

На правах рукописи



Журавлев Игорь Юрьевич

**Ген *PsLysX* как мишень для геномного редактирования и маркер специфичности
симбиоза гороха с клубеньковыми бактериями**

1.5.7. Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Жуков Владимир Александрович

Федеральная территория «Сириус»

2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Горох посевной (<i>Pisum sativum</i> L.) – модельный объект генетики	12
1.2. Горох в эпоху CRISPR/Cas9	16
1.2.1. Первый успех в редактировании генома гороха технологией CRISPR/Cas9.....	17
1.2.2. CRISPR/Cas9 для улучшения вкусовых качеств семян гороха	18
1.2.3. Прививка на подвой как оптимизация укоренения гороха при CRISPR/Cas9– редактировании	21
1.2.4. От классического CRISPR/Cas9 к точному редактированию генома гороха	22
1.2.5. Способы доставки компонентов геномного редактирования в клетки растений ..	24
1.3. Симбиоз как адаптация растений к прикрепленному образу жизни	26
1.3.1. Основные этапы формирования бобово-ризобияльного симбиоза.....	28
1.3.2. Специфичность бобово-ризобияльного симбиоза у гороха.....	32
1.3.3. Ген <i>PsLykX</i> : структура и функции	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1. Материалы	37
2.1.1. Растительный материал	37
2.1.2. Условия культивирования растительного материала	38
2.1.3. Бактериальный материал	40
2.1.4. Условия культивирования бактериального материала	42
2.1.5. Приборы и принадлежности	42
2.2. Методы	44
2.2.1. Методы генетической инженерии.....	44
2.2.2. Молекулярно-генетические методы.....	49
2.2.3. Выделение и первичный отбор аборигенных штаммов клубеньковых бактерий, совместимых с горохом афганского симбиотического типа	53
2.2.4. Статистическая обработка результатов.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	56
3.1. Определение роли гена <i>PsLykX</i> в бобово-ризобияльном симбиозе с использованием метода CRISPR/Cas9	56
3.1.1. Влияние нокаута <i>PsLykX</i> на клубенькообразование	56
3.1.2. Обсуждение функциональной роли <i>PsLykX</i> как рецепторного компонента симбиоза	59
3.2. Ген <i>PsLykX</i> как молекулярный маркер	60

3.2.1. Разработка маркера для идентификации высокоспецифичной аллели <i>PsLykX^A</i> ...	60
3.2.2. Апробация CAPS-маркера на контрастных генотипах и популяции F ₂ (Frisson × NGB2150).....	62
3.3. Аллель <i>PsLykX^A</i> как фактор избирательного взаимодействия гороха с клубеньковыми бактериями.....	66
3.3.1. Характеристика линии A33.18 как модели для изучения афганского типа специфичности.....	66
3.3.2. Оценка клубенькообразования у линии A33.18 и контрольных генотипов при инокуляции различными штаммами ризобий.....	68
3.3.3. Конкурентное заселение клубеньков линии A33.18 инокулятом.....	70
3.3.4. Обсуждение роли <i>PsLykX</i> в управлении составом симбиотической микробиоты ..	74
3.4. Выделение новых эффективных аборигенных штаммов клубеньковых бактерий из почв России.....	76
3.4.1. Использование линии NGB2150 как селективной системы для выделения аборигенных клубеньковых бактерий.....	76
3.4.2. Оценка симбиотической эффективности выделенных штаммов	78
3.5. Обсуждение результатов.....	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ.....	86
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	87
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	89
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Пищевая ценность и химический состав гороха	97
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Характеристика трансформированных и контрольных корней.....	101
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Анализ эффективности редактирования CRISPR/Cas9	103
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. ПЦР-анализ идентификации гена <i>nodX</i> у выделенных штаммов клубеньковых бактерий.....	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является значимой продовольственной культурой и важным элементом севооборотов благодаря способности улучшать азотный режим агроэкосистем за счет биологической фиксации азота (далее – БФА) [1]. По данным FAOSTAT, Россия является мировым лидером среди производителей сухого гороха, продолжая наращивать экспорт, который в 2024 г. составил 2,29 тыс. т [2].

Стабилизация высокой продуктивности культуры при одновременном снижении зависимости от вносимого минерального азота является необходимостью современного растениеводства. Биологическая фиксация азота при симбиозе бобовых растений с клубеньковыми бактериями рассматривается как экологически дружелюбная альтернатива вносимому минеральному азоту, способная уменьшать потребность в удобрениях [1,3]. Однако практическая реализация потенциала БФА в агроценозах ограничена тем, что эффективность бобово-ризобияльного симбиоза в поле определяется не только способностью формировать азотфиксирующие клубеньки на корнях растения, но и конкурентным взаимодействием между бактериями, заселяющими клубеньки [4–6]. В естественных почвах растение почти всегда взаимодействует с несколькими совместимыми штаммами ризобий, и победа в конкурентной колонизации корня не гарантирует максимальной эффективности азотфиксации [6]. На практике штаммы биопрепаратов нередко проигрывают конкуренцию за заселение клубеньков аборигенным штаммам почвы, которые могут иметь более низкую нитрогеназную активность, но лучше адаптированы к локальным условиям и потому более конкурентоспособны [7]. Следовательно, для возделывания гороха актуальны решения, которые усиливают «партнерский отбор» со стороны растения и позволяют целенаправленно закрепить в клубеньках высокоэффективный штамм из биопрепарата.

Наглядной природной моделью специфичности бобово-ризобияльного симбиоза являются описанные несколько десятилетий назад «европейские» и «афганские» симбиотические фенотипы гороха, различающихся успехом взаимодействия со штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* в зависимости от наличия у бактерий гена *nodX* (так называемые штаммы NodX+) и, соответственно, специфической модификации бактериальной сигнальной молекулы – Nod-фактора. Показано, что рецептор, представленный описанной аллелью гена *Sym2^A* у «афганского» гороха блокирует инфекционный процесс на уровне эпидермиса, если бактерия не синтезирует Nod-фактор с ацетильной группой (присоединение которой контролируется геном *nodX*) на восстанавливающем конце молекулы [8–10].

Развитие темы специфичности бобово-ризобияльного симбиоза связано с уточнением растительной стороны системы распознавания симбионтов. Поскольку восприятие Nod-фактора осуществляется LysM-рецептороподобными киназами (LysM-RLK) и их комплексами, ген *Sym2* долго рассматривался как вероятный представитель этого класса, но оставался неидентифицированным на уровне конкретной последовательности [8,11–13]. Ранее обнаруженные у гороха гены-кандидаты на роль *Sym2* – *PsSym37* и *PsK1*, кодирующие рецепторные киназы из семейства LysM-RLK, не продемонстрировали связи с проявлением «афганского» фенотипа [14,15]. Существенный прогресс внесло обнаружение гена *PsLykX* в геномной области *Sym2*, который демонстрирует закономерности полиморфизма аллелей, согласующиеся с различиями по специфичности выбора бактерии-симбионта [16,17]. Важно, что при накоплении ассоциативных и геномных данных, вопрос равенства *PsLykX*=*Sym2* и перевод описанной тождественности в доказанную причинность остается задачей функциональной верификации – точечным редактированием выявленного гена.

В совокупности вышеописанное формирует актуальность диссертационного исследования: сочетание «защитного» аллельного варианта *PsLykX^A* у растения и целевых высокоэффективных NodX⁺ штаммов, адаптированных к почвам РФ, должно стать принципом создания микробно-растительных систем, где биопрепараты нового поколения для инокуляции сортов гороха с управляемой специфичностью минимизируют «перехват» клубеньков аборигенными (часто более конкурентными, но менее эффективными по азотфиксации) клубеньковыми бактериями. В данном контексте афганский аллельный вариант гена *Sym2^A* становится генетическим рычагом, позволяющим искусственно повысить барьер входа для большинства местных штаммов и тем самым сделать результат инокуляции предсказуемым, улучшив азотное питание растения.

Степень разработанности темы

Исследования, посвященные управлению специфичностью бобово-ризобияльного симбиоза у гороха посевного (*Pisum sativum* L.), имеют достаточный объем накопленных данных о молекулярных механизмах взаимодействия растений и клубеньковых бактерий, при одновременном наличии пробелов в понимании генетического контроля. Установлено, что формирование симбиоза инициируется выделением корнями растения сигнальных молекул (флавоноидов и изофлавоноидов), которые активируют *nod*-гены бактерий, контролирующие синтез Nod-факторов, представляющих собой липохитоолигосахариды, структура которых варьирует в зависимости от штамма ризобий [10,18]. Восприятие Nod-факторов со стороны растения осуществляется рецепторными киназами с LysM-доменами, локализованными в мембране клеток корня, что запускает сигнальные каскады, приводящие к формированию клубеньков [12,13]. У различных модельных культур из семейства Бобовые, включая *Medicago*

truncatula Gaertn. и *Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen, идентифицированы ключевые гены–рецепторы: *MtLYK3/MtNFP* (*Mt* – *Medicago truncatula*), *LjNFR1/LjNFR5* (*Lj* – *Lotus japonicus*) [19,20]. У гороха значительное внимание уделено генетическому локусу I группы сцепления, содержащему ген *Sym2*, который контролирует суженную специфичность симбиоза [11,21]. Показано, что генотипы гороха, происходящие из Афганистана, формируют клубеньки исключительно с ризобиями, имеющими ген *nodX*, который кодирует фермент ацетилтрансферазу, обеспечивающую специфическую модификацию молекулы Nod-фактора [10,18]. В то же время формы гороха из Европы характеризуются более широкой совместимостью, вступая в симбиоз с большим кругом бактерий в почве вне зависимости от наличия или отсутствия ацетильной группы на редуцирующем конце хитинового остова Nod-фактора. Несмотря на длительную историю изучения данного феномена, молекулярная природа гена *Sym2* оставалась неясной [8,11]. Современные геномные и функциональные исследования указывают на то, что геном-кандидатом *Sym2* является *PsLykX*, кодирующий LysM-рецепторную киназу, однако прямые доказательства его роли в контроле специфичности симбиоза требуют дополнительной экспериментальной верификации [16,22]. Новые возможности для функционального анализа генов, вовлеченных в симбиотические взаимодействия, открыло внедрение технологии для геномного редактирования растений – CRISPR/Cas9.

Таким образом, несмотря на значительный объем фундаментальных исследований в области бобово-ризобияльного симбиоза, вопросы молекулярной природы специфичности взаимодействия, роли отдельных рецепторных белков, включая *PsLykX*, практического применения геномного редактирования для управления специфичностью бобово-ризобияльного симбиоза, а также необходимости экспериментальной проверки в полевых условиях способности аллельных вариантов *PsLykX* обеспечивать преимущественное образование клубеньков целевым штаммом-инокулянтom в присутствии конкурентной аборигенной почвенной микробиоты, остаются недостаточно исследованными.

Цель и задачи диссертационного исследования

Целью диссертационной работы являлось изучение возможности управления специфичностью симбиоза гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с клубеньковыми бактериями за счет использования разных аллельных состояний гена *PsLykX*, а также исследование роли данного гена в симбиозе при помощи подходов геномного редактирования.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Реализовать CRISPR/Cas9-редактирование гена *PsLykX* в системе композитных растений гороха и оценить влияние индуцированных мутаций на формирование симбиотических клубеньков.

2. Охарактеризовать интрогрессионную линию A33.18 по составу фрагмента, унаследованного от афганского генотипа NGB2150, и определить ее симбиотический фенотип.
3. Исследовать влияние аллели *PsLykX*^A на клубенькообразование при взаимодействии гороха с NodX⁺ и NodX[–] штаммами клубеньковых бактерий в контролируемых и полевых условиях.
4. Разработать и апробировать молекулярный маркер для идентификации аллельных вариантов *PsLykX*, связанных с высокой специфичностью бобово-ризобияльного симбиоза.
5. Оценить возможность использования высокоспецифичных генотипов гороха как селективной системы для выделения из почв Российской Федерации аборигенных штаммов клубеньковых бактерий, совместимых с аллелью *PsLykX*^A.

Научная новизна

Научная новизна диссертационного исследования заключается в установлении роли гена *PsLykX* как функционально значимого компонента, определяющего специфичность симбиоза гороха с клубеньковыми бактериями, а также в обосновании его использования в качестве мишени геномного редактирования и молекулярного маркера для селекционной практики.

В работе впервые получены экспериментальные данные, показывающие, что направленный нокаут гена *PsLykX*, выполненный с использованием системы CRISPR/Cas9 в композитных растениях с «бородатыми корнями» («hairy roots»), приводит к утрате способности редактированных корней к образованию симбиотических клубеньков, что подтверждает ключевую роль *PsLykX* в реализации ранних этапов бобово-ризобияльного симбиоза у гороха.

