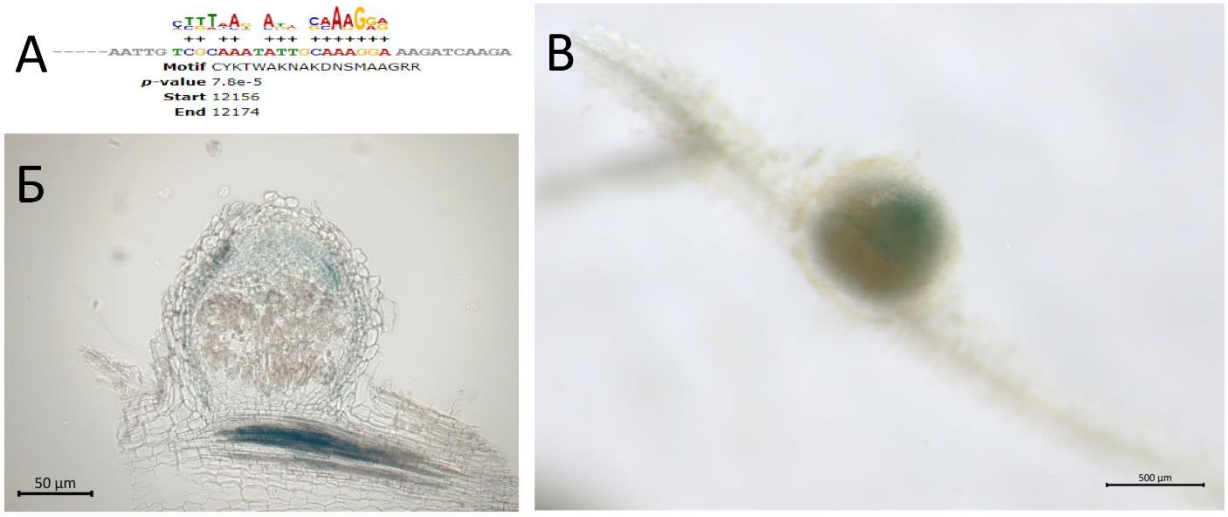


**Рисунок 20**. А. Анализ промоторной области гена *SEUSS* на присутствие возможного сайта связывания с транскрипционным фактором NIN на основании выравнивания известных сайтов связывания для этого транскрипционного фактора. Б. Локализация активности промотора гена *SEUSS*, содержащего предположительный сайт связывания транскрипционного фактора NIN, в клубеньках гороха. В. Общий вид клубенька с локализацией pSEUSS*::GUS*.

Анализ области активности промотора гена *SEUSS*, показал, что ген экспрессируется непосредственно в зоне меристемы, что позволяет сделать вывод о возможной роли SEUSS в регуляции развития клубенька, а точнее в

поддержании активности меристемы и формирования разных зон в клубеньках. На основании изучения модельных растений арабидопсиса показано, что активация регулятора SEUSS транскрипционным фактором SCARECROW приводит к стимуляции экспрессии гена меристем-специфичного транскрипционного фактора WOX5. Важная роль WOX5 в формировании клубеньков у гороха и люцерны усеченной была показана ранее. Однако полученные нами данные о том, что специфичный для симбиоза транскрипционный фактор NIN может модулировать активность меристем-специфичных регуляторов впервые показывает, что при симбиозе морфогенез новых органов контролируется под влиянием NIN, активирующего классические мастер-регуляторы этих процессов у растений.

### 3.4. Трансформация небобовых растений генетическими конструкциями, содержащими ген *NIN*, и оценка влияния этого гена на развитие таких растений

Другим направлением нашей работы явилось изучение влияния специфичного для бобово-ризобиального симбиоза транскрипционного фактора NIN на небобовые растения. Эти исследования направлены на изучение возможности переноса способности к клубенькообразованию в небобовые растения. На основании данных об особенностях структурной организации и регуляции экспрессии гена транскрипционного фактора NIN, а также о связанных с ним ко-регуляторах, можно попытаться перенести этот ген в небобовые растения, которые недавно утратили гены *NIN*, и оценить способность к образованию клубенькоподобных структур на корнях таких небобовых растений. Ранее мы отмечали, что представители семейства *Canabaceae*, в частности хмель, трема и конопля имеют набор из 290 генов, необходимых для развития ризобиального симбиоза, за исключением трех «утраченных» генов, среди которых ген транскрипционного фактора NIN.

В связи с этим, нами были проведены эксперименты по переносу гена *NIN* гороха посевного под конститутивным и нативными промоторами в растения хмеля сорта Cascade. После трансформации композитные растения хмеля были перенесены в субстрат и инокулированы штаммом ризобий *R. ruizarguesonis* RCAM1026. В результате проведенных экспериментов на трансгенных корнях растений хмеля через 4-5 недель после инокуляции были выявлены клубенькоподобные структуры (рис. 21)

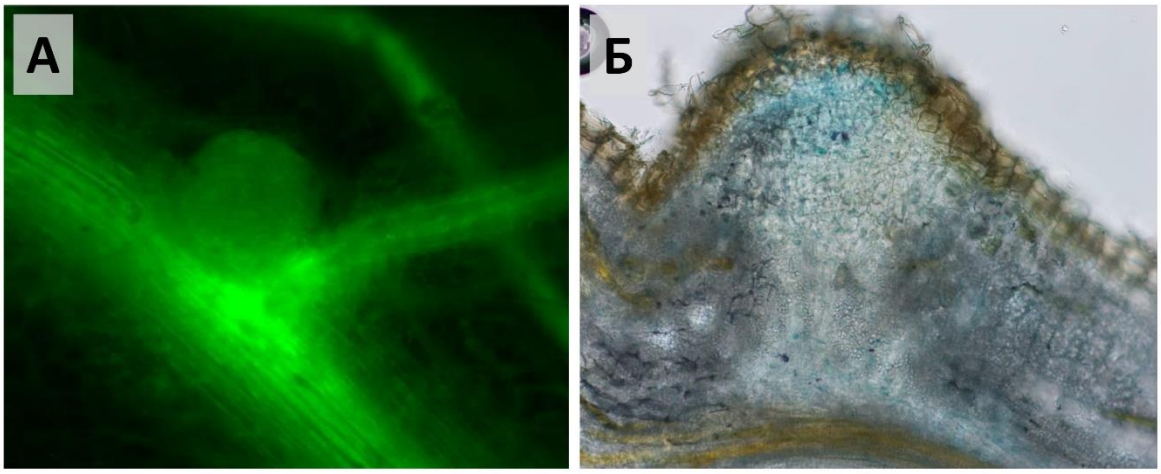


**Рисунок 21**. – А. Формирование клубенькоподобных структур на трансгенных корнях хмеля, трансформированных генетической конструкцией p35S::*NIN*, содержащей ген транскрипционного фактора NIN гороха под конститутивным промотором (общий вид). Б. Срез клубенькоподобной структуры на корнях хмеля.

Таким образом, нами впервые было показано, что при переносе гена транскрипционного фактора NIN, специфичного для формирования клубеньков у бобовых растений, в геном небобовых растений, утративших эту способность, на корнях этих растений могут формироваться клубенькоподобные структуры. Эти эксперименты станут основой для расширения круга растений, способных формировать симбиотические клубеньки при взаимодействии с симбиотическими ризобиями.

## Заключение

Транскрипционный фактор NIN является важным эволюционным приобретением растений, образующих корневые клубеньки. Вместе с развитием и дальнейшим становлением взаимодействий с новыми симбионтами и изменением внешнего вида клубеньков, структура и регуляция транскрипционного фактора NIN также изменялась.

Дупликация предкового гена, общего для генов, кодирующих транскрипционные факторы NIN и NLP, и дальнейшая неофункциализация NIN позволили растениям клады NFC образовывать симбиозы с азотфиксирующими бактериями. Специфичность структуры I и II доменов (также называемым GAF-доменом, включающим 4, 5 и 6 мотивы) транскрипционного фактора NIN у растений, образующих симбиозы с бактериями порядка *Rhizobiales,* позволила этим растениям расширить круг симбионтов. В составе тех же I и II доменов нами впервые были обнаружены паттерны аминокислот (мотив 5 и, возможно, 6), характерные для растений, образующих клубеньки недетерминированного типа.

С изменением морфологии клубеньков в ходе эволюции транскрипционный фактор NIN приобрел разнообразную многофакторную регуляцию. Помимо сайта связывания транскрипционного фактора IPD3/CYCLOPS (CYC-бокса) в промоторной области гена *NIN* у бобовых растений, у некоторых бобовых была найдена новая удаленная регуляторная последовательность, представляющая цитокинин-регулируемый элемент – CE-box. Наши эксперименты показали, что под влиянием активации экспрессии *NIN* через CE-бокс цитокининами (точнее регулятором цитокининового ответа RR Б-типа) происходит стимуляция образования новых примордиев клубеньков у мутанта SGEFix$^-$- 2 (ipd3/cyclops). Это указывает на важность регуляции NIN через CE-бокс для контроля органогенеза клубенька у гороха.

Вместе с тем, под влиянием активации NIN цитокининами происходила стимуляция выхода ризобий из инфекционных нитей, что увеличивало их размер и процент инфицированных клеток в клубеньках мутанта по гену *ipd3/cyclops*. Эти данные показали, что транскрипционный фактор NIN может играть важную роль и в контроле более поздних этапов морфогенеза клубенька. Ранее эта роль оставалась малоизученной. Проведенный нами транскриптомный анализ растений дикого типа SGE и мутанта *ipd3/cyclops* на фоне обработки цитокинина дал новое представление о программе симбиотического развития клубеньков на поздних стадиях у гороха *P. sativum* и выявил сеть регуляторов, участвующих в этом процессе.

Полученные новые данные об особенностях структуры и регуляции транскрипционного фактора NIN, а также о связанных с ним генах-мишенях и ко-регуляторах, могут быть использованы для регуляции формирования симбиотических клубеньков и их эффективности. Вместе с тем, эти данные могут быть использованы и для того, чтобы передать способность к образованию клубенькоподобных структур и небобовым растениям. Хмель является удобной моделью для анализа влияния интродукции гена *NIN* бобового растения в геном этого небобового растения. Некоторые представители *Cannabaceae*, в том числе хмель, имеют набор из 290 генов, необходимых для развития ризобиального симбиоза, за исключением трех утраченных генов, среди которых ген транскрипционного фактора NIN. Возможность образовывать клубенькоподобные структуры на трансгенных корнях хмеля после интродукции гена NIN показало сохранение функциональности и возможности влияния транскрипционного фактора NIN на этот набор генов.

# ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей транскрипционного фактора NIN у разных видов бобовых растений выявил наличие специфичного мотива 5 на N-конце белка, характерного для этого регулятора у растений, образующих клубеньки недетерминированного типа.

2. Выявлены новые белки, взаимодействующие с транскрипционным фактором NIN гороха, при развитии симбиоза. Среди них оказались ферменты, которые могут участвовать в модификации этого транскрипционного фактора. Кроме того, впервые выявлено взаимодействие между NIN и ключевыми ферментами, влияющими на метаболизм клубеньков и их функционирование.

3. Выявлен новый удаленный цитокинин-регулируемый CE-бокс в промоторе гена *NIN* у гороха, посредством которого транскрипционный фактор NIN влияет на органогенез клубенька. Впервые обнаружен контролируемый гиббереллинами GA-бокс в промоторе гена *NIN*, который необходим для комплементации мутанта *nin*, дефектного по развитию симбиоза.

4. В экспериментах по экзогенной обработке растений гороха цитокининами, показана возможная роль транскрипционного фактора NIN в контроле не только ранних, но и более поздних этапов развития симбиотических клубеньков, связанных с контролем выхода ризобий из инфекционных нитей.

5. Выявлены новые регуляторы морфогенеза клубенька, активируемые транскрипционным фактором NIN. Среди них транскрипционный регулятор SEUSS, который может влиять на регуляцию активности меристем в клубеньках недетерминированного типа.

6. В результате интродукции кодирующей последовательности гена *NIN* гороха в геном небобового растения хмеля была впервые показана возможность образования клубенькоподобных структур на корнях этих растений, не образующих симбиозы с азотфиксирующими бактериями.

## Список литературы


1. Mithöfer A., Boland W. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects // Annu. Rev. Plant Biol. 2012. Vol. 63, № 1. P. 431–450. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103854.

2. Bonkowski M., Villenave C., Griffiths B. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots // Plant Soil. 2009. Vol. 321, № 1–2. P. 213–233. doi: 10.1007/s11104-009-0013-2.

3. Becker M.H. et al. Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen Batrachochytrium dendrobatidis // Mol. Ecol. 2015. Vol. 24, № 7. P. 1628–1641. doi: 10.1111/mec.13135.

4. Soto M.J., Sanjuán J., Olivares J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons // Microbiology. 2006. Vol. 152, № 11. P. 3167–3174. doi: 10.1099/mic.0.29112-0.

5. Lipa P., Janczarek M. Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses // PeerJ. 2020. Vol. 8. P. e8466. doi: 10.7717/peerj.8466.

6. Sriprang R. et al. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia // J. Biotechnol. 2002. Vol. 99, № 3. P. 279–293. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00219-5.

7. Höflich G., Wiehe W., Kühn G. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms // Experientia. 1994. Vol. 50, № 10. P. 897–905. doi: 10.1007/BF01923476.

8. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2009. 209 p.

9. Hoffman B.M. et al. Nitrogenase: A Draft Mechanism // Acc. Chem. Res. 2013. Vol. 46, № 2. P. 587–595. doi: 10.1021/ar300267m.

10. Kump L.R. The rise of atmospheric oxygen // Nature. 2008. Vol. 451, № 7176. P. 277–278. doi: 10.1038/nature06587.

11. Sprent J.I., Raven J.A. Evolution of nitrogen-fixing symbioses // Proc. R. Soc. Edinburgh. Sect. B. Biol. Sci. 1985. Vol. 85, № 3–4. P. 215–237. doi: 10.1017/S0269727000004036.

12. Oliveira M.N.V. et al. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of Coffea arabica from southeastern Brazil // Can. J. Microbiol. 2013. Vol. 59,

№ 4. P. 221–230. doi: 10.1139/cjm-2012-0674.

13. Liu Y. et al. Archaeal communities associated with roots of the common reed (Phragmites australis) in Beijing Cuihu Wetland // World J. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 31, № 5. P. 823–832. doi: 10.1007/s11274-015-1836-z.

14. Müller H. et al. Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar Bacillus antagonists colonize Mediterranean olive trees // Front. Microbiol. 2015. Vol. 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00138.

15. Wrede C. et al. Archaea in Symbioses // Archaea. 2012. Vol. 2012. P. 1–11. doi: 10.1155/2012/596846.

16. Coale T.H. et al. Nitrogen-fixing organelle in a marine alga // Science (80-. ). 2024. Vol. 384, № 6692. P. 217–222. doi: 10.1126/science.adk1075.

17. Mishra N., Rakesh B. Symbiotic cyanobacteria in gymnosperms // Microbial Symbionts. Elsevier, 2023. P. 29–37. doi: 10.1016/B978-0-323-99334-0.00019-0.

18. Rehman M. et al. Cyanobacterial symbionts from angiosperm // Microbial Symbionts. Elsevier, 2023. P. 39–55. doi: 10.1016/B978-0-323-99334-0.00030-X.

19. Adams D.G., Duggan P.S. Cyanobacteria-bryophyte symbioses // J. Exp. Bot. 2008. Vol. 59, № 5. P. 1047–1058. doi: 10.1093/jxb/ern005.

20. Latysheva N. et al. The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria // Bioinformatics. 2012. Vol. 28, № 5. P. 603–606. doi: 10.1093/bioinformatics/bts008.

21. Warshan D. et al. Genomic Changes Associated with the Evolutionary Transitions of Nostoc to a Plant Symbiont // Mol. Biol. Evol. / ed. Perna N. 2018. Vol. 35, № 5. P. 1160–1175. doi: 10.1093/molbev/msy029.

22. Baker J.A., Entsch B., McKay D.B. The cyanobiont in an Azolla fern is neither Anabaena nor Nostoc // FEMS Microbiol. Lett. 2003. Vol. 229, № 1. P. 43–47. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00784-5.

23. O'Brien H.E., Miadlikowska J., Lutzoni F. Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus Peltigera // Eur. J. Phycol. 2005. Vol. 40, № 4. P. 363–378. doi: 10.1080/09670260500342647.

24. Gao Z.-M. et al. Symbiotic Adaptation Drives Genome Streamlining of the Cyanobacterial Sponge Symbiont " Candidatus Synechococcus spongiarum" // MBio / ed. Dominguez Bello M.G. 2014. Vol. 5, № 2. doi: 10.1128/mBio.00079-14.

25. Burgsdorf I. et al. Lifestyle Evolution in Cyanobacterial Symbionts of Sponges // MBio / ed. Bailey M.J. 2015. Vol. 6, № 3. doi: 10.1128/mBio.00391-15.

26. Konstantinou D. et al. Sponges-Cyanobacteria associations: Global diversity overview and new data from the Eastern Mediterranean // PLoS One / ed. Duperron S. 2018. Vol. 13, № 3. P. e0195001. doi: 10.1371/journal.pone.0195001.

27. Foster R.A., Goebel N.L., Zehr J.P. ISOLATION OF CALOTHRIX RHIZOSOLENIAE (CYANOBACTERIA) STRAIN SC01 FROM CHAETOCEROS (BACILLARIOPHYTA) SPP. DIATOMS OF THE SUBTROPICAL NORTH PACIFIC OCEAN1 // J. Phycol. 2010. Vol. 46, № 5. P. 1028–1037. doi: 10.1111/j.1529-8817.2010.00885.x.

28. Bergman B., Osborne B. The Gunnera: Nostoc Symbiosis // Biol. Environ. Proc. R. Irish Acad. 2002. Vol. 102B, № 1. P. 35–39. doi: 10.1353/bae.2002.0024.

29. PETER J., YOUNG W., HAUKKA K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia // New Phytol. 1996. Vol. 133, № 1. P. 87–94. doi: 10.1111/j.1469-8137.1996.tb04344.x.

30. Santi C., Bogusz D., Franche C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants // Ann. Bot. 2013. Vol. 111, № 5. P. 743–767. doi: 10.1093/aob/mct048.

31. Gehringer M.M. et al. Host Selection of Symbiotic Cyanobacteria in 31 Species of the Australian Cycad Genus: Macrozamia (Zamiaceae) // Mol. Plant-Microbe Interact. 2010. Vol. 23, № 6. P. 811–822. doi: 10.1094/MPMI-23-6-0811.

32. Thajuddin N. et al. Morphological and genetic diversity of symbiotic cyanobacteria from cycads // J. Basic Microbiol. 2010. Vol. 50, № 3. P. 254–265. doi: 10.1002/jobm.200900343.

33. Chang A.C.G. et al. Perspectives on Endosymbiosis in Coralloid Roots: Association of Cycads and Cyanobacteria // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.01888.

34. Pawlowski K., Demchenko K.N. The diversity of actinorhizal symbiosis // Protoplasma. 2012. Vol. 249, № 4. P. 967–979. doi: 10.1007/s00709-012-0388-4.

35. Werner G.D.A. et al. A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N2-fixation in angiosperms // Nat. Commun. 2014. Vol. 5, № 1. P. 4087. doi: 10.1038/ncomms5087.

36. Li H.-L. et al. Large-scale phylogenetic analyses reveal multiple gains of actinorhizal nitrogen-fixing symbioses in angiosperms associated with climate change // Sci. Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 14023. doi: 10.1038/srep14023.

37. Huss-Danell K., Frej A.-K. Distribution of Frankia in soils from forest and afforestation sites in northern Sweden // Plant Soil. 1986. Vol. 90, № 1–3. P. 407–417. doi: 10.1007/BF02277412.

38. Bhattacharjee O. et al. Nodule INception -independent epidermal events lead to bacterial entry during nodule development in peanut ( Arachis hypogaea ) // New Phytol. 2022. Vol. 236, № 6. P. 2265–2281. doi: 10.1111/nph.18483.

39. Xiao T.T. et al. Fate map of Medicago truncatula root nodules. 2014. P. 3517–3528. doi: 10.1242/dev.110775.

40. 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. Vol. 89. P. 31–41. doi: 10.1016/j.sajb.2013.06.011.

41. Guinel F.C. Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types // Botany. 2009. Vol. 87, № 12. P. 1117–1138. doi: 10.1139/B09-074.

42. Doyle J.J. Phylogenetic Perspectives on the Origins of Nodulation // Mol. Plant-Microbe Interact. 2011. Vol. 24, № 11. P. 1289–1295. doi: 10.1094/MPMI-05-11-0114.

43. Griesmann M. et al. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis // Science (80-. ). 2018. Vol. 361, № 6398. doi: 10.1126/science.aat1743.

44. Martin F.M., Uroz S., Barker D.G. Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria // Science (80-. ). 2017. Vol. 356, № 6340. doi: 10.1126/science.aad4501.

45. Schauser, Leif Roussis, Andreas Stiller, Jiri Stougaard J. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. 1999. Vol. 402. P. 191–195. doi: 10.1038/46058.