Впервые показано, что аллельное состояние гена *PsLykX* связано с избирательностью взаимодействия гороха со штаммами клубеньковых бактерий, различающимися по структуре Nod-факторов. Установлено, что генотипы, несущие аллель *PsLykX*^A, ассоциированную с повышенной специфичностью, обеспечивают преимущественное формирование клубеньков целевыми штаммами и ограничивают участие аборигенной почвенной микробиоты.

Научная новизна работы включает в себя разработанный молекулярно-генетический CAPS-маркер для идентификации аллельного варианта *PsLykX*, связанного с повышенной специфичностью симбиоза, что подтверждает прикладную значимость диссертационного исследования для маркер-ассоциированной селекции гороха.

Таким образом, в диссертации сформировано новое представление о гене *PsLykX* как о двойном объекте применения: с одной стороны, как о мишени для геномного редактирования в целях направленного изменения специфичности бобово-ризобияльного симбиоза, с другой – как

о маркере для отбора генотипов гороха с заданной специфичностью взаимодействия с клубеньковыми бактериями.

Полученные результаты диссертационного исследования расширяют современные представления о генетическом контроле бобово-ризобияльного симбиоза и создают основу для разработки подходов к управлению его эффективностью.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы определяется расширением представлений о генетическом контроле специфичности симбиоза гороха с клубеньковыми бактериями. В диссертации уточнена роль гена *PsLykX* как одного из ключевых компонентов, участвующих в распознавании симбиотического партнера и формировании клубеньков. Показано, что направленный нокаут гена *PsLykX* в трансформированных корнях гороха, полученных в системе «hairy roots», приводит к отсутствию клубеньков [23]. Эти данные служат прямым функциональным подтверждением значимости гена *PsLykX* для инициации и развития симбиоза.

Теоретическая значимость работы также связана с подтверждением роли аллельного состояния *PsLykX* в определении специфичности взаимодействия гороха со штаммами ризобий. Установлено, что наличие «афганской» аллели *PsLykX^A* у интрогрессионной линии A33.18 в геномном окружении европейского сорта Rondo обеспечивает преимущественное заселение клубеньков штаммами с фенотипом NodX⁺ и ограничивает участие аборигенной почвенной микробиоты. Так, при инокуляции штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* TOM более 95% клубеньков линии A33.18 были заселены бактериями именно этого штамма, тогда как у европейского сорта Rondo этот показатель был менее 8% [24]. Полученные результаты подтверждают модель специфического взаимодействия типа «ключ-замок» в системе *PsLykX-nodX* и уточняют представления о конкуренции штаммов при формировании симбиоза.

Практическая значимость работы состоит в обосновании того, что ген *PsLykX* является перспективной мишенью для геномного редактирования и может быть использован как молекулярный маркер для селекционной работы. По результатам исследования разработан и запатентован молекулярно-генетический CAPS-маркер [25], позволяющий идентифицировать аллельный вариант *PsLykX*, связанный с повышенной специфичностью симбиоза, что подтверждает прикладной характер полученных результатов и возможность их использования в маркер-ассоциированной селекции гороха.

Практическая значимость работы также заключается в том, что полученные данные создают основу для разработки подходов к управлению специфичностью симбиоза гороха с клубеньковыми бактериями. Использование аллелей *PsLykX* с заданными свойствами в сочетании с подбором эффективных штаммов ризобий может быть использовано при создании сортов гороха, ориентированных на более избирательное и эффективное взаимодействие с

инокулянтами. При этом показано, что высокая специфичность должна сочетаться с высокой азотфиксирующей активностью штамма, иначе практический эффект от такой селекции может быть ограничен.

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на комплексном изучении гена *PsLykX* как фактора, определяющего специфичность симбиоза гороха (*Pisum sativum* L.) с клубеньковыми бактериями, а также как мишени геномного редактирования и молекулярного маркера. В работе использованы подходы молекулярной генетики, геномного редактирования, сравнительного геномного анализа, фенотипической оценки симбиоза и маркерного анализа.

Экспериментальная часть включала функциональное исследование гена *PsLykX* в системе композитных растений, полученных с использованием трансформации *Agrobacterium rhizogenes*. Направленный нокаут гена *PsLykX* осуществляли с применением технологии CRISPR/Cas9. Полученные мутации подтверждали методами ПЦР и секвенирования. Функциональную значимость гена оценивали по способности трансформированных корней образовывать симбиотические клубеньки после инокуляции штаммами ризобий.

Для изучения роли аллельного состояния *PsLykX* в контроле специфичности симбиоза использовали интрогрессионную линию гороха A33.18, несущую высокоспецифичную «афганскую» аллель *PsLykX^A* в геномном окружении европейского сорта Rondo. Проводили сравнительный анализ геномного участка, связанного со специфичностью симбиоза, включая выявление однонуклеотидных полиморфизмов. Фенотипическую оценку выполняли в лабораторных и полевых опытах по показателям клубенькообразования и конкурентного заселения клубеньков различными штаммами клубеньковых бактерий.

В работе также применяли молекулярно-генетические маркеры типа CAPS. Они использовались для анализа бактериального состава клубеньков. Важной частью исследования стала разработка и апробация собственного CAPS-маркера для выявления высокоспецифичной аллели *PsLykX*, имеющей прикладное значение для селекции гороха. Новизна и практическая значимость этого решения подтверждены патентом на изобретение [25].

Теоретическая часть исследования основана на анализе современных представлений о генетическом контроле бобово-ризобиального симбиоза, о роли рецепторов Nod-факторов в распознавании симбиотического партнера, а также о возможностях применения технологии CRISPR/Cas9 для функционального анализа и направленного изменения генов гороха. Такой подход позволил объединить фундаментальное изучение функции *PsLykX* с решением прикладных задач, связанных с управлением специфичностью симбиоза и использованием молекулярных маркеров в селекции.

Личный вклад

Представленные в работе результаты получены при непосредственном участии автора. В частности, выполнен основной объем работ по теме диссертации, включая: анализ литературы; постановку и проведение экспериментов, функциональное исследование гена *PsLykX* с использованием системы CRISPR/Cas9; участие в опытах по инокуляции гороха штаммами клубеньковых бактерий и оценке клубенькообразования; выделение аборигенных штаммов клубеньковых бактерий; участие в разработке и апробации запатентованного молекулярно-генетического CAPS-маркера для идентификации аллельного варианта *PsLykX*; анализ и интерпретацию полученных результатов; подготовку публикаций, положенных в основу диссертационной работы.

Положения, выносимые на защиту

1. Ген гороха *PsLykX* является ключевым симбиотическим геном, определяющим способность к клубенькообразованию.
2. Система «ключ-замок» *PsLykX-nodX*, основанная на распознавании структуры Nod-фактора рецепторным комплексом растения, включающим белок PsLykX, позволяет управлять специфичностью в полевых условиях.
3. В почвах РФ присутствуют штаммы клубеньковых бактерий, сочетающие в себе признаки высокой специфичности и высокой эффективности азотфиксации, которые можно использовать для создания биопрепаратов, пригодных для инокуляции сортов гороха, защищенных от проникновения аборигенных штаммов «афганским» аллельным вариантом гена *PsLykX*.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Тема диссертации, цели и задачи исследования, публикации по работе и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют заявленной специальности «1.5.7. Генетика», и соответствуют направлениям исследований 14. «Генетические основы биотехнологии. Генетическая и клеточная инженерия. Генетически модифицированные организмы. Трансгенные организмы. Химерные организмы» и 15. «Симбиогенетика» паспорта научной специальности 1.5.7. «Генетика» (отрасль науки – биологические, медицинские), группе специальностей 1.5. «Биологические науки».

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы работы включены в отчет по научным задачам проекта «Сужение специфичности взаимодействия микробов и растений за счет обмена сигналами» университета «Сириус». Результаты исследований представлены на международных конференциях: PlantGen 2023 (Казань, 10–15 июля 2023), Конгресс исследователей симбиотических систем (Москва, 6–

11 октября 2025), форум «Сириус.ТехноГенетика» (ФТ Сириус, 10–14 ноября 2025), а также опубликованы в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science/Scopus (в т.ч. входящих в перечень ВАК): из них – две опубликованы в журналах первого квартиля (Q1) [23,24,26], а также получен патент на изобретение №2815453 [25]. Список публикаций по теме исследования представлен в одноименном разделе (с. 87).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 96 страницах машинописного текста, содержит 26 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 181 источник и 4 приложения. Диссертация состоит из введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы», главы «Результаты и обсуждения», заключения, выводов, списка публикаций по теме диссертации, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю В.А. Жукову за руководство работой, поддержку и ценные научные консультации.

Автор искренне благодарит сотрудников лаборатории № 9 «Генетики растительно-микробных взаимодействий» ФГБНУ ВНИИСХМ: А.И. Жернакова, А.С. Сулиму, Г.А. Ахтемову и Л.Е. Дворянинову за помощь в проведении исследований, и освоении экспериментальных подходов.

Большая благодарность выражается профессорам кафедры генетики СПбГУ Л.А. Лутовой и И.А. Тихоновичу, а также сотрудникам кафедры А.Г. Матвеевко и М.А. Лебедевой за научные консультации, методическую и профессиональную помощь.

Автор благодарит руководителя направления «Биологии и биотехнологии растений» НТУ «Сириус» Е.К. Хлесткину за предоставленную возможность выполнения работы внутри направления, а также сотрудников университета: В.Ю. Симонову, А.А. Ляховца, Л.А. Субханова, Е.А. Алексееву, Е.И. Герееву, А.В. Ряполову, М.С. Торопко за организационную и личную поддержку на разных этапах выполнения диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – модельный объект генетики

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является одной из древнейших культур, одомашненной на Ближнем Востоке примерно 10 тыс. лет назад [27,28]. Первичный ареал происхождения и раннего возделывания гороха связывают со Средиземноморьем, Юго-Западной и Центральной Азией, откуда культура постепенно распространилась в Европу, Северную Африку и другие регионы [28,29]. В настоящее время горох возделывается преимущественно в зонах умеренного климата по всему миру, а многовековая селекция привела к формированию большого разнообразия культурных форм и сортов. В современном земледелии горох используется как зернобобовая, овощная и кормовая культура [30]. Семена гороха богаты растительным белком (20,5 г), углеводами (49,5 г), пищевыми волокнами (11,2 г), а также содержат относительно небольшие доли жиров (2 г), минеральных веществ и витаминов (витамины группы В, Калий, Si, Co). Энергетическая ценность семян гороха составляет в среднем 298 Ккал (Приложение А) [31,32].

Биологически горох представляет собой однолетнее травянистое растение семейства Бобовые (Fabaceae) [29,33]. Для него характерны стержневая корневая система, полегающий или прямостоячий стебель, сложные листья с усиками, обоеполые цветки и плод типа боб [33]. Горох является преимущественно самоопыляющейся культурой (опыление в большинстве случаев происходит в пределах одного цветка), что облегчает получение генетически однородных линий и фиксацию ценных аллельных комбинаций в селекции [29,33,34]. В существующих коллекциях рода *Pisum* сохраняется значительное генетическое разнообразие, включающее культурные формы, местные сорта, дикие родственные формы. Помимо культурного гороха *P. sativum*, род включает дикорастущий вид *P. fulvum*, распространенный в странах Восточного Средиземноморья, культурный *P. abyssinicum* из Йемена и Эфиопии, а также комплекс дикорастущих и культурных форм *P. sativum* в широком смысле, включая *P. sativum* subsp. *Elatius* [30,34]. К числу крупнейших мировых коллекций генетических ресурсов гороха относятся коллекции Франции, Австралии и России. Так, российская коллекция, сохраняемая во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), насчитывает более 6,8 тыс. образцов из 93 стран [33,35,36].

Горох обладает высокой агрономической ценностью благодаря способности вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium leguminosarum*, фиксирующими

атмосферный азот и тем самым снижающими потребность растений в минеральных азотных удобрениях [3,5,7]. В результате такого взаимодействия на корнях формируются специализированные органы – клубеньки, в которых ризобии переходят к симбиотическому образу жизни и осуществляют восстановление молекулярного азота атмосферы до доступных для растения соединений аммония [37–39]. Это обеспечивает горох дополнительным источником азотного питания и, в целом, улучшает азотный баланс почвы [4,40]. Однако симбиотические связи гороха не ограничиваются только клубеньковым симбиозом с ризобиями. Важную роль в его развитии играет также арбускулярная микориза – взаимовыгодное взаимодействие корней с грибами отдела *Glomeromycota* [41]. Микоризные грибы улучшают поглощение фосфора, воды и ряда микроэлементов, а также повышают устойчивость растений к абиотическим стрессам [42]. Для бобовых культур, в том числе для гороха, особенно важно, что клубеньковый симбиоз и арбускулярная микориза тесно связаны между собой на уровне сигнальных путей и частично используют общие генетические механизмы раннего распознавания симбиотического партнера [43–45]. Кроме того, корневая система гороха взаимодействует с широким кругом ризосферных микроорганизмов, включая ассоциативные и эндофитные бактерии, способные стимулировать рост растений [46,47]. Такие микроорганизмы могут улучшать минеральное питание, синтезировать фитогормоны, повышать устойчивость к патогенам и косвенно влиять на эффективность клубенькообразования [48]. Таким образом, горох следует рассматривать как растение, включенное в сложную систему полезных симбиотических и ассоциативных взаимодействий, среди которых особое место занимает именно бобово-ризобиальный симбиоз как основной механизм биологической азотфиксации [47,49].

К настоящему времени, у гороха описаны многочисленные симбиотические мутанты и гены, контролирующие распознавание ризобий, инфекционный процесс, органогенез клубенька и регуляцию азотфиксации [14,50–53]. Важную роль в ранних этапах симбиоза играют рецепторные киназы с LysM-доменами растений, воспринимающие Nod-факторы (Nodulation factors) бактерий. Для гороха особый интерес представляет система специфичности, основанная на гене *Sym2* (**S**ymbiotic **g**ene **2**), изученным методами классической генетики, которому, по современным данным, соответствует ген *PsLykX* (*Pisum sativum* **L**ysM-**R**eceptor **k**inase **eX**clusive) [16,17,21]. Известно, что предсказанный вариант белка, который кодируется геном *Sym2^A* (**S**ymbiotic **g**ene **2** **A**fghan) и соответствующий аллели *PsLykX^A* у форм афганского происхождения ограничивает клубенькообразование со штаммами *Rh. leguminosarum* bv. *viciae*, не несущими ген *nodX*. Наличие гена *nodX*, кодирующего ацетилтрансферазу, у клубеньковых бактерий изменяет структуру Nod-фактора, добавляя ацетильную группу на редуцирующий конец молекулы, что позволяет преодолеть барьер несовместимости с генотипами *Sym2^A*. Примечательно, что штаммы бактерий европейских почв в большинстве случаев не имеют гена *nodX*, а значит не вступают в

симбиоз с афганскими генотипами гороха, имеющими аллель *Sym2^A*, тогда как современные коммерческие сорта гороха с аллельным вариантом *Sym2^E* (**S**ymbiotic **g**ene **2** **E**uropean), соответствующим аллели *PsLykX^E* не имеют ограничений в специфичности симбиоза, и образующиеся клубеньки могут быть заселены ризобиями, совместимыми с горохом, вне зависимости от наличия у них гена *nodX* (рисунок 1.1) [8,10,11,18].

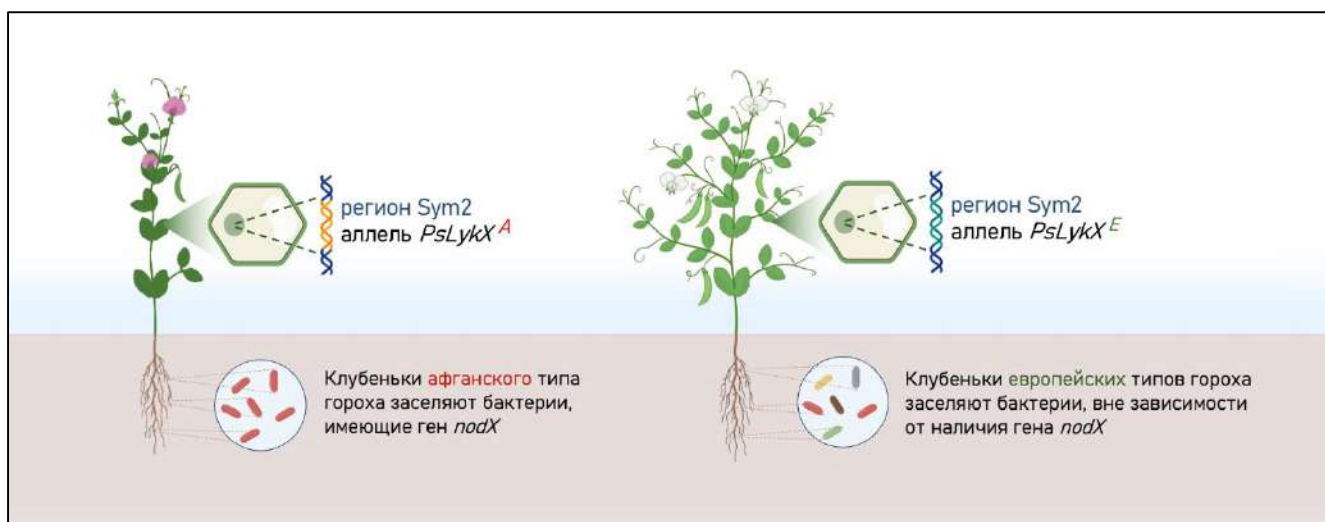


Рисунок 1.1 – Схема, демонстрирующая принципиальную разницу взаимодействия разных симбиотических фенотипов гороха с клубеньковыми бактериями: слева – афганский симбиотический фенотип, проявляющий суженную специфичность взаимодействия только с клубеньковыми бактериями, имеющими ген *nodX*; справа европейский симбиотический фенотип, вступающий в симбиоз с широким пулом клубеньковых бактерий, вне зависимости от наличия гена *nodX*

Особое значение горох имеет как классический модельный объект генетики. Именно на горохе Г. Мендель установил основные закономерности наследования признаков, а сам вид оказался особенно удобным для генетического анализа благодаря преимущественному самоопылению, и хорошо различимым морфологическим признакам [33,34]. Геном гороха включает 7 хромосом ($2n = 14$), имеет размер около 4,45 Гб и характеризуется исключительно высокой долей (> 85%) повторяющихся последовательностей, что долгое время затрудняло его секвенирование и качественную сборку [54].

Ситуация принципиально изменилась после публикации первой аннотированной сборки генома сорта Caméor в 2019 году [55]. Сборка уровня целых хромосом v1a охватила 3,92 Гб, включила около 44,8 тыс. белок-кодирующих генов, а также создала основу для перехода от классической генетики и маркерного картирования к поиску кандидатных генов и геномно-ассоциированным исследованиям [55].

Дальнейшее развитие геномики гороха связано с сборкой генома сорта Zhongwan 6 (PeaZW6) на основе длинных прочтений (long-read), опубликованной в 2022 году [56]. Эта работа, основанная на сочетании методов PacBio SMRT, 10x Genomics, Bionano, Hi-C и Illumina, существенно повысила непрерывность и точность сборки: показатель непрерывности сборки N50 для контигов (contig N50) достиг 8,98 Мб, почти вся последовательность (97,96%) была закреплена за хромосомами, число неопределенных участков резко сократилось с 760,8 Мб в Caméor до 10,3 Мб в PeaZW6, а построение пангенома показало, что одной референсной последовательности недостаточно для описания генетического разнообразия вида. Параллельно была сформирована база данных – Pea Genome Database, сделавшая эти данные доступными в удобном для работы загружаемых наборов последовательностей формате JBrowse, BLAST [56,57].

Следующий этап отражен в работах 2024–2025 гг.: в 2024 году в журнале *Nature Genetics* был опубликован еще один геномный ресурс – сборка элитного овощного сорта Zhewan No. 1 (PeaZW1). Здесь работа была сразу связана с прикладной генетикой: на основе данных ресеквенирования 314 образцов авторы получили карту вариаций, выявили 235 кандидатных локусов для 57 хозяйственно ценных признаков и построили экспрессионный атлас по 22 тканям [58]. Наконец, работа 2025 года показала следующий уровень использования этих ресурсов: на основе ресеквенирования 697 образцов *Pisum* была построена карта вариаций, включающая 154,8 млн высококачественных SNP относительно сборок ZW6 и Caméor v1a. Это позволило уточнить молекулярную природу классических менделевских признаков и продемонстрировало, что современные сборки генома гороха являются не только справочными последовательностями, но уже и платформой для анализа эволюции, аллельного разнообразия и селекционно-значимых признаков [54].

Таким образом, горох сочетает признаки важной сельскохозяйственной культуры и классического модельного объекта генетики. Его агрономическая значимость определяется высоким содержанием растительного белка, способностью к симбиотической азотфиксации и ролью в устойчивых севооборотах, тогда как научная ценность связана с исторической ролью в становлении менделевской генетики, наличием больших коллекционных ресурсов и современных геномных инструментов. Значение гороха как модельного объекта определяется наличием нескольких высококачественных референсных сборок, пангеномных ресурсов и открытых специализированных баз данных, что делает возможными сравнительную геномику, полногеномный поиск ассоциаций (GWAS – genome-wide association studies), транскриптомный анализ, поиск генов-кандидатов и целевое редактирование генома [59,60].

1.2. Горох в эпоху CRISPR/Cas9

Переход от гороха как классического объекта генетики к гороху как объекту геномного редактирования отражает современный этап развития молекулярной биологии растений. Развитие методов генетической инженерии и трансгенеза создало основу для появления технологий направленного редактирования генома, позволяющих целенаправленно изменять отдельные участки ДНК [61,62]. Так, появление системы CRISPR/Cas9 сделало возможным не только картирование признаков и поиск генов-кандидатов, но и прямую функциональную проверку роли конкретных генов.

Технология CRISPR/Cas9, основанная на механизмах бактериального адаптивного иммунитета, позволяет вносить направленные изменения в геном с помощью нуклеазы Cas9 и направляющей РНК [63–65]. После первых успешных работ по редактированию генома растений, опубликованных в 2013 г. на рисе (*Oryza sativa* L.) [66], арабидопсисе (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn.) [67] и табаке (*Nicotiana benthamiana* Domin.) [68], технология редактирования CRISPR/Cas9 быстро заняла центральное место в исследованиях функции генов и в прикладной биотехнологии растений.

К моменту появления первых работ по успешному применению CRISPR/Cas9 в геноме гороха редактирование уже было реализовано у ряда представителей семейства Бобовые, таких как соя [69], вигна [70] и нут [71]. Однако у гороха внедрение CRISPR/Cas9 происходило существенно медленнее. Это связано прежде всего с методическими ограничениями, среди которых основное значение имеют трудности получения стабильных трансформантов и низкая эффективность регенерации растения из клеточной культуры [72]. Первое успешное редактирование генома гороха осуществили китайские исследователи в 2023 г. [73], а текущее число экспериментальных работ остается скромным [74–76]. В связи с этим современный этап развития CRISPR/Cas9 у гороха следует рассматривать как начальную стадию формирования самостоятельного направления, в котором каждая опубликованная работа представляет интерес не только с точки зрения изучения функции отдельных генов, но и как вклад в развитие методической базы для дальнейшего редактирования признаков, в т.ч. связанных с признаками бобово-ризобиального симбиоза.

1.2.1. Первый успех в редактировании генома гороха технологией CRISPR/Cas9

Первой работой, в которой было показано успешное применение CRISPR/Cas9 у гороха, стала статья китайских исследователей 2023 г. [73]. Целью исследования была разработка работоспособной системы редактирования генома гороха и подбор таких элементов конструкции, которые обеспечивали бы наибольшую эффективность внесения мутаций. В качестве модельного, авторы выбрали хорошо известный в предыдущих исследованиях на других объектах, ген фитоендесатуразы – *PsPDS* (*Phytoene Desaturase*), поскольку его инактивация сопровождается хорошо различимым фенотипом альбинизма [77,78].

Работа включала два этапа: на первом этапе авторы создали транзиторную систему оценки эффективности CRISPR/Cas9 в трансформированных корнях. Для этого использовали трансформацию *Agrobacterium rhizogenes* в системе «бородатых» корней («hairy roots»). Сравнение двух штаммов, K599 и Ag.Qual, показало, что штамм K599 лучше подходит для гороха, поскольку обеспечивал более высокую частоту образования трансформированных корней. После этого именно K599 был выбран для дальнейшей работы [73].

На втором этапе была проведена оптимизация самой системы CRISPR/Cas9. За основу взяли бинарный вектор pHUN411, который был модифицирован с учетом особенностей гороха. Авторы сравнили несколько вариантов промоторов для экспрессии направляющей РНК (гРНК, sgRNA) и нуклеазы Cas9. Для экспрессии sgRNA использовали промоторы OsU3, AtU6.26 и собственный промотор гороха PsU6.3. Для экспрессии нуклеазы сравнивали стандартный вариант с OsCas9 под промотором ZmUbi и модифицированный вариант с PsCas9 под усиленным промотором en35S. Дополнительно авторы проверили влияние tRNA-элемента, включенного в кассету sgRNA для более эффективного процессинга мультиплексных направляющих РНК. Всего было сконструировано шесть вариантов CRISPR/Cas9 систем. Для гена *PsPDS* выбрали пять мишеней, расположенных в первых трех экзонах [73].