46. Borisov A.Y. et al. The Sym35 Gene Required for Root Nodule Development in Pea Is an Ortholog of Nin from Lotus japonicus // Plant Physiol. 2003. Vol. 131, № 3. P. 1009–1017. doi: 10.1104/pp.102.016071.

47. Marsh J.F. et al. Medicago truncatula NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase // Plant Physiol. 2007. Vol. 144, № 1. P. 324–335. doi: 10.1104/pp.106.093021.

48. Clavijo F. et al. The Casuarina NIN gene is transcriptionally activated throughout Frankia root infection as well as in response to bacterial diffusible signals // New Phytol. 2015. Vol. 208, № 3. P. 887–903. doi: 10.1111/nph.13506.

49. TRINICK M.J. Symbiosis between Rhizobium and the Non-legume, Trema aspera // Nature. 1973. Vol. 244, № 5416. P. 459–460. doi: 10.1038/244459a0.

50. Granqvist E. et al. Bacterial-induced calcium oscillations are common to nitrogen-fixing associations of nodulating legumes and non-legumes // New Phytol. 2015. Vol. 207, № 3. P. 551–558. doi: 10.1111/nph.13464.

51. van Velzen R. et al. Comparative genomics of the nonlegume Parasponia reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2018. Vol. 115, № 20. P. E4700–E4709. doi: 10.1073/pnas.1721395115.

52. Downie J.A. Legume nodulation // Curr. Biol. 2014. Vol. 24, № 5. P. R184–R190. doi: 10.1016/j.cub.2014.01.028.

53. Soyano T. et al. NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in Lotus japonicus // PLoS Genet. 2013. Vol. 9, № 3. doi: 10.1371/journal.pgen.1003352.

54. Demina I. V et al. Comparison of the Nodule vs . Root Transcriptome of the Actinorhizal Plant Datisca glomerata : Actinorhizal Nodules Contain a Specific Class of Defensins. 2013. Vol. 8, № 8. doi: 10.1371/journal.pone.0072442.

55. Hocher V. et al. Transcriptomics of Actinorhizal Symbioses Reveals Homologs of the Whole Common Symbiotic Signaling Cascade // Plant Physiol. 2011. Vol. 156, № 2. P. 700–711. doi: 10.1104/pp.111.174151.

56. Cissoko M. et al. Actinorhizal Signaling Molecules: Frankia Root Hair Deforming Factor Shares Properties With NIN Inducing Factor // Front. Plant Sci. 2018. Vol. 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01494.

57. Chabaud M. et al. Chitinase-resistant hydrophilic symbiotic factors secreted by Frankia activate both Ca 2+ spiking and NIN gene expression in the actinorhizal plant Casuarina glauca // New Phytol. 2016. Vol. 209, № 1. P. 86–93. doi: 10.1111/nph.13732.

58. Diédhiou I. et al. Identification of potential transcriptional regulators of actinorhizal symbioses in Casuarina glauca and Alnus glutinosa // BMC Plant Biol. 2014. Vol. 14, № 1. P. 342. doi: 10.1186/s12870-014-0342-z.

59. Chardin C. et al. The plant RWP-RK transcription factors: key regulators of nitrogen responses and of gametophyte development // J. Exp. Bot. 2014. Vol. 65, № 19. P. 5577–5587. doi: 10.1093/jxb/eru261.

60. Konishi M., Yanagisawa S. The role of protein-protein interactions mediated by the PB1 domain of NLP transcription factors in nitrate-inducible gene expression 06 Biological Sciences 0604 Genetics 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology // BMC Plant Biol. BMC Plant Biology, 2019. Vol. 19, № 1. P. 1–12.

61. Eichinger L. et al. The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum // Nature. 2005. Vol. 435, № 7038. P. 43–57. doi: 10.1038/nature03481.

62. Sumimoto H., Kamakura S., Ito T. Structure and Function of the PB1 Domain, a Protein Interaction Module Conserved in Animals, Fungi, Amoebas, and Plants // Sci. STKE. 2007. Vol. 2007, № 401. doi: 10.1126/stke.4012007re6.

63. Den Camp R.O. et al. LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume Parasponia // Science (80-. ). 2011. Vol. 331, № 6019. P. 909–912. doi: 10.1126/science.1198181.

64. Bu F. et al. Mutant analysis in the nonlegume Parasponia andersonii identifies NIN and NF-YA1 transcription factors as a core genetic network in nitrogen-fixing nodule symbioses // New Phytol. 2020. Vol. 226, № 2. P. 541–554. doi: 10.1111/nph.16386.

65. Liu J., Bisseling T. Evolution of nin and NIN-like genes in relation to nodule symbiosis // Genes (Basel). 2020. Vol. 11, № 7. P. 1–15. doi: 10.3390/genes11070777.

66. Schauser L., Wieloch W., Stougaard J. Evolution of NIN-Like Proteins in Arabidopsis, Rice, and Lotus japonicus // J. Mol. Evol. 2005. Vol. 60, № 2. P. 229–237. doi: 10.1007/s00239-004-0144-2.

67. Yano K. et al. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, № 51. P. 20540–20545. doi: 10.1073/pnas.0806858105.

68. Liu M. et al. ERN1 and CYCLOPS coordinately activate NIN signaling to promote infection thread formation in Lotus japonicus // J. Plant Res. 2019. Vol. 132, № 5. P. 641–653. doi: 10.1007/s10265-019-01122-w.

69. Heckmann A.B. et al. Cytokinin Induction of Root Nodule Primordia in Lotus japonicus Is Regulated by a Mechanism Operating in the Root Cortex // Mol. Plant-Microbe Interact. 2011. Vol. 24, № 11. P. 1385–1395. doi: 10.1094/MPMI-05-11-0142.

70. Yoro E. et al. A Positive Regulator of Nodule Organogenesis, NODULE INCEPTION, Acts as a Negative Regulator of Rhizobial Infection in Lotus japonicus // Plant Physiol. 2014. Vol. 165, № 2. P. 747–758. doi: 10.1104/pp.113.233379.

71. Xiao A. et al. Transcriptional regulation of NIN expression by IPN2 is required for root nodule symbiosis in Lotus japonicus // New Phytol. 2020. Vol. 227, № 2. P. 513–528. doi: 10.1111/nph.16553.

72. Fu M. et al. Asymmetric redundancy of soybean Nodule Inception (NIN) genes in root nodule symbiosis // Plant Physiol. 2022. Vol. 188, № 1. P. 477–489. doi: 10.1093/plphys/kiab473.

73. Bhattacharjee O. et al. Nodule INception-independent epidermal events lead to bacterial entry during nodule development in peanut (Arachis hypogaea) // New Phytol. 2022. Vol. 236, № 6. P. 2265–2281. doi: 10.1111/nph.18483.

74. Timmers A.C.J., Auriac M.-C., Truchet G. Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements // Development. 1999. Vol. 126, № 16. P. 3617–3628. doi: 10.1242/dev.126.16.3617.

75. van Spronsen P.C. et al. Cell Biological Changes of Outer Cortical Root Cells in Early Determinate Nodulation // Mol. Plant-Microbe Interact. 2001. Vol. 14, № 7. P. 839–847. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.7.839.

76. Mergaert P. et al. A Novel Family in Medicago truncatula Consisting of More Than 300 Nodule-Specific Genes Coding for Small, Secreted Polypeptides with Conserved Cysteine Motifs, // Plant Physiol. 2003. Vol. 132, № 1. P. 161–173. doi: 10.1104/pp.102.018192.

77. Kato T. et al. Expression of Genes Encoding Late Nodulins Characterized by a Putative Signal Peptide and Conserved Cysteine Residues Is Reduced in Ineffective Pea Nodules // Mol. Plant-Microbe Interact. 2002. Vol. 15, № 2. P. 129–137. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.2.129.

78. Montiel J. et al. Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides // Proc. Natl. Acad. Sci. 2017. Vol. 114, № 19. P. 5041–5046. doi: 10.1073/pnas.1704217114.

79. Liu J. et al. A remote cis-regulatory region is required for nin expression in the pericycle to initiate nodule primordium formation in medicago truncatula // Plant Cell. 2019. Vol. 31, № 1. P. 68–83. doi: 10.1105/tpc.18.00478.

80. Hirsch S. et al. GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in Medicago truncatula // Plant Cell. 2009. Vol. 21, № 2. P. 545–557. doi: 10.1105/tpc.108.064501.

81. Oldroyd G.E.D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants // Nat. Rev. Microbiol. 2013. Vol. 11, № 4. P. 252–263. doi: 10.1038/nrmicro2990.

82. Bonfante P., Genre A. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective // Trends Plant Sci. 2008. Vol. 13, № 9. P. 492–498. doi: 10.1016/j.tplants.2008.07.001.

83. Spatafora J.W. et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data // Mycologia. 2016. Vol. 108, № 5. P. 1028–1046. doi: 10.3852/16-042.

84. Bravo A. et al. Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics // Nat. Plants. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 2, № 2. doi: 10.1038/NPLANTS.2015.208.

85. Streng A. et al. Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling // Plant Signal. Behav. 2011. Vol. 6, № 10. P. 1510–1514. doi: 10.4161/psb.6.10.17444.

86. Stafford H.A. Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots // Bot. Rev. 1997. Vol. 63, № 1. P. 27–39. doi: 10.1007/BF02857916.

87. Dénarié J., Debellé F., Promé J.-C. RHIZOBIUM LIPO-CHITOOLIGOSACCHARIDE NODULATION FACTORS: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis // Annu. Rev. Biochem. 1996. Vol. 65, № 1. P. 503–535. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002443.

88. Gifford I. et al. Distinctive Patterns of Flavonoid Biosynthesis in Roots and Nodules of Datisca glomerata and Medicago spp. Revealed by Metabolomic and Gene Expression Profiles // Front. Plant Sci. 2018. Vol. 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01463.

89. Zhukov V. et al. The Pea Sym37 Receptor Kinase Gene Controls Infection-Thread Initiation and Nodule Development // Mol. Plant-Microbe Interact. 2008. Vol. 21, № 12. P. 1600–1608. doi: 10.1094/MPMI-21-12-1600.

90. Stracke S. et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis // Nature. 2002. Vol. 417, № 6892. P. 959–962. doi: 10.1038/nature00841.

91. Limpens E. et al. Formation of organelle-like N2 -fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2 // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. Vol. 102, № 29. P. 10375–10380. doi: 10.1073/pnas.0504284102.

92. Radutoiu S. et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM

receptor-like kinases // Nature. 2003. Vol. 425, № 6958. P. 585–592. doi: 10.1038/nature02039.