Эффективность конструкций оценивали в системе «hairy roots». В разных вариантах частота мутаций варьировала от 0 до 52,38% по совокупности трансгенных корней. При этом конструкции с tRNA работали лучше, чем варианты без этого элемента. Наиболее эффективной оказалась конструкция PsU6.3-tRNA-PsPDS3-en35S-PsCas9. Для отдельных сайтов редактирования в системе «hairy roots» ее эффективность достигала 87,61%, что стало важным доказательством пригодности подобранной схемы для гороха. Авторы также показали, что эффективность редактирования различалась между мишенями одного и того же гена, то есть выбор сайта-мишени существенно влияет на результат [73].

Анализ типов мутаций показал, что преобладали делеции различной длины. Наиболее часто встречались делеции длиной 1 п. н., однако были выявлены и более крупные делеции, превышающие 10 п. н. Для наиболее эффективной конструкции было обнаружено восемь типов мутаций, причем все они представляли собой делеции. Это указывало на активную работу системы через образование двуцепочечных разрывов и их последующую репарацию по пути негомологического соединения концов.

После отбора лучшей конструкции авторы перешли к стабильной (*Agrobacterium tumefaciens*) трансформации и регенерации растений. В результате было получено 264 регенеранта, из которых 150 оказались трансгенными. Среди них мутации в гене *PsPDS* были обнаружены у 27 линий. В их числе были одна гомозиготная линия, одна биаллельная линия, 17 химерных и 8 гетерозиготных линий. У части растений с биаллельными изменениями наблюдали ожидаемый фенотип альбинизма, что подтверждает потерю функции *PsPDS* [73].

В вышеописанной работе впервые была создана эффективная система CRISPR/Cas9 для гороха, пригодная как для предварительной оценки конструкций в системе «hair roots», так и для получения стабильных отредактированных растений. Особенно важным результатом стало то, что использование собственного промотора гороха *PsU6.3*, оптимизированной нуклеазы и tRNA-элемента заметно повышало эффективность редактирования. Тем самым, работа Ли с соавторами (Li et al.) заложила методическую основу для дальнейшего направленного редактирования генов гороха [73].

1.2.2. CRISPR/Cas9 для улучшения вкусовых качеств семян гороха

Следующим этапом развития применения CRISPR/Cas9 на горохе стали работы, направленные на изменение потребительских свойств семян. К этой группе относятся две близкие по замыслу статьи: работа Бовмика с соавторами (Bhowmik et al.) 2023 г. [74], посвященная редактированию гена *PsLOX2*, и работа Ходжинса с соавторами (Hodgins et al.) 2024 г. [75], в которой мишенью служил ген *PsBAS1*. Оба исследования решали одну прикладную задачу – снижение выраженности нежелательного вкуса и аромата у гороха, однако затрагивали разные биохимические механизмы. В первом случае авторы воздействовали на липоксигеназный путь, связанный с образованием летучих органических соединений (ЛОС) и «неприятно-травянистым» запахом. Во втором случае редактирование было направлено на нарушение биосинтеза сапонинов, придающих гороху горечь, вяжущий и металлический привкус.

В статье 2023 г. целью работы было получение элитных линий желтого гороха с пониженной активностью липоксигеназы и улучшенным ароматическим профилем семян [74]. Авторы исходили из того, что традиционная селекция по признаку низкой активности летучих органических соединений у гороха затруднена: природный мутант был ранее найден у *Pisum fulvum* и интрогрессирован в культурный фон, однако такой материал не обладал достаточной хозяйственной ценностью. Поэтому CRISPR/Cas9 рассматривалась как более прямой способ создания новых аллелей в элитном сорте. В качестве мишени был выбран *PsLOX2*, который ранее рассматривался как один из наиболее значимых генов, связанных с образованием летучих продуктов окисления жирных кислот [79]. Авторы спроектировали пять направляющих РНК в первых трех экзонах гена и предварительно проверили их активность *in vitro* по способности направлять рекомбинантный Cas9 на расщепление целевого фрагмента ДНК. Наиболее перспективные направляющие РНК были объединены в кассете типа tRNA-gRNA и экспрессировались под промотором CaMV 35S; белок Cas9 также экспрессировался под 35S. Перед получением стабильных трансформантов, авторы использовали промежуточную систему проверки в мезофильных протопластах, что позволило убедиться в наличии мутаций в целевом локусе и снизить риск длительной работы со стабильными трансформантами. Далее конструкцию переносили в *A. tumefaciens* EHA105 и применяли для получения стабильных растений [74].

Основной результат этой работы состоял в том, что у гороха удалось не только получить мутации в *PsLOX2*, но и связать их с изменением биохимических и ароматических характеристик семян. Из 19 растений-регенерантов 17 были трансгенными, а у пяти линий были обнаружены признаки редактирования. В поколении T2 авторы выделили гомозиготные и гетерозиготные мутантные растения с делециями в области мишени, приводившими к сдвигу рамки считывания и преждевременному стоп-кодону. На уровне фенотипа это сопровождалось достоверным снижением активности липоксигеназы. Одновременно в мутационных линиях возрастало содержание линолевой и α -линоленовой кислот как основных субстратов ЛОС, а концентрация ряда ключевых летучих соединений (гексаналя, 2-гексеналя, гептаналя, (E)-2-гептеналя, (E,E)-2,4-гептадиеналя, 1-октен-3-ола и др.) снижалась. Таким образом, авторы показали, что отключение одного гена может существенно изменить вкусоароматический профиль семян. По смыслу эта работа близка к исследованиям у сои, где редактирование *GmLOX1*, *GmLOX2* и *GmLOX3* также использовали для ослабления характерного аромата [80].

Работа Ходжинса с соавторами (Hodgins et al.) 2024 г. была построена иначе [75]. Ее целью было создание линий желтого гороха без сапонинов путем нокаута гена *PsBAS1*, кодирующего β -амиринсинтазу – фермента, катализирующего ранний этап биосинтеза тритерпеновых сапонинов. В отличие от статьи по *PsLOX2*, здесь авторы сначала подробно обосновали выбор

мишени на уровне биохимии и тканеспецифической экспрессии. С помощью метода жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (LC/MS) было показано, что более 97,6% сапонинов в семенах сосредоточено в зародыше, причем около 99% их количества приходится на DDMP-сапонин. Именно DDMP-сапонин – основная форма сапонинов в семенах гороха, связанная с формированием нежелательного горького привкуса. Затем на основе транскриптомного анализа зародыша и семенной кожуры авторы установили, что именно *PsBAS1* активно экспрессируется в зародыше, тогда как *PsBAS2*, вероятно, играет второстепенную роль. Тем самым ген-мишень был выбран не только по литературным данным, но и по собственным данным о распределении метаболита и экспрессии гена в ткани семени [75].

Конструкция для редактирования *PsBAS1* также включала несколько направляющих РНК, но в этой работе гораздо больше внимания было уделено оптимизации самой системы. После *in vitro* проверки пяти кандидатов были отобраны gRNA, расположенные в первых двух экзонах гена. Далее авторы использовали мультиплексную кассету с тремя gRNA, разделенными tRNA-последовательностями. Нуклеаза Cas9 во всех вариантах экспрессировалась под промотором CaMV35S, а для кассеты gRNA сравнивали два варианта: CaMV35S и *AtU6-26*. Кроме того, впервые для гороха была специально проверена роль температурного фактора: «бородатые корни» индуцировали при 24 °C и при 37 °C, поскольку ранее было показано, что повышенная температура может усиливать активность Cas9 у растений [81]. Авторы сравнили пять штаммов *Agrobacterium rhizogenes* и установили, что для сорта CDC Inca наиболее эффективен штамм AR10, обеспечивший 92% образованных GFP-трансформированных корней. Наиболее результативной оказалась комбинация *AtU6-26* для экспрессии sgRNA и кратковременная обработка при 37 °C; в этих условиях доля «бородатых корней» с крупными мутациями достигала 36%. После этого оптимизированную конструкцию перенесли в систему стабильной трансформации через *A. tumefaciens* EHA105.

В стабильных трансформантах авторам удалось получить биаллельные мутации в *PsBAS1*, включавшие делеции и инверсию участка между двумя мишенями. В поколении T2 были выделены две гомозиготные линии, семена которых использовали для фенотипического анализа. Главный результат состоял в почти полном исчезновении сапонинов: содержание DDMP-сапонины и сапонины В в мутантных семенах снижалось более чем на 99,8 % по сравнению с контролем. Дополнительно было выявлено умеренное, но статистически значимое повышение содержания белка и небольшое снижение содержания крахмала. Авторы отдельно отметили, что одна из двух линий демонстрировала сопутствующие изменения роста и продуктивности, что, вероятно, связано с посторонними нецелевыми мутациями («off-targets эффект»); поэтому более корректной моделью они считали вторую линию, в которой выраженных морфологических отклонений не наблюдалось. Важный вывод статьи заключается в том, что редактирование

PsBAS1 позволяет адресно устранять один из основных источников горечи в продуктах гороха. Эта работа логически продолжает данные Верноуда (Vernoud et al.) 2021 г. [82], которые на материале TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes – поиск индуцированных точечных мутаций в целевом гене) показали ключевую роль *PsBAS1* в накоплении сапонинов, но не решали задачу быстрого создания полезной мутации гене в современном сорте гороха.

Описанные исследования решают общую задачу улучшения вкусовых качеств, но делают это на разных уровнях метаболизма. Работа по *PsLOX2* показала, что у гороха возможно направленно изменить профиль летучих соединений и тем самым ослабить неприятный запах. Она была особенно важна как первое доказательство того, что CRISPR/Cas9 может быть использована для улучшения пищевого качества семян гороха в стабильных линиях. Работа по *PsBAS1* пошла дальше: в ней не только получен выраженный метаболический эффект, но и систематически оптимизированы параметры редактирования, включая выбор штамма *A. rhizogenes*, промотора для экспрессии gRNA и температурного режима. Кроме того, если в работе по *PsLOX2* предварительная проверка конструкции проводилась в протопластах, то в статье по *PsBAS1* такой промежуточной платформой стала система «бородатых корней».

1.2.3. Прививка на подвой как оптимизация укоренения гороха при CRISPR/Cas9–редактировании

Статья Соулард с соавторами (Soullard et al.) 2025 г. представляет собой еще один полноценный пример успешного редактирования генома гороха [76]. Целью работы было создание воспроизводимого протокола получения наследуемых и, по возможности, безтрансгенных (несущих целевую мутацию, но не содержащих в геноме встроенных последовательностей трансформирующей конструкции CRISPR/Cas9) отредактированных растений гороха. В качестве гена-мишени авторы выбрали ген *TENDRIL-LESS (TL)*, контролирующий развитие усиков. Такой выбор был методически удачен, поскольку нокаут *TL* приводит к хорошо различимому морфологическому фенотипу: вместо усиков формируются листочки, и результат редактирования можно оценивать уже на ранних этапах.

В работе использовали трансформацию эмбриональных осей гороха через *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. После изоляции из набухших семян экспланты подвергали соникации в присутствии агробактерии, затем культивировали на селективной среде для индукции побегов. Для отбора трансформированных тканей в вектор PsF2 были включены маркеры DsRed и NptII. Существенной особенностью работы стало использование двух направляющих РНК против гена

TL под контролем U6–промоторов гороха, а также варианта *zCas9i* – нуклеазы Cas9 с интронами под промотором *AtRPS5A*. Особенно важным элементом протокола стала прививка трансгенных побегов на дикий подвой, что позволило обойти трудную для гороха стадию укоренения [76].

Авторы показали, что почти все эмбриональные оси способны образовывать побеги *in vitro*, однако общая частота получения осей с трансгенными побегами оставалась невысокой и составляла в среднем около 0,5%. Несмотря на это, сама эффективность редактирования у отобранных трансгенных побегов оказалась исключительно высокой. При анализе семи независимых эмбриональных осей все DsRed-положительные побеги имели ожидаемый фенотип *tl*, а общая эффективность редактирования достигала 100%. В потомстве T1 были получены растения, несущие мутантные аллели в гомозиготном или биаллельном состоянии. Авторы также отметили низкий уровень химерности, отсутствие обнаруживаемых инделов в проверенных предполагаемых внецелевых сайтах и сохранение высокой активности системы при обратном скрещивании. Важный практический вывод работы состоит в том, что предложенный подход позволяет получать безтрансгенные отредактированные растения уже в течение одного поколения, примерно за пять месяцев [76].

Таким образом, работа Соулард с соавторами (2025 г.) имеет не только биологическое, но и методическое значение. В отличие от предшествующих исследований, где основное внимание было сосредоточено на доказательстве принципиальной возможности редактирования гороха, данная статья предлагает улучшенную платформу получения наследуемых мутаций. Использование эмбриональных осей, визуального маркера DsRed, прививки и оптимизированной конструкции CRISPR/Cas9 делает эту работу важным шагом к более рутинному применению геномного редактирования у гороха.