93. Arrighi J.-F. et al. The Medicago truncatula Lysine Motif-Receptor-Like Kinase Gene Family Includes NFP and New Nodule-Expressed Genes // Plant Physiol. 2006. Vol. 142, № 1. P. 265–279. doi: 10.1104/pp.106.084657.

94. Endre G. et al. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development // Nature. 2002. Vol. 417, № 6892. P. 962–966. doi: 10.1038/nature00842.

95. Vernié T. et al. PUB1 Interacts with the Receptor Kinase DMI2 and Negatively Regulates Rhizobial and Arbuscular Mycorrhizal Symbioses through Its Ubiquitination Activity in Medicago truncatula // Plant Physiol. 2016. Vol. 170, № 4. P. 2312–2324. doi: 10.1104/pp.15.01694.

96. Tsikou D. et al. A Lotus japonicus E3 ligase interacts with the Nod Factor Receptor 5 and positively regulates nodulation // BMC Plant Biol. 2018. Vol. 18, № 1. P. 217. doi: 10.1186/s12870-018-1425-z.

97. Ané J.M. et al. Medicago truncatula DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes // Science (80-. ). 2004. Vol. 303, № 5662. P. 1364–1367. doi: 10.1126/science.1092986.

98. Kanamori N. et al. A nucleoporin is required for induction of Ca2+ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. Vol. 103, № 2. P. 359–364. doi: 10.1073/pnas.0508883103.

99. Charpentier M. et al. Lotus japonicus CASTOR and POLLUX Are Ion Channels Essential for Perinuclear Calcium Spiking in Legume Root Endosymbiosis // Plant Cell. 2009. Vol. 20, № 12. P. 3467–3479. doi: 10.1105/tpc.108.063255.

100. Mitra R.M. et al. A Ca 2+/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning // Proc. Natl. Acad. Sci. 2004. Vol. 101, № 13. P. 4701–4705. doi: 10.1073/pnas.0400595101.

101. Tirichine L. et al. Deregulation of a Ca2+/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development // Nature. 2006. Vol. 441, № 7097. P. 1153–1156. doi: 10.1038/nature04862.

102. Messinese E. et al. A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of Medicago truncatula // Mol. Plant-Microbe Interact. 2007. Vol. 20, № 8. P. 912–921. doi: 10.1094/MPMI-20-8-0912.

103. Gobbato E. et al. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling // Curr. Biol. 2012. Vol. 22, № 23. P. 2236–2241. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.044.

104. Pimprikar P. et al. A CCaMK-CYCLOPS-DELLA Complex Activates Transcription of RAM1 to Regulate Arbuscule Branching // Curr. Biol. 2016. Vol. 26, № 8. P. 987–998. doi: 10.1016/j.cub.2016.01.069.

105. Singh S. et al. CYCLOPS, A DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development // Cell Host Microbe. Elsevier Inc., 2014. Vol. 15, № 2. P. 139–152. doi: 10.1016/j.chom.2014.01.011.

106. Breakspear A. et al. The root hair “infectome” of medicago truncatula uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infectionw // Plant Cell. 2014. Vol. 26, № 12. P. 4680–4701. doi: 10.1105/tpc.114.133496.

107. Suzaki T. et al. Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in Lotus japonicus is accompanied by auxin response. 2012. Vol. 4006. P. 3997–4006. doi: 10.1242/dev.084079.

108. Gao Z. et al. GmPIN-dependent polar auxin transport is involved in soybean nodule development // Plant Cell. 2021. Vol. 33, № 9. P. 2981–3003. doi: 10.1093/plcell/koab183.

109. Schiessl K. et al. NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in Medicago truncatula // Curr. Biol. Elsevier Ltd., 2019. Vol. 29, № 21. P. 3657-3668.e5. doi: 10.1016/j.cub.2019.09.005.

110. Liang J. et al. Flavonoids and Auxin Transport Inhibitors Rescue Symbiotic Nodulation in the Medicago truncatula Cytokinin Perception Mutant cre1. 2015. Vol. 27, № August. P. 2210–2226. doi: 10.1105/tpc.15.00231.

111. Suzaki T. et al. Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in Lotus japonicus is accompanied by auxin response // Development. 2012. Vol. 139, № 21. P. 3997–4006. doi: 10.1242/dev.084079.

112. Vernié T. et al. The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the medicago truncatula root // Plant Cell. 2015. Vol. 27, № 12. P. 3410–3424. doi: 10.1105/tpc.15.00461.

113. Liu C.W. et al. NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection // Plant Physiol. 2019. Vol. 179, № 4. P. 1704–1722. doi: 10.1104/pp.18.01572.

114. Maekawa T. et al. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in Lotus japonicus // Plant J. 2009. Vol. 58, № 2. P. 183–194. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03774.x.

115. Murray J.D. et al. A Cytokinin Perception Mutant Colonized by Rhizobium in the Absence of Nodule Organogenesis // Science (80-. ). 2007. Vol. 315, № 5808. P. 101–104. doi: 10.1126/science.1132514.

116. Held M. et al. Lotus japonicus Cytokinin Receptors Work Partially Redundantly to Mediate Nodule Formation // Plant Cell. 2014. Vol. 26, № 2. P. 678–694. doi: 10.1105/tpc.113.119362.

117. Ferguson B.J. et al. Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in Pisum sativum // New Phytol. 2011. Vol. 189, № 3. P. 829–842. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03542.x.

118. De Carvalho-Niebel F. et al. The Nod factor-elicited annexin MtAnn1 is preferentially localised at the nuclear periphery in symbiotically activated root tissues of Medicago truncatula // Plant J. 2002. Vol. 32, № 3. P. 343–352. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01429.x.

119. Liu K. et al. Discovery of nitrate–CPK–NLP signalling in central nutrient–growth networks // Nature. 2017. Vol. 545, № 7654. P. 311–316. doi: 10.1038/nature22077.

120. Konishi M., Yanagisawa S. Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling // Nat. Commun. 2013. Vol. 4, № 1. P. 1617. doi: 10.1038/ncomms2621.

121. Ho Y.-S.J. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor // EMBO J. 2000. Vol. 19, № 20. P. 5288–5299. doi: 10.1093/emboj/19.20.5288.

122. Su Y., Lagarias J.C. Light-Independent Phytochrome Signaling Mediated by Dominant GAF Domain Tyrosine Mutants of Arabidopsis Phytochromes in Transgenic Plants // Plant Cell. 2007. Vol. 19, № 7. P. 2124–2139. doi: 10.1105/tpc.107.051516.

123. Suzuki W., Konishi M., Yanagisawa S. The evolutionary events necessary for the emergence of symbiotic nitrogen fixation in legumes may involve a loss of nitrate responsiveness of the NIN transcription factor // Plant Signal. Behav. 2013. Vol. 8, № 10. P. e25975. doi: 10.4161/psb.25975.

124. Castaings L. et al. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in Arabidopsis // Plant J. 2009. Vol. 57, № 3. P. 426–435. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03695.x.

125. Marchive C. et al. Nuclear retention of the transcription factor NLP7

orchestrates the early response to nitrate in plants // Nat. Commun. 2013. Vol. 4, № 1. P. 1713. doi: 10.1038/ncomms2650.

126. Guan P. et al. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability // Proc. Natl. Acad. Sci. 2017. Vol. 114, № 9. P. 2419–2424. doi: 10.1073/pnas.1615676114.

127. Konishi M., Yanagisawa S. Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression // J. Exp. Bot. 2014. Vol. 65, № 19. P. 5589–5600. doi: 10.1093/jxb/eru267.

128. Lin J. et al. NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in Medicago truncatula // Nat. Plants. 2018. Vol. 4, № 11. P. 942–952. doi: 10.1038/s41477-018-0261-3.

129. Cao B.P. Genome-wide analysis of NIN-like protein (NLP) family in maize (Zea mays L.) by using bioinformatic methods // Sci. Technol. Dev. J. - Nat. Sci. 2017. Vol. 1, № T2. P. 39–47. doi: 10.32508/stdjns.v1iT2.450.

130. Kumar A. et al. Genome-wide identification and characterization of gene family for RWP-RK transcription factors in wheat (Triticum aestivum L.) // PLoS One / ed. Prasad M. 2018. Vol. 13, № 12. P. e0208409. doi: 10.1371/journal.pone.0208409.

131. Wang Z. et al. Phylogenetic, expression and functional characterizations of the maize NLP transcription factor family reveal a role in nitrate assimilation and signaling // Physiol. Plant. 2018. Vol. 163, № 3. P. 269–281. doi: 10.1111/ppl.12696.

132. Hsieh P.-H. et al. Early molecular events associated with nitrogen deficiency in rice seedling roots // Sci. Rep. 2018. Vol. 8, № 1. P. 12207. doi: 10.1038/s41598-018-30632-1.

133. Streeter J.G. Nitrate Inhibition of Legume Nodule Growth and Activity // Plant Physiol. 1985. Vol. 77, № 2. P. 321–324. doi: 10.1104/pp.77.2.321.

134. Coronado C. et al. Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated // Plant Physiol. 1995. Vol. 108, № 2. P. 533–542. doi: 10.1104/pp.108.2.533.

135. Streeter J., Wong P.P. Inhibition of legume nodule formation and N 2 fixation by nitrate // CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 1988. Vol. 7, № 1. P. 1–23. doi: 10.1080/07352688809382257.

136. Matamoros M.A. et al. Stress-Induced Legume Root Nodule Senescence. Physiological, Biochemical, and Structural Alterations // Plant Physiol. 1999. Vol. 121, № 1. P. 97–112. doi: 10.1104/pp.121.1.97.

137. Nishida H. et al. A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of

root nodule symbiosis in Lotus japonicus // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, № 1. P. 499. doi: 10.1038/s41467-018-02831-x.

138. Nishida H. et al. Different DNA-binding specificities of NLP and NIN transcription factors underlie nitrate-induced control of root nodulation // Plant Cell. 2021. Vol. 33, № 7. P. 2340–2359. doi: 10.1093/plcell/koab103.

139. Luo Z. et al. NLP1 binds the CEP1 signalling peptide promoter to repress its expression in response to nitrate // New Phytol. 2022. Vol. 234, № 5. P. 1547–1552. doi: 10.1111/nph.18062.

140. Kosterin O.E., Rozov S.M. Mapping of the new mutation blb and the problem of integrity of linkage group I // Pisum Genet. 1993. Vol. 25, № 8. P. 27–31.

141. Tsyganov V.E. et al. New symbiotic mutants of pea obtained after mutagenesis of line SGE // Pisum Genet. 1994. Vol. 26. P. 36–37.

142. Voroshilova V.A. et al. Effect of mutations in pisum sativum L. Genes blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in Rhizobium leguminosarum bv. viciae // Mol. Plant-Microbe Interact. 2001. Vol. 14, № 4. P. 471–476. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.4.471.

143. Ovchinnikova E. et al. IPD3 Controls the Formation of Nitrogen-Fixing Symbiosomes in Pea and Medicago Spp. // Mol. Plant-Microbe Interact. 2011. Vol. 24, № 11. P. 1333–1344. doi: 10.1094/MPMI-01-11-0013.

144. Tsyganov V.E. et al. A new series of pea symbiotic mutants induced in the line SGE // Russ. J. Genet. Appl. Res. 2013. Vol. 3, № 2. P. 156–162. doi: 10.1134/S2079059713020093.

145. Tsyganova A. V., Ivanova K.A., Tsyganov V.E. Histological and ultrastructural nodule organization of the pea (Pisum sativum) mutant sgefix–-5 in the Sym33 gene encoding the transcription factor PsCYCLOPS/PsIPD3 // Ecol. Genet. 2019. Vol. 17, № 1. P. 65–70. doi: 10.17816/ecogen17165-70.

146. Orosz L. et al. Genetic studies on Rhizobiophage 16-3 // Mol. Gen. Genet. MGG. 1973. Vol. 125, № 4. P. 341–350. doi: 10.1007/bf00276589.

147. Krall L. et al. Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of Agrobacterium tumefaciens // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. Vol. 99, № 17. P. 11405–11410. doi: 10.1073/pnas.172390699.

148. van Brussel A.A.. et al. Small leguminosae as test plants for nodulation of Rhizobium leguminosarum and other rhizobia and agrobacteria harbouring a leguminosarum sym-plasmid // Plant Sci. Lett. 1982. Vol. 27, № 3. P. 317–

325. doi: 10.1016/0304-4211(82)90134-1.

149. Dolgikh A.V., Dolgikh E.A. Searching for regulators that interact with BELL1 transcription factor and control the legume-rhizobial symbiosis development // Ecol. Genet. 2021. Vol. 19, № 1. P. 37–45. doi: 10.17816/ecogen51489.

150. FÅHRAEUS G. The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique // Microbiology. 1957. Vol. 16, № 2. P. 374–381. doi: 10.1099/00221287-16-2-374.

151. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 26.

152. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. Vol. 30, № 15. P. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

153. Bo Li, Colin N Dewey. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome // BMC Bioinformatics. 2011. Vol. 12, № 323. doi: doi:10.1186/1471-2105-12-323.

154. Kreplak J. et al. A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution // Nat. Genet. Springer US, 2019. Vol. 51, № 9. P. 1411–1422. doi: 10.1038/s41588-019-0480-1.

155. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biol. 2014. Vol. 15, № 12. P. 1–21. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

156. Ashburner M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology // Nat. Genet. 2000. Vol. 25, № 1. P. 25–29. doi: 10.1038/75556.

157. Morgan A.M., Falcon S., Gentleman R. GSEABase: Gene set enrichment data structures and methods. R package version 1.56.0. 2021.

158. Yang T. et al. Improved pea reference genome and pan-genome highlight genomic features and evolutionary characteristics // Nat. Genet. 2022. Vol. 54, № 10. P. 1553–1563. doi: 10.1038/s41588-022-01172-2.

159. Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. The rapid generation of mutation data matrices // Bioinformatics. 1992. Vol. 8, № 3. P. 275–282.

160. Nguyen L.T. et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. Vol. 32, № 1. P. 268–274. doi: 10.1093/molbev/msu300.

161. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // Mol. Biol. Evol. 2021. Vol. 38, № 7. P.

3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120.

162. Trifinopoulos J. et al. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis // Nucleic Acids Res. 2016. Vol. 44, № W1. P. W232–W235. doi: 10.1093/nar/gkw256.

163. Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool // Nucleic Acids Res. 2024. doi: 10.1093/nar/gkae268.

164. Concordet J.-P., Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens // Nucleic Acids Res. 2018. Vol. 46, № W1. P. W242–W245. doi: 10.1093/nar/gky354.

165. Bae S., Park J., Kim J.-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases // Bioinformatics. 2014. Vol. 30, № 10. P. 1473–1475. doi: 10.1093/bioinformatics/btu048.

166. Jiang S. et al. NIN-like protein transcription factors regulate leghemoglobin genes in legume nodules // Science (80-. ). 2021. Vol. 374, № 6567. P. 625–628. doi: 10.1126/science.abg5945.

167. Chiu C.H., Paszkowski U. Receptor-like kinases sustain symbiotic scrutiny // Plant Physiol. 2020. Vol. 182, № 4. P. 1597–1612. doi: 10.1104/PP.19.01341.

168. Janiak A. et al. A comparative analysis of proteins that accumulate during the initial stage of root hair development in barley root hair mutants and their parent varieties // J. Appl. Genet. 2012. Vol. 53, № 4. P. 363–376. doi: 10.1007/s13353-012-0105-1.

169. Parreira J.R. et al. Differential proteomics reveals the hallmarks of seed development in common bean ( Phaseolus vulgaris L.) // J. Proteomics. 2016. Vol. 143. P. 188–198. doi: 10.1016/j.jprot.2016.03.002.

170. Corredor-Prado J.P. et al. Proteomic analysis in the induction of nodular cluster cultures in the bromeliad Vriesea reitzii Leme and Costa // Acta Physiol. Plant. 2016. Vol. 38, № 5. P. 130. doi: 10.1007/s11738-016-2140-8.

171. Hosseini M. et al. Proteomics Analysis of Salt Responsive Proteins in Alfalfa (Medicago sativa L.) Leaves by Two Dimensional Electrophoresis and MALDI-TOF MS. // Curr. Proteomics. 2021. Vol. 18, № 3. P. 293–309. doi: 10.2174/1570164617999200630122623.

172. Feng J. et al. Processing of NODULE INCEPTION controls the transition to nitrogen fixation in root nodules // Science (80-. ). 2021. Vol. 374, № 6567. P. 629–632. doi: 10.1126/science.abg2804.

173. Saad M.M. et al. Loss of NifQ Leads to Accumulation of Porphyrins and Altered Metal-Homeostasis in Nitrogen-Fixing Symbioses // Mol. Plant-Microbe Interact. 2019. Vol. 32, № 2. P. 208–216. doi: 10.1094/MPMI-07-18-0188-R.

174. Obertello M. et al. Functional Analysis of the Metallothionein Gene cgMT1 Isolated from the Actinorhizal Tree Casuarina glauca // Mol. Plant-Microbe Interact. 2007. Vol. 20, № 10. P. 1231–1240. doi: 10.1094/MPMI-20-10-1231.

175. Fonseca-García C. et al. Metallothionein1A Regulates Rhizobial Infection and Nodulation in Phaseolus vulgaris // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, № 3. P. 1491. doi: 10.3390/ijms23031491.

176. Colditz F., Niehaus K., Krajinski F. Silencing of PR-10-like proteins in Medicago truncatula results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete Aphanomyces euteiches // Planta. 2007. Vol. 226, № 1. P. 57–71. doi: 10.1007/s00425-006-0466-y.

177. Reguera M., Bonilla I., Bolaños L. Boron deficiency results in induction of pathogenesis-related proteins from the PR-10 family during the legume–rhizobia interaction // J. Plant Physiol. 2010. Vol. 167, № 8. P. 625–632. doi: 10.1016/j.jplph.2009.11.017.

178. Vasse J., de Billy F., Truchet G. Abortion of infection during the Rhizobium meliloti —alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction // Plant J. 1993. Vol. 4, № 3. P. 555–566. doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.04030555.x.

179. Silva F.A. et al. A peroxidase purified from cowpea roots possesses high thermal stability and displays antifungal activity against Colletotrichum gloeosporioides and Fusarium oxysporum // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2022. Vol. 42. P. 102322. doi: 10.1016/j.bcab.2022.102322.

180. Maekawa T. et al. Polyubiquitin Promoter-Based Binary Vectors for Overexpression and Gene Silencing in Lotus japonicus // Mol. Plant-Microbe Interact. 2008. Vol. 21, № 4. P. 375–382. doi: 10.1094/MPMI-21-4-0375.

181. Prihatna C. et al. Tomato CYCLOPS/IPD3 is required for mycorrhizal symbiosis but not tolerance to Fusarium wilt in mycorrhiza-deficient tomato mutant rmc // Mycorrhiza. 2018. Vol. 28, № 5–6. P. 495–507. doi: 10.1007/s00572-018-0842-z.

182. Akamatsu A. et al. Endogenous gibberellins affect root nodule symbiosis via transcriptional regulation of NODULE INCEPTION in Lotus japonicus // Plant Journal. 2021. Vol. 105, № 6. 1507–1520 p. doi: 10.1111/tpj.15128.

183. Velandia K., Reid J.B., Foo E. Right time , right place : The dynamic role of hormones in rhizobial infection and nodulation of legumes // Plant Commun. Elsevier Ltd, 2022. Vol. 3, № 5. P. 100327. doi: 10.1016/j.xplc.2022.100327.

184. Voroshilova V.A. et al. Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads // New Phytol. 2009. Vol. 181, № 4. P. 913–923. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02723.x.

185. Ovchinnikova E. et al. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and Medicago spp. // Mol. Plant-Microbe Interact. 2011. Vol. 24, № 11. P. 1333–1344. doi: 10.1094/MPMI-01-11-0013.

186. Tsyganov V.E. et al. The pea (Pisum sativum L.) genes sym33 and sym40 control infection thread formation and root nodule function // Mol. Gen. Genet. 1998. Vol. 259, № 5. P. 491–503. doi: 10.1007/s004380050840.

187. Dolgikh E.A. et al. Mutational analysis indicates that abnormalities in rhizobial infection and subsequent plant cell and bacteroid differentiation in pea (pisum sativum) nodules coincide with abnormal cytokinin responses and localization // Ann. Bot. 2020. Vol. 125, № 6. P. 905–923. doi: 10.1093/aob/mcaa022.

188. Bauer P. et al. Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and MsEnod12A expression patterns in alfalfa roots // Plant J. 1996. Vol. 10, № 1. P. 91–105. doi: 10.1046/j.1365-313X.1996.10010091.x.

189. Lorteau M.A., Ferguson B.J., Guinel F.C. Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (Pisum sativum) cv. Sparkle // Physiol. Plant. 2001. Vol. 112, № 3. P. 421–428. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1120316.x.

190. Kantsurova (Rudaya) E.S. et al. Exogenously Applied Cytokinin Altered the Bacterial Release and Subsequent Stages of Nodule Development in Pea Ipd3/Cyclops Mutant // Plants. 2023. Vol. 12, № 3. P. 657. doi: 10.3390/plants12030657.