1.2.4. От классического CRISPR/Cas9 к точному редактированию генома гороха

Вышеописанные опубликованные к настоящему времени работы по редактированию генома гороха показывают, что технология CRISPR/Cas9 уже стала для гороха доступным и легко осуществимым инструментом функциональной генетики. Однако во всех этих исследованиях использован классический вариант системы, основанный на разрезании двойной цепи ДНК белком Cas9 в участке, который задается направляющей РНК (*sgRNA*, *gRNA*) [83]. После двуцепочечного разрыва клетка восстанавливает ДНК собственными системами репарации, чаще всего по пути негомولوجичного соединения концов (*NHEJ* – *Non-Homologous End Joining*) [84,85]. Именно на этом этапе обычно возникают небольшие вставки и делеции, которые нарушают

структуру гена и приводят к его выключению (рисунок 1.2). Поэтому основным результатом классического CRISPR/Cas9 остается получение нокаутов генов, тогда как точная замена отдельных нуклеотидов и внесение более сложных генетических изменений потребовали развития дополнительных инструментов геномной инженерии, включая системы сайт-специфической рекомбинации и их комбинирование с CRISPR/Cas9 [86].

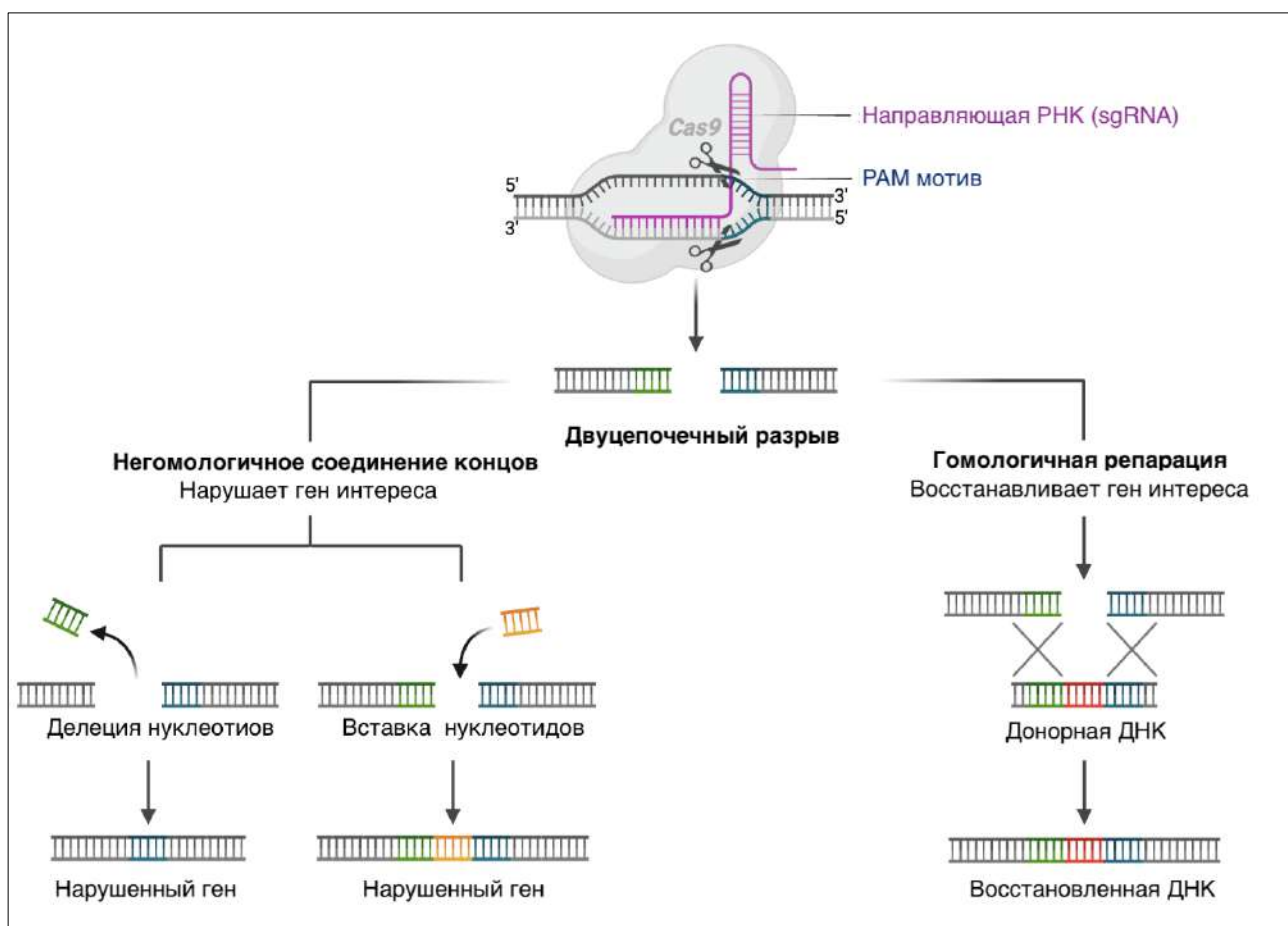


Рисунок 1.2 – Механизм работы системы редактирования CRISPR/Cas9 [26]

Точные варианты редактирования генома основаны на иной логике. Так, редактирование оснований (CRISPR/Cas9 *Base editing*) использует модифицированный Cas9, связанный с ферментом – дезаминазой, и позволяет менять одно основание на другое без образования двуцепочечного разрыва ДНК и без донорной матрицы. Сначала были созданы системы для замен С→Т и G→А, а затем для замен А→G и Т→С [87–89]. Прайм-редактирование (CRISPR/Cas9 *Prime editing*) является еще более гибким подходом [90]. В этой системе никаза Cas9 соединена с обратной транскриптазой, а специальная направляющая РНК не только наводит комплекс на нужный участок, но и несет матрицу требуемого изменения. Это позволяет вносить

не только точечные замены, но и небольшие вставки и делеции без двуцепочечного разрыва ДНК и без внешней донорной молекулы.

Для многих видов растений подходы изящного редактирования оптимизированными технологиями CRISPR/Cas9 уже обсуждаются не как теоретическая возможность, а как следующий этап развития геномного редактирования. На примере риса и пшеницы была продемонстрирована возможность точного изменения аллелей методом CRISPR/Cas9 Base editing, а на примере томата – адаптация технологии CRISPR/Cas9 Prime editing к двудольным культурам [91]. Для гороха, увы, подобные более точные системы редактирования пока лишь рассматриваются как перспективы для возможного дальнейшего внедрения [76].

Так, идея направленного изменения аллельного состояния *PsLykX* логически следует из результатов диссертационной работы А.С. Сулимы [22]. В ней было показано, что линии гороха с узкой специфичностью симбиоза несут редкие аллельные варианты *PsLykX* – «афганский» или «таджикский», отличающиеся от распространенной «европейской» аллели несинонимичными заменами в рецепторной части белка. Особый интерес представляет «таджикский» вариант, который, вероятно, возник из «европейской» аллели в результате нуклеотидной замены в участке, соответствующем первому LysM-модулю рецептора (см. пункт 1.3.3) [22]. Эта логика была развита в рамках проекта «Сужение специфичности взаимодействия микробов и растений за счет обмена сигналами», выполняемого в НТУ «Сириус».

1.2.5. Способы доставки компонентов геномного редактирования в клетки растений

Эффективность геномного редактирования у растений определяется не только конструкцией системы CRISPR/Cas9, но и способом доставки ее компонентов в клетки. Для гороха этот вопрос имеет особое значение, поскольку данная культура отличается низкой эффективностью регенерации по сравнению с другими представителями семейства и выраженной зависимостью результата от генотипа, типа экспланта и условий культивирования [92,93]. Современные протоколы трансформации гороха демонстрируют эффективность на уровне 0,1–6,5%, и только в отдельных случаях она превышает 10% [94,95]. В связи с этим выбор способа доставки во многом определяет, как частоту получения отредактированных клеток, так и успех последующей регенерации полноценных растений (рисунок 1.3) [96].

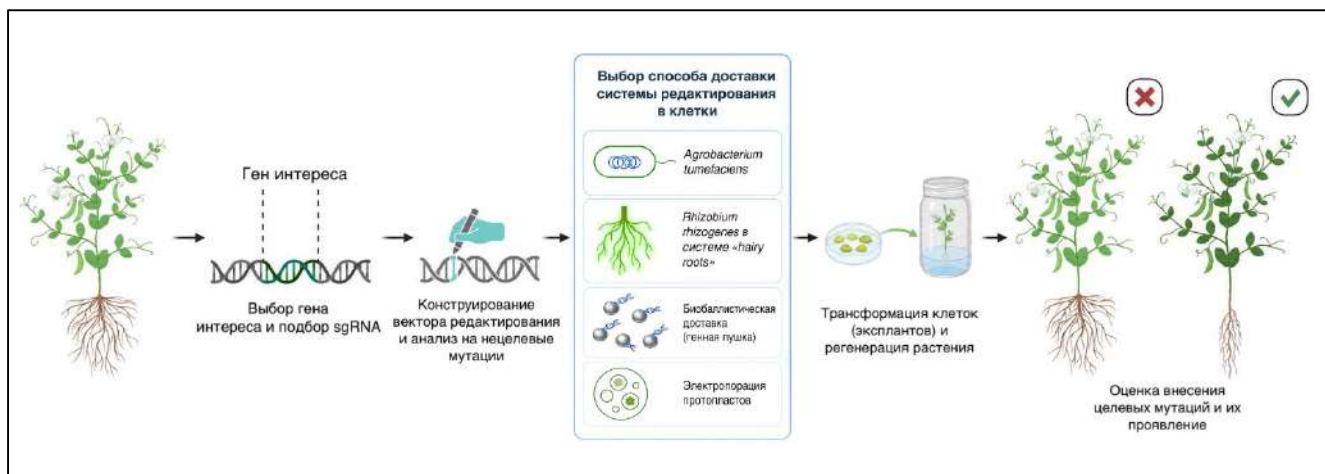


Рисунок 1.3 – Последовательность этапов работ получения растения с отредактированным геномом на примере гороха [26]

Наиболее распространенным подходом доставки компонентов редактирования генома остается хорошо известная агробактериальная трансформация с использованием *Rhizobium radiobacter* (ранее *Agrobacterium tumefaciens*) [97]. Данный метод, основанный на природном механизме переноса Т-ДНК агробактерией *A. tumefaciens* в клетки растений, позволяет вводить в растительные клетки Т-ДНК, содержащую кассеты экспрессии нуклеазы Cas9, направляющих РНК и селективных маркеров. Основными преимуществами *A. tumefaciens* являются относительная методическая доступность, возможность стабильной интеграции конструкции и получение наследуемых изменений. Вместе с тем эффективность такой трансформации у гороха часто ограничена длительностью получения растений–регенерантов (около 6 месяцев в случае гороха) [98].

Альтернативным способом является баллистическая доставка конструкций редактирования, при которой генетический материал наносят на микрочастицы и вводят в ткани растений с помощью генной пушки [99]. Преимуществом этого метода является независимость от агробактерий и возможность трансформации трудноинфицируемых генотипов, клетки и экспланты которых слабо восприимчивы к заражению агробактериями [100]. Однако этот подход применяется ограниченно, поскольку часто сопровождается случайной интеграцией нескольких копий конструкции и повышенной химерностью получаемых растений.

Для быстрой оценки работы системы редактирования могут использоваться протопласты, в которые конструкции редактирования вводят с помощью полиэтиленгликоля или электропорации [101]. Такой подход удобен для проверки активности направляющих РНК, сравнения векторных конструкций и первичной оценки частоты мутагенеза [102]. Однако его практическое значение ограничено трудностями регенерации целых растений из протопластов.

Особое место среди способов доставки занимает трансформация с помощью *Rhizobium rhizogenes* (ранее *Agrobacterium rhizogenes*), приводящая к образованию так называемых «бородатых корней» («hairy roots») [97]. Этот метод основан на природной способности бактерии переносить в геном растительных клеток участок своей Ri-плазмиды – Т-ДНК, содержащую гены, индуцирующие активное корнеобразование. В биотехнологических конструкциях природный участок Т-ДНК заменяют или дополняют целевой последовательностью, например, кассетой CRISPR/Cas9 [103]. В результате трансформация преимущественно затрагивает корневую ткань, что позволяет быстро получать композитные растения, у которых надземная часть остается нетрансформированной, а отдельные корни несут введенную конструкцию и независимые события редактирования [104].

Во многих исследованиях трансформация *A. rhizogenes* в системе «hairy roots» используется как быстрый инструмент предварительной проверки вектора редактирования, позволяя в короткие сроки (4 недели для гороха) оценить, происходит ли редактирование целевого гена, и сравнить эффективность разных вариантов конструкции без длительного и трудоемкого этапа регенерации целого растения, как при трансформации *A. tumefaciens* [73,75].