191. Vasse J. et al. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules // J. Bacteriol. 1990. Vol. 172, № 8. P. 4295–4306. doi: 10.1128/jb.172.8.4295-4306.1990.

192. Rudaya E.S. et al. Regulation of the Later Stages of Nodulation Stimulated by IPD3 / CYCLOPS Transcription Factor and Cytokinin in Pea. 2022.

193. Tsyganov V.E. et al. A Chemically Induced New Pea (Pisum sativum) Mutant SGECd t with Increased Tolerance to, and Accumulation of, Cadmium // Ann. Bot. 2007. Vol. 99, № 2. P. 227–237. doi:

10.1093/aob/mcl261.

194. Singh S.P. et al. Cell–substrate adhesion drives Scar/WAVE activation and phosphorylation by a Ste20-family kinase, which controls pseudopod lifetime // PLOS Biol. / ed. Weijer C. 2020. Vol. 18, № 8. P. e3000774. doi: 10.1371/journal.pbio.3000774.

195. Schmidt R.R. et al. Oxygen sensing and integrative stress signaling in plants // Plant Physiol. 2018. Vol. 176, № 2. P. 1131–1142. doi: 10.1104/pp.17.01394.

196. Lefebvre B. et al. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. 2010. Vol. 107, № 5. P. 1–6. doi: 10.1073/pnas.0913320107.

197. Raffaele S. et al. Genome-Wide Annotation of Remorins, a Plant-Specific Protein Family: Evolutionary and Functional Perspectives // Plant Physiol. 2007. Vol. 145, № 3. P. 593–600. doi: 10.1104/pp.107.108639.

198. Bourcy M. et al. Medicago truncatula DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions // New Phytol. 2013. Vol. 197, № 4. P. 1250–1261. doi: 10.1111/nph.12091.

199. Dolgikh E.A. et al. Genetic dissection of Rhizobium -induced infection and nodule organogenesis in pea based on ENOD12A and ENOD5 expression analysis // Plant Biol. 2011. Vol. 13, № 2. P. 285–296. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00372.x.

200. de Bang T.C. et al. Genome-Wide Identification of Medicago Peptides Involved in Macronutrient Responses and Nodulation // Plant Physiol. 2017. Vol. 175, № 4. P. 1669–1689. doi: 10.1104/pp.17.01096.

201. Hohnjec N. et al. The Signal Peptide of the Medicago truncatula Modular Nodulin MtNOD25 Operates as an Address Label for the Specific Targeting of Proteins to Nitrogen-Fixing Symbiosomes // Mol. Plant-Microbe Interact. 2009. Vol. 22, № 1. P. 63–72. doi: 10.1094/MPMI-22-1-0063.

202. Schröder G. et al. The temporal and spatial transcription pattern in root nodules of Vicia faba nodulin genes encoding glycine-rich proteins // Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 33, № 1. P. 113–123. doi: 10.1023/A:1005779116272.

203. Domingo-Serrano L. et al. A microaerobically induced small heat shock protein contributes to Rhizobium leguminosarum / Pisum sativum symbiosis and interacts with a wide range of bacteroid proteins // Appl. Environ. Microbiol. / ed. Alexandre G. 2024. doi: 10.1128/aem.01385-24.

204. Yang Z. et al. A small heat shock protein, GmHSP17.9, from nodule confers

symbiotic nitrogen fixation and seed yield in soybean // Plant Biotechnol. J. 2022. Vol. 20, № 1. P. 103–115. doi: 10.1111/pbi.13698.

205. Chen D. et al. Legume nodulation and nitrogen fixation require interaction of DnaJ-like protein and lipid transfer protein // Plant Physiol. 2023. Vol. 193, № 3. P. 2164–2179. doi: 10.1093/plphys/kiad437.

206. Muñoz J.A. et al. MsPG3 , a Medicago sativa polygalacturonase gene expressed during the alfalfa– Rhizobium meliloti interaction // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. Vol. 95, № 16. P. 9687–9692. doi: 10.1073/pnas.95.16.9687.

207. Rüping B. et al. Molecular and phylogenetic characterization of the sieve element occlusion gene family in Fabaceae and non-Fabaceaeplants // BMC Plant Biol. 2010. Vol. 10, № 1. P. 219. doi: 10.1186/1471-2229-10-219.

208. Pislariu C.I. et al. The Nodule-Specific PLAT Domain Protein NPD1 Is Required for Nitrogen-Fixing Symbiosis // Plant Physiol. 2019. Vol. 180, № 3. P. 1480–1497. doi: 10.1104/pp.18.01613.

209. Shen C. et al. Identification and Analysis of Medicago truncatula Auxin Transporter Gene Families Uncover their Roles in Responses to Sinorhizobium meliloti Infection // Plant Cell Physiol. 2015. Vol. 56, № 10. P. 1930–1943. doi: 10.1093/pcp/pcv113.

210. Muniyappa K., Kshirsagar R., Ghodke I. The HORMA domain: an evolutionarily conserved domain discovered in chromatin-associated proteins, has unanticipated diverse functions // Gene. 2014. Vol. 545, № 2. P. 194–197. doi: 10.1016/j.gene.2014.05.020.

211. Girke C. et al. Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism // Front. Plant Sci. 2014. Vol. 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00443.

212. Mergaert P. et al. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. Vol. 103, № 13. P. 5230–5235. doi: 10.1073/pnas.0600912103.

213. Cebolla A. et al. The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants // EMBO J. 1999. Vol. 18, № 16. P. 4476–4484. doi: 10.1093/emboj/18.16.4476.

214. Triozzi P.M. et al. Spatiotemporal cytokinin response imaging and ISOPENTENYLTRANSFERASE 3 function in Medicago nodule development // Plant Physiol. 2021. P. 1–16. doi: 10.1093/plphys/kiab447.

215. Azarakhsh M. et al. KNOTTED1-LIKE HOMEOBOX 3: A new regulator of symbiotic nodule development // J. Exp. Bot. 2015. Vol. 66, № 22. P. 7181–

7195. doi: 10.1093/jxb/erv414.

216. Dolgikh A. V., Rudaya E.S., Dolgikh E.A. Identification of bell transcription factors involved in nodule initiation and development in the legumes pisum sativum and medicago truncatula // Plants. 2020. Vol. 9, № 12. P. 1–13. doi: 10.3390/plants9121808.

217. Plet J. et al. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in Medicago truncatula // Plant J. 2011. Vol. 65, № 4. P. 622–633. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04447.x.

218. Ioio R. Dello et al. A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. 2008. № November. P. 1380–1384.

219. Moubayidin L. et al. The Rate of Cell Differentiation Controls the Arabidopsis Root Meristem Growth Phase // Curr. Biol. 2010. Vol. 20, № 12. P. 1138–1143. doi: 10.1016/j.cub.2010.05.035.

220. Bao F., Azhakanandam S., Franks R.G. SEUSS and SEUSS-LIKE transcriptional adaptors regulate floral and embryonic development in arabidopsis // Plant Physiol. 2010. Vol. 152, № 2. P. 821–836. doi: 10.1104/pp.109.146183.

221. Franks R.G., Liu Z., Fischer R.L. SEUSS and LEUNIG regulate cell proliferation, vascular development and organ polarity in Arabidopsis petals // Planta. 2006. Vol. 224, № 4. P. 801–811. doi: 10.1007/s00425-006-0264-6.

222. Gregis V. et al. AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in Arabidopsis // Plant Cell. 2006. Vol. 18, № 6. P. 1373–1382. doi: 10.1105/tpc.106.041798.

223. Sridhar V. V., Surendrarao A., Liu Z. Erratum: APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development (Development (2001) vol. 133 (3159-3166)) // Development. 2006. Vol. 133, № 17. P. 3496. doi: 10.1242/dev.02562.

224. Lee J.E. et al. SEUSS and SEUSS - LIKE 2 coordinate auxin distribution and KNOXI activity during embryogenesis // Plant J. 2014. Vol. 80, № 1. P. 122–135. doi: 10.1111/tpj.12625.

225. Zhai H. et al. SEUSS integrates transcriptional and epigenetic control of root stem cell organizer specification // EMBO J. 2020. Vol. 39, № 20. doi: 10.15252/embj.2020105047.

226. Osipova M.A. et al. WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX5 Gene

Expression and Interaction of CLE Peptides with Components of the Systemic Control Add Two Pieces to the Puzzle of Autoregulation of Nodulation 1 [ W ]. 2012. Vol. 158, № March. P. 1329–1341. doi: 10.1104/pp.111.188078.

227. Franssen H.J. et al. SCARECROW and SHORT - ROOT show an overlapping expression pattern in the Medicago truncatula nodule central meristem // The Model Legume Medicago truncatula. Wiley, 2020. P. 125–129. doi: 10.1002/9781119409144.ch14.

# ПРИЛОЖЕНИЕ

**Таблица 1.** Праймеры для получения конструкций

| | |
|---|---|
| Локализация активности промоторов | |
| pPsCE_TOPO_F | CAC CGA CCG TAC TTG AAT AAA TAT |
| PsNIN_CE_ R | AGT GAG GCA CGG GTG TAT GTG GCA AAA CCT A |
| pPsCE-GA_R | CAA CTA CTT TGG TTA TAT GTG GCA AAA CCT A |
| pPsGA_TOPO_F | CAC CTA ACC AAA GTA GTT GTC ATT |
| pPsGA_TOPO_R | GTT GCT GGT ATT AAC AAA TG |
| pPsCYC_4100_TOPO_F | CAC CCG TGC CTC ACT AAG CAA TCT |
| pPsCYC_4100_R | CCT AGC TTT TTT TCT CCT GT |
| pMtSEU_F_attB1 | AAA GCA GGC TTC TTG CAC TAA CAT TAC |
| pMtSEU_R_attB2r | AAG CTG GGT GTC TTA ACA AAC AAA T |
| Комплементация мутанта SGENod$^-$-3 (*nin-1*) | |
| attB4_PsCE_F | GAA AAG TTG GGG ACC GTA CTT GAA TAA A |
| attB1r_pPsNIN_R | GTA CAA ACT TGG CCT AGC TTT TTT TCT CCT GTA ATA G |
| pDONR_P4-P1R_attB4_F | GGG GAC AAC TTT GTA TAG AAA AGT TGG G |
| pDONR_P4-P1R_attB1r_R | GGG GAC TGC TTT TTT GTA CAA ACT TGG |
| PsNIN_ CDS_TOPO_F | CAC CAT GGA ATA TGG TGG TGG GAT |
| PsNIN_ CDS_R | CTA GGA AGA TGG ACT GCT |
| PsNLP1_m4F | GCT CTC AAG TGG ATC AAA GAG TAC ACT AAG |
| PsNIN_motif4_NLP1_R | TA TCC TTA TTC CTA ATA AGA ACG TTG TTG |
| m6PsNLP_PsNIN_F | TAG GAA TAA GGA TAT CAA CAA CGT TCT TAT |
| PsNLP1_m6R | GAA ATA TGG AAG GAG AAA CGC CTC GAG AGC ATT A |
| Конструкции для ДДС | |
| PsNIN_Finale_attB1_F | AAA GCA GGC TTC ATG GAA TAT GGT GGT GGG AT |
| PsNIN_Finale_attB2_R | AAG CTG GGT GCC TAG GAA GAT GGA CT |
| attB1_adapter | GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT C |
| attB2_adapter | GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG |
| CRISPR/Cas9-индуцированный мутагенез гена *MtSEUSS* | |
| guideMtSEU35_F | ATT GTG TAA TCG CAA ACC TGG CCG |
| guideMtSEU35_R | AAA CCG GCC AGG TTT GCG ATT ACA |
| BC-linker_F | AACATAAGCTAGGTAGTAACTAGTGCGACTGTCTAGAATCGCGTATGCGAGT |
| BC-linker_R | AGCCACTCGCATACGCGATTCTAGACAGTCGCACTAGTTACTACCTAGCTTA |
| D-stop_linker-E_F | TCA GGG TAG TCC AGA CCT AGC GAG TCG GAA GGA |
| D-stop_linker-E_R | GCA GTC CTT CCG ACT CGC TAG GTC TGG ACT A |

**Таблица 2.** Праймеры для отПЦР и рутинных ПЦР

| | |
|---|---|
| Определение мотивов NIN бобовых | |
| NIN_ m4-m6_F | TCN GTB AAA GAR AGA YTR GT |
| NIN_m4-m6_R | GCC CAW GTB GWG CTA AWG G |
| Оценка уровней экспрессии генов методом отПЦР | |
| PsUbiq F | ATG CAG ATY TTT GTG AAG AC |
| PsUbiq R | ACC ACC ACG RAG ACG GAG |
| PsSTY F | AAC TAC TTC TCA CAC TTC CA |
| PsSTY R | GCA TAC TCG TCT TTT CCA TC |
| PsFUL-like F | GCT TTT TGA ATA CTC TAG CGA |
| PsFUL-like R | GAG ACT TAA CCC ATC CAA CT |
| PsNIN F | ATG CCT TCT TCT GCT TCC GAT G |
| PsNIN R | CTT ATG GTC TTC TCC GCC TTG GT |
| PsCRE1 F | CCA ACG GGA TTA TGC TCA GAC AG |
| PsCRE1 R | CTC CCA GGA TCC CCC ATA ACA ATA |
| PsBEL1-2 F | CTC ACG GCG CCT CTC CTG |
| PsBEL1-2 R | TGA AAT ATG CTG CTG CTG CTA CTG |
| PsKNOX3 F | CAA AGC TTA ACA GGA GTT TCA CC |
| PsKNOX3 R | CTG TAG GTA TAA GAG GGC CAA ATC |
| PsCCS52a F | CAA GAC GGA GAC TCG GCA GT |
| PsCCS52a R | GCC CAG CCA ACA GAA CAA AC |
| PsWOX5 F | GGT TTC AAA ATC ATA AGG CTA GGG A |
| PsWOX5 R | TCA ACC GCA AGT CTA ATG GTG GAT G |
| PsSEUSS F | AAT GGA GGT GTG AAC AGT AA |
| PsSEUSS R | CTT GAC AAG TCC TGT TGA TG |

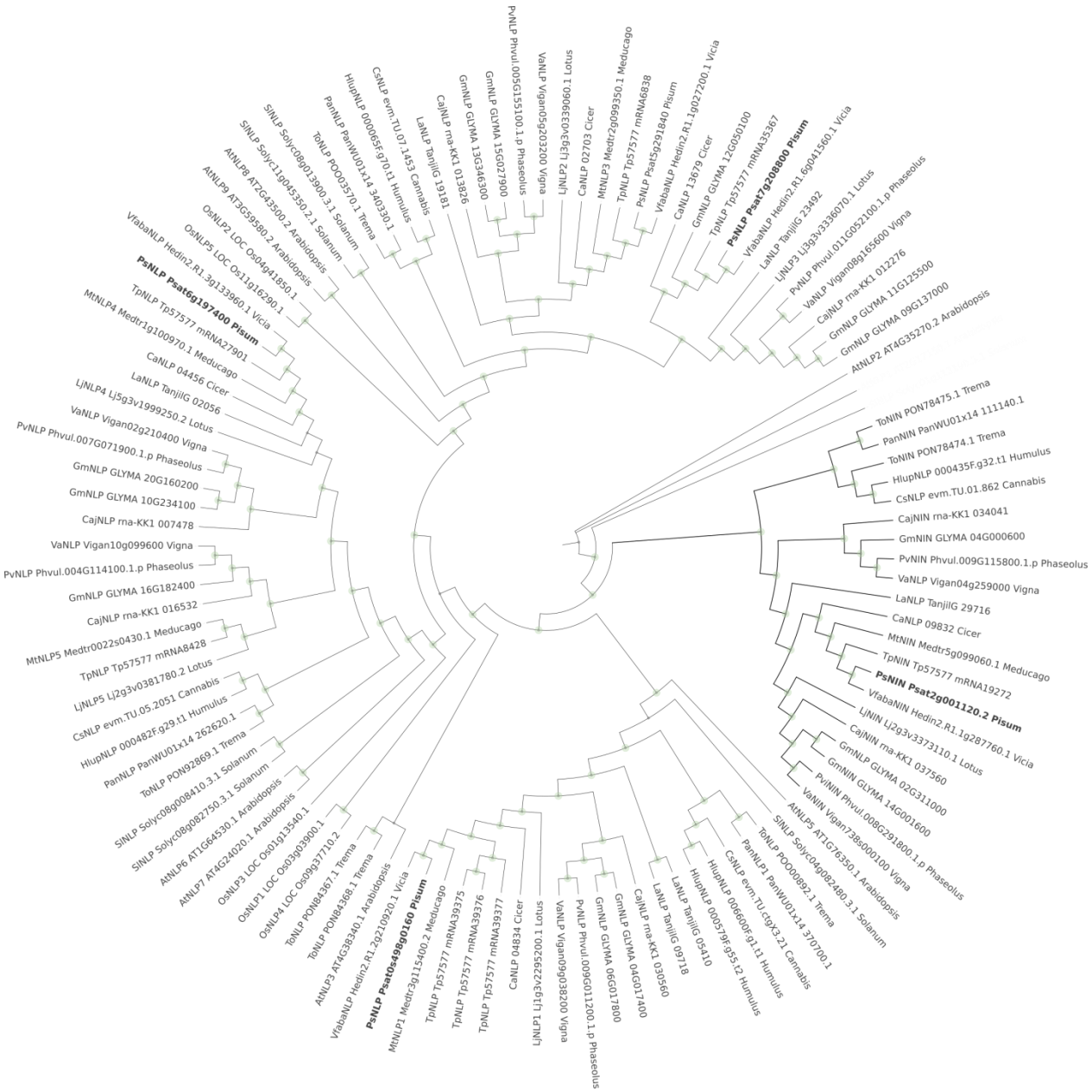


**Рисунок 1**. – Филогенетическое дерево белков семейства NLP у бобовых и растений семейства *Cannabaceae*. Дерево построено на основе множественного выравнивания алгоритмами ClastalW, методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с заданным показателем вероятностных распределений 1000. Белки NLP гороха посевного выделены жирным шрифтом. Клада, содержащая белки NIN, имеет четкие очертания.

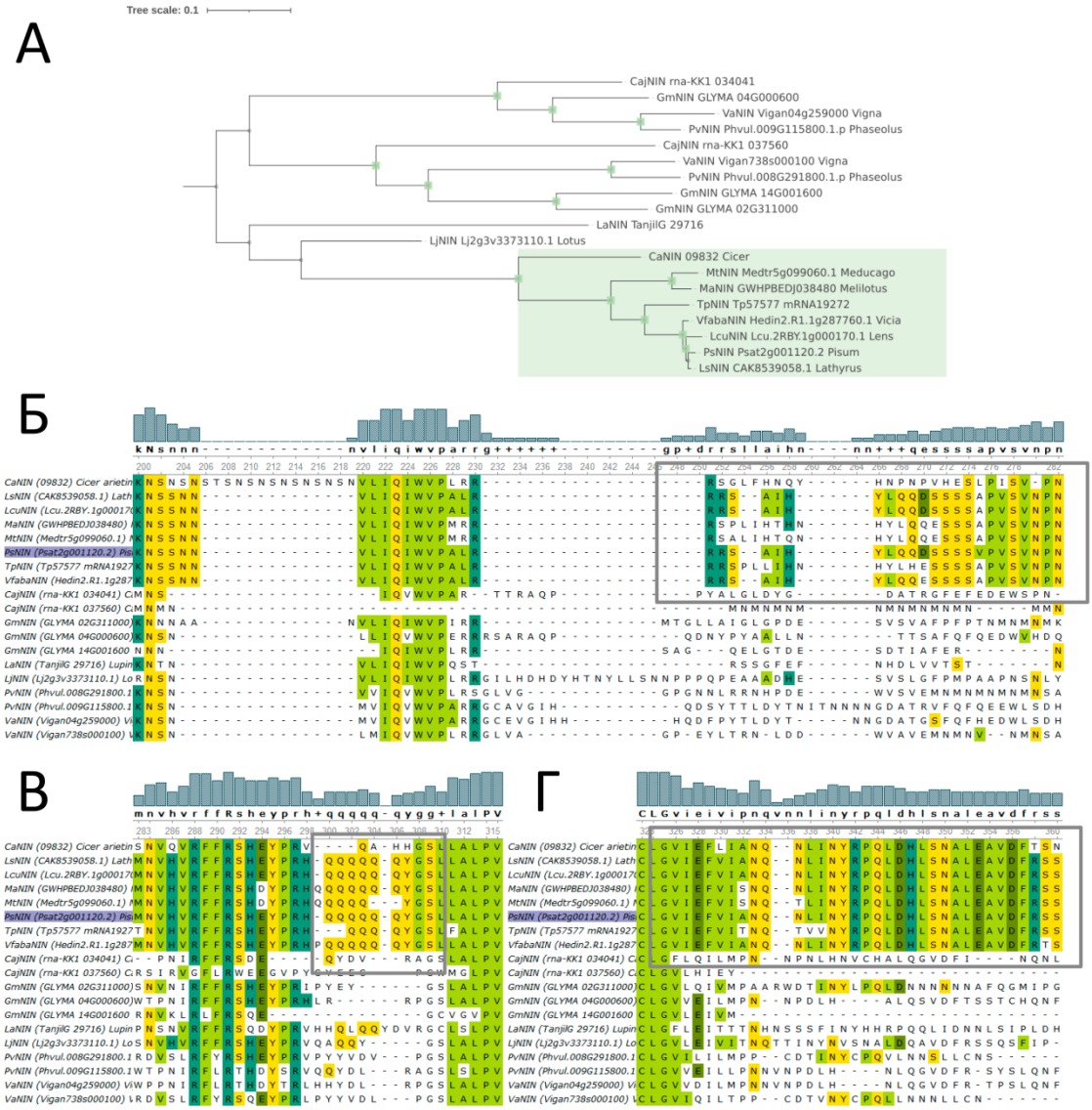


**Рисунок 2. –** А. Филогенетическое дерево белков NIN у бобовых растений. Дерево построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с заданным показателем вероятностных распределений 1000. Зеленым отмечена клада, содержащая белки NIN бобовых с недетерминированным типом клубеньков. Выравнивание последовательностей 4го (Б), 5го (В) и 6го (Г) мотивов транскрипционного фактора NIN у разных видов бобовых. Цветами обозначены аминокислоты, совпадающие с референсными (отмечено фиолетовым). За референс была взята изучаемая последовательность NIN гороха посевного.