Однако значение трансформации *A. rhizogenes* в системе «бородатых» корней не ограничивается предварительным тестированием конструкций редактирования. Для генов, связанных с бобово-ризобийным симбиозом, *A. rhizogenes* представляет собой полноценную экспериментальную платформу [23]. Это связано с тем, что ключевые этапы симбиотического взаимодействия локализованы в корневой системе. На трансформированных корнях можно непосредственно оценивать способность к заражению ризобиями, образование инфекционных нитей, наличие и число клубеньков, особенности их морфологии, темпы развития и внутреннюю организацию. Тем самым функциональный эффект редактирования таких признаков может быть установлен без обязательного получения стабильных растений-регенерантов.

Таким образом, для доставки системы редактирования генома у гороха наибольшее практическое значение сохраняют агробактериальные методы доставки, тогда как другие подходы в основном используются как вспомогательные инструменты для предварительного тестирования работы конструкций редактирования.

1.3. Симбиоз как адаптация растений к прикрепленному образу жизни

Растения как прикрепленные организмы не могут избегать неблагоприятных воздействий среды и поэтому вынуждены постоянно воспринимать и интегрировать сигналы, поступающие

от абиотических и биотических факторов [105]. Их корневая система взаимодействует с микоризными грибами, ризобиями и ризосферными бактериями, тогда как надземные органы заселяются эндофитными и эпифитными микроорганизмами [47]. Растение, полностью свободное от микробов, скорее экзотическое исключение, чем биологически обоснованное правило [48].

Особое значение имеют микроорганизмы ризосферы (зоны почвы вокруг корня, находящейся под непосредственным влиянием растения) способные оказывать на растение как отрицательное, так и положительное влияние [47,106]. Наряду с патогенами, подавляющими рост и продуктивность растений, в почве присутствуют многочисленные полезные микроорганизмы, вступающие с ними в мутуалистические взаимодействия [45,106]. Такие ассоциации обеспечивают растению доступ к ограниченным элементам минерального питания, повышают устойчивость к стрессам и патогенам и в ряде случаев приводят к формированию специализированных симбиотических структур [106,107].

Среди полезных растительно-микробных взаимодействий особое место занимают арбускулярная микориза и бобово-ризобияльный симбиоз [41,44,45]. Первый тип симбиоза имеет древнее происхождение и широко распространен у наземных растений, обеспечивая главным образом улучшение фосфорного питания [41,42]. Второй возник позднее, отличается значительно большей специфичностью и характерен прежде всего для растений семейства Бобовые. Его результатом становится формирование клубеньков – новых органов, в которых бактерии осуществляют фиксацию атмосферного азота [106,107]. Высокая степень координации между партнерами, включающая молекулярное узнавание, согласованную экспрессию генов и перестройку программ развития растения, делает бобово-ризобияльный симбиоз одной из наиболее удобных моделей для изучения эволюции и генетики мутуализма [106,108].

Биологическое значение бобово-ризобияльного симбиоза определяется тем, что молекулярный азот атмосферы, несмотря на его огромные запасы, недоступен для большинства организмов из-за высокой химической инертности. Бобовые растения способны использовать этот источник азота благодаря взаимодействию с клубеньковыми бактериями, которые восстанавливают N_2 до формы аммония с помощью фермента нитрогеназы [37,38,109]. В ответ растение поставляет бактериоидам углеродные субстраты (в основном органические кислоты), поддерживая энергетический баланс и функциональную стабильность симбиотической системы [106]. По сравнению с другими типами азотфиксирующих симбиозов, например, функционально подобным актиноризным симбиозом некоторых семейств растений (Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Coriariaceae, Datisceae) с актиномицетами рода *Frankia*, бобово-ризобияльный симбиоз исследован лучше [110]. Это связано как с высокой сельскохозяйственной значимостью бобовых культур как источников растительного белка, так и

с удобством экспериментальной системы: клубеньковые бактерии можно культивировать вне растения, а различные этапы взаимодействия контролируемы и доступны для молекулярно-генетического анализа.

В настоящее время интерес к бобово-ризобиальному симбиозу определяется не только его фундаментальным значением, но и практическими задачами адаптивного земледелия, предполагающего переход от внесения минеральных удобрений к сохранению плодородия почв, за счет внесения биопрепаратов [40,111–113].

1.3.1. Основные этапы формирования бобово-ризобиального симбиоза

Формирование бобово-ризобиального симбиоза представляет собой многоэтапный процесс, в котором последовательно участвуют корневая система растения, свободноживущие клубеньковые бактерии, сигнальные молекулы обоих партнеров и специализированные гормоны развития растительных тканей [114,115]. У гороха посевного (*Pisum sativum* L.) микросимбионтами являются клубеньковые бактерии, главным образом представители *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Итогом их взаимодействия становится образование корневого симбиотического клубенька – специализированного органа, внутри которого бактерии фиксируют атмосферный азот (рисунок 1.4) [116–118].

Инициация бобово-ризобиального симбиоза начинается с выделения растением в ризосферу низкомолекулярных органических соединений, среди которых важную роль играют флавоноиды (вторичные метаболиты растений) [119]. Они воспринимаются бактериальным регуляторным белком NodD, который активирует экспрессию бактериальных *nod*-генов [120,121]. Эти гены отвечают за синтез Nod-факторов – специфических липохитоолигосахаридных сигнальных молекул, необходимых для запуска симбиотической программы у растения [114,122,123]. Nod-факторы имеют общую структурную основу, но различаются по длине олигосахаридной цепи и химическим модификациям [124,125]. Именно эти модификации во многом определяют специфичность взаимодействия между растением и бактерией [126]. У гороха особое значение имеет соответствие между структурой бактериального Nod-фактора и рецепторным аппаратом растения. Поэтому уже на ранней стадии симбиоза происходит молекулярная «проверка совместимости» партнеров [114,127].

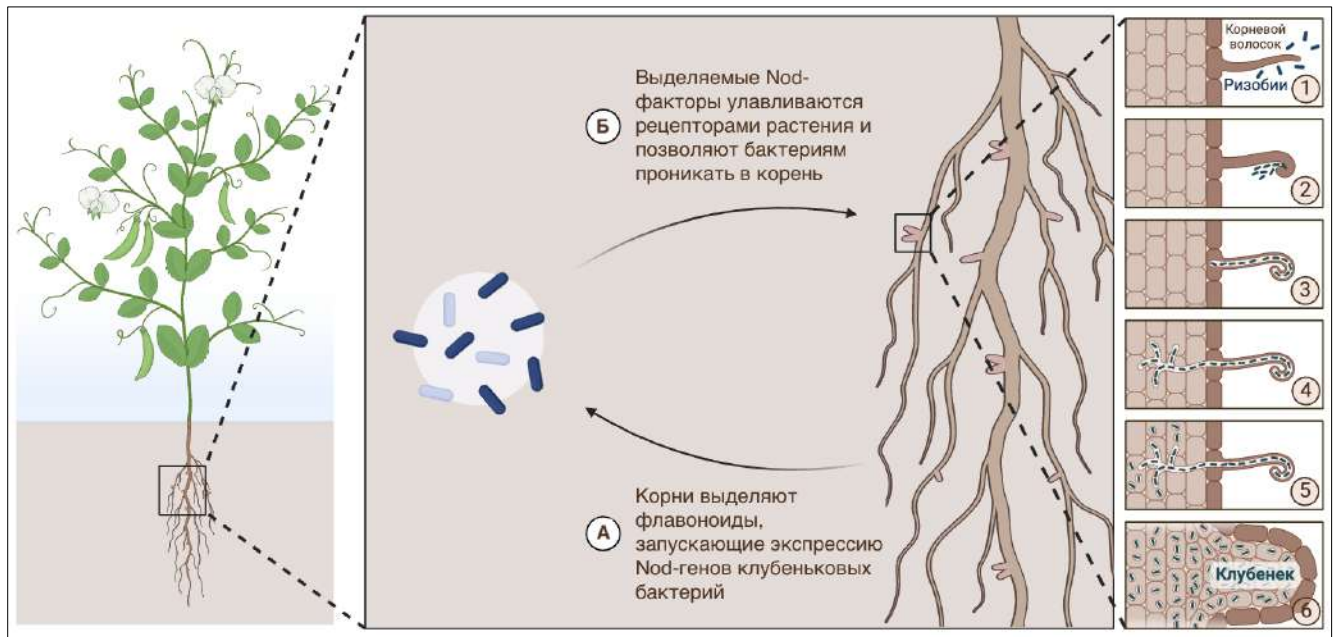


Рисунок 1.4 – Схема обмена сигналами между симбионтами в бобово-ризобийном симбиозе (А, Б), включая стадии образования клубенька (1– 6): 1 – проникновение ризобий через корневой волосок; 2 – начало образования инфекции, ризобии перемещаются внутрь корневого волоска; 3 – закручивание корневого волоска, формирование инфекционной нити; 4 – рост инфекционной нити через клетки эпидермиса; 5 – инфекционная нить доходит до клеток коры корня; 6 – образование симбиотического клубенька [26]

Восприятие Nod-факторов осуществляется рецептороподобными киназами растения, содержащими LysM-домены [12,13,128]. LysM-домен представлен участком белка, способным связываться с молекулами, содержащими N-ацетилглюкозаминовые остатки, к которым относятся и Nod-факторы. После связывания сигнала запускается внутриклеточный симбиотический сигнальный путь [129]. Он включает изменение ионных потоков, колебания концентрации кальция в ядре и активацию транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию генов, необходимых для инфицирования корня и закладки клубенька [130].

Одним из ранних морфологических признаков успешного распознавания ризобий является деформация корневых волосков [131,132]. Корневой волосок изгибается, закручивается вокруг прикрепившихся бактериальных клеток и формирует так называемый инфекционный карман [47,133]. В этой зоне начинается образование инфекционной нити (ИН) [118,134], – трубчатой структуры, по которой ризобии продвигаются от поверхности корня к внутренним тканям. ИН позволяет растению контролировать проникновение бактерий и не допускать проникновения патогенных или несовместимых штаммов [39,135].

Параллельно с инфекционным процессом в коре корня запускается органогенез клубенька. Под действием симбиотических сигналов клетки коры возобновляют деление, формируя зачаток (примордий) нового органа [131,132]. У гороха, как и у ряда других бобовых

умеренной зоны, образуются клубеньки недетерминированного типа [106]. Их особенность состоит в сохранении активной апикальной меристемы, за счет которой клубенек продолжает расти, при этом ризобии в клетках клубенька дифференцируются в симбиотическую форму – бактериоиды – необратимо, т.е. без возможности вернуться к свободноживущему состоянию [136]. Такие клубеньки имеют выраженную зональность: зону апикальной меристемы, зону инфекции, зону азотфиксации и зону старения (рисунок 1.5).

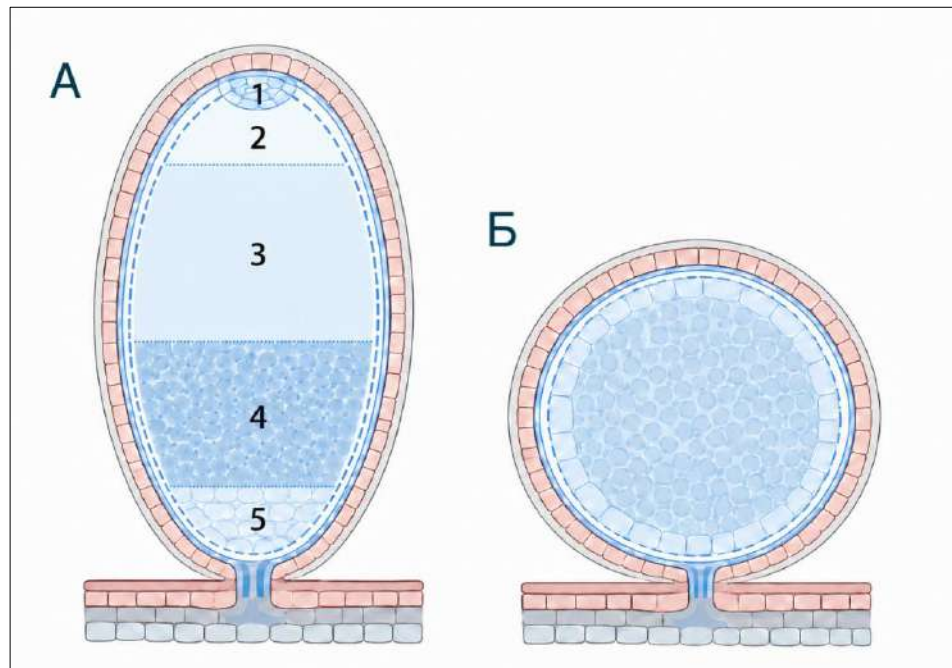


Рисунок 1.5 – Схема строения недетерминированного клубенька (А): 1 – стабильная апикальная меристема; 2 – зона инфекции; 3 – промежуточная зона; 4 – зона активной фиксации азота; 5 – зона старения; по сравнению с детерминированным клубеньком (Б)

После достижения клеток клубенькового примордия ризобии высвобождаются из инфекционных нитей в цитоплазму растительных клеток, но не находятся там свободно. Каждая бактериальная клетка окружена мембраной растительного происхождения и образует симбиосому (внутриклеточную структура, в которой бактерия и растительная мембрана образуют функциональный комплекс) [47,137]. Внутри симбиосом ризобии дифференцируются в бактериоиды – специализированные формы, приспособленные к фиксации азота [138]. У гороха бактериоиды относятся к терминально дифференцированному типу: они изменяют форму, увеличиваются в размере и теряют способность к самостоятельному размножению [139,140].