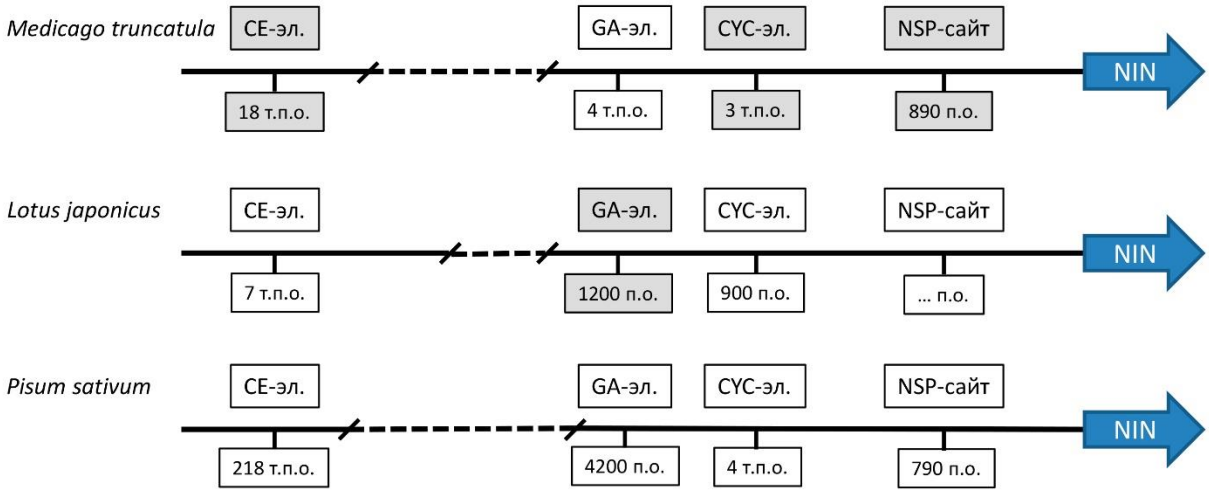


**Рисунок 3**. – Расположение промоторных элементов генов *MtNIN*, *LjNIN* и *PsNIN*. На схеме отмечен GA-box, выявленный нами в результате настоящего исследования. Серым цветом отмечены сайты, известные по литературным источникам. Белым цветом отмечены последовательности регуляторных элементов, обнаруженные в результате биоинформатического анализа в данном исследовании.

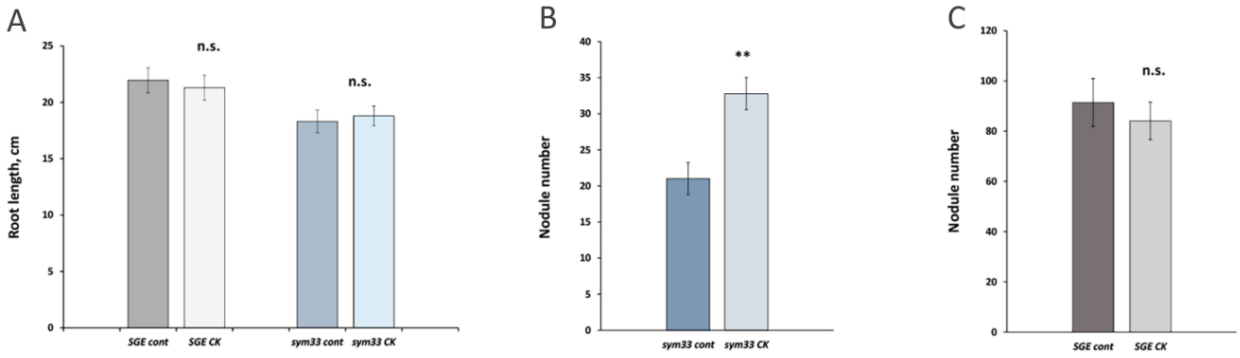


**Рисунок 4. –** Анализ длины корня (A) и количества клубеньков у мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) (B) и дикого типа SGE (C) растений через 2 недели после инокуляции *Rhizobium ruizarguesonis* CIAM1026 и обработки 10 мкм 6-БАП. На графиках показаны результаты трех независимых экспериментов (использовалось 4-5 растений на один вариант). Столбики ошибок представляют среднее значение ± SEM трех повторов. Звездочками отмечены статистически значимые различия, основанные на t-тесте Стьюдента (** $p < 0,01$).

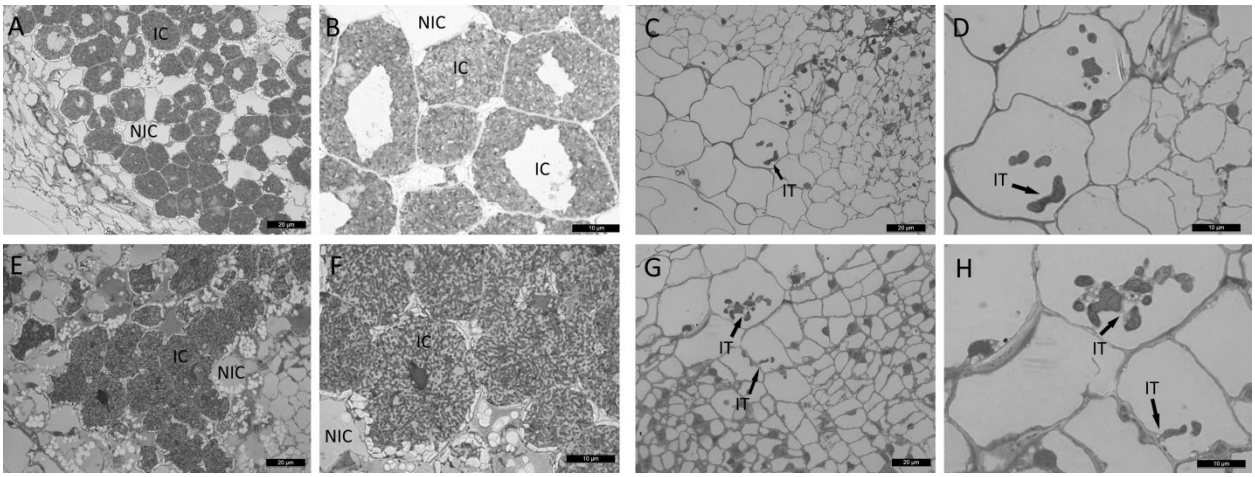


**Рисунок 5**. – Изображения световой микроскопии необработанных клубеньков дикого типа (A, B) и мутанта *ipd3/cyclops* (C, D) двухнедельной давности, обработанных 10 мкм 6-БАП (цитокинина) дикого типа (E, F) и мутанта *ipd3/cyclops* (G, H). IC – инфицированные клетки, NIC – неинфицированные клетки, IT – инфекционные нити. (A, C, E, G) изображения имеют 40-кратное увеличение. (B, D, F, H) изображения имеют 100-кратное увеличение. Стрелки указывают на нити инфекции. Линейки шкалы составляют 20 мкм (A) и 10 мкм (B).

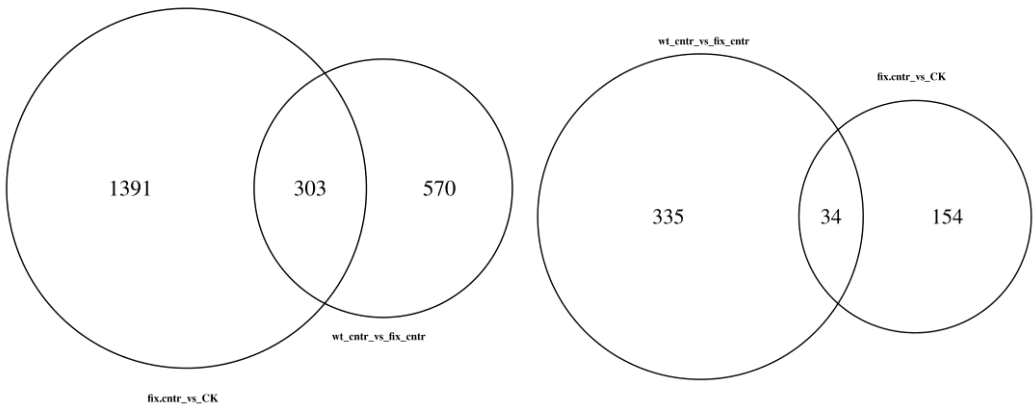


**Рисунок 6**. – Диаграммы Венна, иллюстрирующие количество генов в клубеньках мутанта SGEFix$^-$-2 (*ipd3/cyclops*) с повышающимися (A) и снижающимися (Б) показателями экспрессии в ответ на обработку цитокининами.

**Благодарности**

Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность своему научному руководителю Елене Анатольевне Долгих за чуткое руководство, оказанное доверие и оказанную возможность выполнять работу в лаборатории сигнальной регуляции ФГБНУ ВНИИСХМ.

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории сигнальной регуляции ФГБНУ ВНИИСХМ за неоценимую поддержку и помощь в проведении экспериментов. Профессионализм коллег и их преданность делу создали благоприятную атмосферу, способствующую успешной реализации научных задач.

Автор выражает благодарность сотрудникам других лабораторий ФГБНУ ВНИСХМ за готовность делиться опытом и предоставить помощь в сложных ситуациях, а также сотрудникам и преподавателям кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ за мудрые советы и помощь в выборе места научной работы.