Основной функцией зрелого клубенька является биологическая фиксация азота. Этот процесс осуществляется бактериальным ферментным комплексом нитрогеназой, который

восстанавливает молекулярный азот атмосферы до формы аммония [38,106]. В инфицированных клетках клубенька концентрация свободного кислорода поддерживается на крайне низком уровне, что защищает нитрогеназу от инактивации, но не препятствует дыханию бактериоидов [141]. С одной стороны, кислород необходим для дыхания и получения энергии, с другой – его избыток подавляет работу нитрогеназы. Баланс обеспечивается леггемоглобином – кислородсвязывающим белком клубеньков, придающим активным клубенькам розовую окраску [142].

Функционирование клубенька требует строго регулируемого обмена веществами между партнерами. Растениеставляет бактериоидам углеродные соединения, главным образом продукты фотосинтеза, а бактериоиды передают растению восстановленные формы азота [106,143]. При этом растение контролирует число клубеньков, степень инфицирования и активность микросимбионта, поскольку формирование и поддержание симбиоза сопряжено со значительными энергетическими затратами.

Образование клубеньков и активность азотфиксации регулируются также уровнем доступного минерального азота в почве. При достаточном содержании нитратов и аммонийных форм азота растение подавляет инициацию новых клубеньков и снижает активность уже сформированных, так как потребность в получении азота от бактериоидов уменьшается. Напротив, при дефиците доступного азота формирование бобово-ризобияльного симбиоза становится физиологически выгодным для растения и сопровождается активацией клубенькообразования [144]. Примечательно, что внесение минеральных азотных удобрений оказывает ингибирующее действие на взаимодействие симбионтов [145], о чем свидетельствует снижение колонизации корневых волосков клубеньковыми бактериями, ослабление скручивания корневых волосков [146], уменьшение количества инфекционных нитей и связанное с этим торможение развития клубеньков [144,147].

Таким образом, формирование бобово-ризобияльного симбиоза включает несколько взаимосвязанных процессов: химический обмен сигналами, распознавание Nod-факторов рецепторами растения, запуск симбиотического сигнального пути, инфицирование корневых волосков, образование инфекционных нитей, органогенез клубенька и дифференцировку ризобий в азотфиксирующие бактериоиды [38,115,148]. У гороха эта система отличается высокой степенью генетически обусловленной специфичности, что делает ее удобной моделью для изучения молекулярных механизмов распознавания симбиотического партнера и управления эффективностью клубенькообразования.

1.3.2. Специфичность бобово-ризобияльного симбиоза у гороха

Специфичность бобово-ризобияльного симбиоза отражает способность растения избирательно взаимодействовать с определенными группами, видами или штаммами клубеньковых бактерий [39,114]. Штаммы ризобий могут различаться по конкурентоспособности (способности занимать клубеньки) и уровню фиксации азота [4,6,127,149]. Для бобовых растений эти свойства имеют принципиальное значение, поскольку образование клубенька само по себе не гарантирует высокой эффективности азотфиксации [106,150]. В природных и полевых (агроценологических) условиях растение сталкивается не с одним штаммом бактерий, а с комплексом потенциальных микросимбионтов, среди которых необходимо «отобрать» совместимого и функционально эффективного партнера [6,47,150,151].

Высокая специфичность бобово-ризобияльного симбиоза определяется в т.ч. необходимостью ограничения образования патогенных ассоциаций с микробами [39,114]. Специфичность симбиоза формируется на нескольких уровнях и рассматривается как результат длительной коэволюции партнеров, при которой растение и бактерия формируют генетически согласованную систему взаимного контроля [152,153].

Ключевую роль в ранней специфичности играют Nod-факторы – бактериальные липохитоолигосахаридные сигнальные молекулы [10,18]. Липохитоолигосахариды представляют собой короткие цепи остатков N-ацетилглюкозамина, связанные с липидным остатком и несущие дополнительные химические модификации. Именно эти модификации во многом определяют, будет ли Nod-фактор распознан растением как совместимый симбиотический сигнал. У растения восприятие Nod-факторов обеспечивается рецепторными белками, содержащими LysM-домены – участками белка, способными связывать молекулы, сходные по структуре с фрагментами хитина и пептидогликана [12,13,128]. У бобовых такие домены входят в состав рецептороподобных киназ, участвующих в распознавании Nod-факторов и запуске симбиотического сигнального пути [114,122].

У гороха специфичность симбиоза имеет хорошо изученную историю. Еще в 1920-, 30-е годы прошлого века сотрудник Всесоюзного Института Растениеводства (ВИР) Леонид Ипатьевич Говоров и сотрудница кафедры микробиологии Ленинградского Государственного Университета (ЛГУ) (а позже – заведующая этой кафедрой) Зинаида Георгиевна Разумовская показали, что некоторые образцы гороха из Афганистана не образуют клубеньков в почвах Ленинградской области [154,155]. Позднее, при изучении афганских форм гороха было установлено, что такие генотипы плохо взаимодействуют с обычными европейскими штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, но способны формировать нормальный симбиоз с рядом

штаммов, происходящих из Турции, Израиля и других регионов Ближнего Востока [156,157]. Генетический фактор, определяющий этот тип избирательности, получил название *Sym2* (*Symbiotic gene 2*) [11,21,157].

В дальнейшем было предсказано, что у гороха существуют разные аллельные варианты *Sym2*. Афганские формы несут аллель *Sym2^A* (*Symbiotic gene 2 Afghan*), связанную с высокой специфичностью, тогда как большинство европейских сортов характеризуется аллелью *Sym2^E* (*Symbiotic gene 2 European*), обеспечивающим более широкий круг совместимых ризобий [11,158].

Для образования клубеньков на растениях с аллелью *Sym2^A* бактерии должны обладать геном *nodX* [10,18], кодирующим ацетилтрансферазу – фермент, вносящий дополнительную ацетильную группу в Nod-фактор (рисунок 1.6). Такая модификация позволяет бактериальному сигналу преодолеть ограничение, задаваемое аллелью *Sym2^A*. Модельным примером является штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* TOM, несущий *nodX* и способный эффективно взаимодействовать с афганскими формами гороха. Мутации в гене *nodX*, кодирующем ацетилтрансферазу, приводят к исчезновению дополнительной ацетилгруппы на Nod-факторе и утрате способности образовывать симбиоз с афганскими формами, при сохранении эффективного клубенькообразования с европейскими.

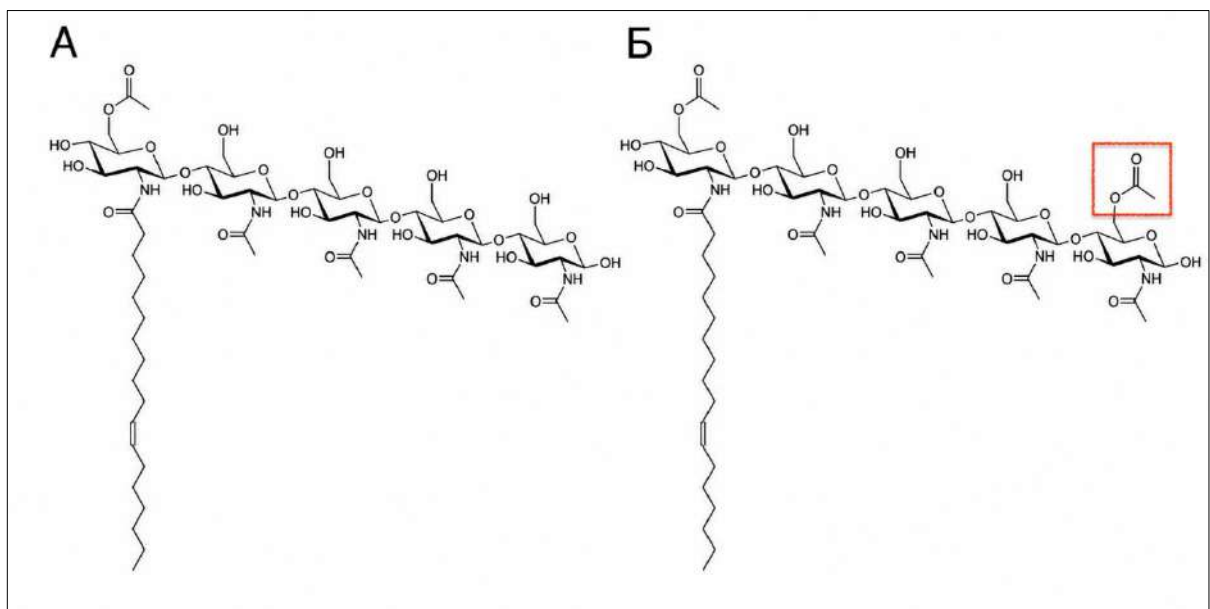


Рисунок 1.6 – Варианты сигнальных молекул Nod-факторов, выделяемых штаммами *Rh. leguminosarum*: А – строение сигнальной молекулы без модификации; Б – строение сигнальной молекулы с модификацией в виде ацетилирования по редуцирующему концу (красная рамка), обусловленное наличием у бактерии гена *nodX* [22]

Поскольку для взаимодействия с афганскими формами гороха бактериям необходима специфическая О-ацетильная модификация Nod-фактора, обусловленная активностью *nodX*, было выдвинуто предположение, что локус *Sym2* связан с рецепцией бактериального сигнала на поверхности растительной клетки [11,158]. Такая гипотеза согласуется с тем, что структурные различия Nod-факторов воспринимаются рецептороподобными киназами, содержащими LysM-домены, и могут определять дальнейший ход симбиотического взаимодействия.

Поддержку этой гипотезе дали исследования модельного растения семейства Бобовые люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.). В геномном регионе, синтенном области *Sym2* гороха, был выявлен кластер генов, кодирующих LysM-рецептороподобные киназы [12,19,20]. Среди них ген *MtLYK3* оказался необходимым для нормального инфицирования корня ризобиями и развития инфекционных нитей [19]. Эти данные подтвердили, что рецепторы данного типа могут участвовать не только в раннем восприятии Nod-факторов, но и в контроле последующих стадий инфицирования.

У гороха первые кандидаты на роль *Sym2* были описаны В.А. Жуковым и соавторами [14]. При скрининге библиотеки кДНК корней *Pisum sativum* L. были идентифицированы два гомологичных гена рецептороподобных киназ, обозначенные *PsK1* и *PsK10* [15]. Оба гена были локализованы в группе сцепления I, соответствующей району локализации *Sym2*. Позднее было показано, что *PsK10* соответствует гену *PsSym37*, ранее идентифицированному по мутантным линиям гороха с нарушенным клубенькообразованием [159].

Ген *PsSym37* кодирует LysM-рецептороподобную киназу и участвует в распознавании Nod-факторов. У мутантной линии *RisNod4* была выявлена аминокислотная замена в рецепторной части белка *PsSym37*, тогда как у линии K24 изменение затрагивало киназный домен. Важно, что нарушение симбиоза у *RisNod4* могло частично компенсироваться штаммом ризобий, несущим *nodX*. На раннем этапе исследований это позволило рассматривать *PsSym37* как возможный кандидат на роль *Sym2*. Однако последующий анализ последовательностей *PsSym37* у афганских и европейских форм гороха не выявил полиморфизма, который мог бы однозначно объяснить различия в симбиотической специфичности. Аналогично, ген *PsK1* не показал устойчивой связи с фенотипом афганских форм [15]. Позднее было установлено, что *PsSym37* участвует преимущественно в восприятии Nod-факторов, различающихся строением жирнокислотного остатка, синтез которого зависит от бактериального гена *nodE* [22,160]. Следовательно, *PsSym37* регулирует иной аспект специфичности симбиоза и не объясняет зависимость афганских форм гороха от наличия *nodX*.

Таким образом, у гороха функционирует несколько рецепторных систем, способных различать структурные варианты Nod-факторов. По имеющимся данным, *PsSym37* связан преимущественно с распознаванием вариаций липидного фрагмента Nod-фактора, тогда как

локус *Sym2* должен быть связан с восприятием модификаций углеводной части сигнальной молекулы, включая О-ацетилирование, обусловленное *nodX*. Это указывает на более сложную организацию рецепторного аппарата гороха по сравнению с рядом других модельных бобовых культур.

Дальнейшее изучение региона *Sym2* позволило выявить еще один ген LysM-рецептороподобной киназы – *PsLykX* (*Pisum sativum* *LysM kinase eXclusive*), чьи аллельные варианты коррелируют с описанной специфичностью взаимодействия афганских и европейских форм гороха [16].

1.3.3. Ген *PsLykX*: структура и функции

Наиболее значимый вклад в идентификацию рецепторного гена, способного объяснить зависимость афганских форм гороха от О-ацетилирования Nod-фактора внесли работы А.С. Сулимы и соавторов [16,17,22]. В исследовании 2017 г. был проведен скрининг ВАС-библиотеки (*bacterial artificial chromosome*) гороха, содержащей крупные фрагменты геномной ДНК, для анализа региона *Sym2* в группе сцепления I. Помимо ранее известных генов *PsSym37* и *PsK1*, в данном участке был выявлен новый ген рецептороподобной киназы, обозначенный как *PsLykX* – *Pisum sativum* *LysM kinase eXclusive* [17].

Анализ структуры *PsLykX* показал, что он кодирует LysM-рецептороподобную киназу. Предполагаемый белок содержит внеклеточную рецепторную область с тремя LysM-доменами, трансмембранный участок и внутриклеточный киназный домен. Такая организация характерна для рецепторов, участвующих в восприятии липохитоолигосахаридных Nod-факторов. Полноразмерная кодирующая последовательность *PsLykX* была подтверждена на основе кДНК, полученной из корней гороха после инокуляции клубеньковыми бактериями, что свидетельствует об экспрессии данного гена в условиях формирования симбиоза [17].

Особое значение имел сравнительный анализ первого экзона *PsLykX*, кодирующего внеклеточную рецепторную область белка. При исследовании коллекции генотипов гороха различного происхождения было установлено, что афганские формы с фенотипом высокой симбиотической специфичности несут уникальный гаплотип *PsLykX*. Этот вариант был выявлен у линии NGB2150 с происхождением из Афганистана, а также у линии K-6883, обладающей сходной реакцией на несовместимые штаммы *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. При этом для генов *PsSym37* и *PsK1* аналогичной ассоциации аллельного состояния и афганского фенотипа установлено не было [17].

Важным результатом работы 2017 г. стало выявление признаков положительного отбора в последовательностях, кодирующих LysM-домены *PsLykX*. Положительный отбор в данном случае означает накопление аминокислотных замен, способных изменять свойства белка и закрепляться в популяции вследствие их функциональной значимости. Обнаружение таких замен именно в рецепторной области согласуется с предположением о том, что *PsLykX* участвует в распознавании структурных вариантов Nod-факторов и может определять избирательность взаимодействия растения с ризобиями [17].

В последующей работе были изучены новые формы гороха из коллекции ВИР, характеризующиеся узкой специфичностью симбиоза [16,22]. Тест на аллелизм подтвердил, что выявленные линии несут аллель того же генетического детерминанта, что и афганская линия. У большинства из них был обнаружен афганский вариант *PsLykX*, тогда как у двух линий из Таджикистана и Туркменистана выявлена иная, «таджикская», аллель. Этот вариант отличался от европейской аллели одной нуклеотидной заменой, вызывающей аминокислотную замену R75P (аргинин на пролин в 75 положении) в рецепторной части белка [22]. Несмотря на различия в последовательности, растения с афганским и таджикским вариантами *PsLykX* демонстрировали сходный фенотип: при инокуляции несовместимым штаммом у них наблюдалось раннее прерывание развития инфекционных нитей и отсутствие нормального клубенькообразования [16,22].

Таким образом, работы вышеописанные показали, что *PsLykX* расположен в геномной области *Sym2*, кодирует белок рецептороподобной киназы LysM-типа и характеризуется аллельным полиморфизмом, согласованным с фенотипом специфичности симбиоза. Наиболее важным является то, что различия между афганскими, таджикскими и европейскими вариантами затрагивают внеклеточную рецепторную часть белка, потенциально участвующую в восприятии Nod-факторов. В настоящее время *PsLykX* рассматривается как обоснованный кандидат на роль гена *Sym2* [22].

Выявленный полиморфизм *PsLykX* имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Его связь с аллельным состоянием, определяющим специфичность симбиоза, создает основу для разработки молекулярных маркеров и отбора генотипов гороха с заданным типом взаимодействия с клубеньковыми бактериями. Одновременно принадлежность *PsLykX* к семейству рецептороподобных киназ, его предполагаемое участие в распознавании Nod-факторов и связь аллельных вариантов с симбиотическим фенотипом делают данный ген перспективной мишенью для функционального анализа и направленного геномного редактирования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Растительный материал

В работе использовали растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.), различающиеся по симбиотическому типу и аллельному состоянию гена *PsLykX* (таблица 2.1). Семена всех сортов (линий) гороха были предоставлены лабораторией №9 «Генетики растительно-микробных взаимодействий» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ, г.Санкт-Петербург, Россия).

Таблица 2.1 – Линии/сорта гороха, использованные в работе

Название сорта/линии гороха	Проявляемый симбиотический вариант	Страна происхождения	Использование в рамках диссертационного исследования
A33.18	Афганский	Нидерланды	Оценка влияния аллели <i>Sym2^A/PsLykX^A</i> на специфичность симбиоза и конкурентное заселение клубеньков
Rondo	Европейский	Нидерланды	Контрольный европейский генотип в опытах с линией A33.18
NGB2150	Афганский	Афганистан	Донор аллели <i>PsLykX^A</i> ; сравнительный генотип в исследованиях специфичности и маркерном анализе; отбор штаммов
Triumph	Европейский	Россия	Контроль при сравнительной оценке клубенькообразования
Caméor	Европейский	Франция	Получение композитных растений при CRISPR/Cas9-редактировании <i>PsLykX</i>
SGE	Европейский	Россия	Контроль при разработке CAPS-маркера <i>PsLykX</i>
Frisson	Европейский	Франция	Родительская линия популяции F ₂ (Frisson×NGB2150)
F ₂ (Frisson × NGB2150)	-	Получена в условиях лабораторного скрещивания	Проверка эффективности CAPS-маркера <i>PsLykX^A</i>

Для изучения влияния аллели высокой специфичности на формирование симбиоза использовали интрогрессионную линию A33.18, несущую аллель *PsLykX*^A на генетическом фоне европейского сорта Rondo. Линия A33.18 с интрогрессированным участком генома афганского гороха характеризуется повышенной избирательностью взаимодействия с клубеньковыми бактериями. В качестве сравнительных генотипов использовали сорт Rondo, афганскую линию NGB2150 и линию Triumph [161]. Данные генотипы применяли в вегетационных и полевых опытах для оценки клубенькообразования и конкурентного заселения клубеньков ризобиями.

Для функционального анализа *PsLykX* методом CRISPR/Cas9 использовали европейский сорт Caméor. На его основе получали композитные растения с трансформированными «бородатыми» корнями, в которых осуществляли направленное редактирование первого экзона *PsLykX*. Фенотипический эффект редактирования оценивали по способности трансформированных корней образовывать клубеньки после инокуляции совместимым штаммом ризобий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1026 [162].

При разработке CAPS-маркера для идентификации аллели *PsLykX*^A использовали афганскую линию NGB2150 и европейскую лабораторную линию SGE, а также сорт Caméor, Frission. Для проверки наследования маркерного признака применяли популяцию F₂, полученную от скрещивания европейского сорта Frisson с афганской линией NGB2150. В этой популяции присутствовали растения с европейским, гетерозиготным и афганским аллельным состоянием *PsLykX*, что позволило оценить диагностическую ценность разработанного маркера. Линию NGB2150 также использовали как растение-ловушку для отбора совместимых эффективных штаммов клубеньковых бактерий из почв России.

2.1.2. Условия культивирования растительного материала

Растения гороха выращивали в контролируемых условиях фитотрона или климатической камеры, а также в полевом опыте.

Перед проращиванием семена стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 10 мин, затем промывали стерильной или автоклавированной водой. Семена проращивали в чашках Петри на стерильном 1%-ном агаре в темноте при комнатной температуре либо при 21 °С. Проросшие семена использовали для последующего выращивания в субстрате и проведения опытов.

Вегетационные опыты по оценке специфичности симбиоза линии A33.18 и сорта Rondo проводили в климатической камере VB 1014 (Vötsch Industrietechnik, Balingen, Германия) при фотопериоде 16/8 ч день/ночь, температуре 21 °С, относительной влажности воздуха 75% и освещенности 40000 люкс. Через трое суток после проращивания растения пересаживали в

металлические сосуды объемом 2 л. В зависимости от варианта опыта использовали стерильный кварцевый песок, предварительно прогретый при 200 °С, либо нестерильную черноземную почву. Почва была отобрана на участке Рязанской области, где горох не выращивали более 15 лет. В сосуд высаживали по три растения. При выращивании на кварцевом песке растения обеспечивали безазотным раствором минерального питания, следующего состава (г/л): (KH_2PO_4 – 0,272; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – 0,620; MgSO_4 – 0,481; K_2SO_4 – 0,871; H_3BO_3 – 0,00455; MnSO_4 – 0,00276; ZnSO_4 – 0,000247; CuSO_4 – 0,000102; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ – 0,000039; CoCl_2 – 0,000027; and NaFe-EDTA – 0,0139); полив проводили автоклавированной водой Milli-Q по мере необходимости.

В полевом опыте растения линии A33.18 и сорта Rondo выращивали в 2023 г. на экспериментальном участке Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова в Санкт-Петербурге. Посев проводили с 15 мая по 6 июля по полностью случайной схеме. Для каждого генотипа и варианта инокуляции использовали три биологических повторности по 30 семян. Перед посевом семена инокулировали суспензией штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ТОМ либо водой в контрольном варианте. Растения анализировали через 7,5 недель после посева, в начале цветения; определяли число клубеньков и сухую массу растений.

Для функционального анализа *PsLykX* в системе «бородатых» корней использовали проростки сорта Caméor. После трансформации *Rhizobium rhizogenes* штамм ARqua1 проростки культивировали на среде Fahraeus в течение 7 суток [163], затем пересаживали в сосуды объемом 1,5 л со стерильным песком по три растения на сосуд. Растения выращивали в климатической камере (Weissttechnik, Reiskirchen, Германия) при температуре 21 °С, фотопериоде 16/8 ч день/ночь и освещенности 40000 люкс. Полив проводили каждые четыре дня, внося 150 мл безазотного раствора минерального питания на сосуд (100X сток макрокомпонентов содержал (г/л): $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 100; K_2HPO_4 – 100; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – 20; 1000X сток микрокомпонентов содержал (г/л): H_3BO_3 – 5; KI – 0,5; KBr – 0,6; NaCl – 0,3; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NiSO_4 – 0,2; CuSO_4 – 0,4; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; MnSO_4 – 0,2 и Li_2SO_4 – 0,2; NaFe-EDTA – 10). Оценку клубенькообразования, идентификацию GFP-положительных корней и анализ редактирования *PsLykX* осуществляли через 21 сутки после пересадки в песок и инокуляции.

При апробации CAPS-маркера на популяции F₂ (Frisson × NGB2150) проростки индивидуально выращивали в контейнерах объемом 500 мл со стерильным вермикулитом. После высадки в каждый контейнер вносили 100 мл безазотного раствора минерального питания и 100 мл суспензии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 с титром не менее 10⁶ КОЕ/мл. Растения выращивали в фитотроне (Weissttechnik, Reiskirchen, Германия) при температуре 21 °С, относительной влажности воздуха 70% и фотопериоде 16/8 ч день/ночь. На 14-е сутки после посадки, в фазе двух-трех листьев, отбирали листовой материал для выделения ДНК и

генотипирования. Через 28 суток после посадки растения извлекали из субстрата для фенотипической оценки клубенькообразования.

2.1.3. Бактериальный материал

В работе использовали штаммы клубеньковых бактерий, различающиеся по наличию гена *nodX*, а также штамм *Agrobacterium rhizogenes* для получения трансформированных «бородатых корней» гороха. Все штаммы бактерий были предоставлены лабораторией №9 «Генетики растительно-микробных взаимодействий» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ, г.Санкт-Петербург, Россия) (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Штаммы бактерий, использованные в работе

Штамм	Таксономическая принадлежность	Происхождение	Наличие гена <i>NodX</i>	Назначение в работе
ТОМ	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Турция	NodX+	Вегетационные и полевые опыты с А33.18 и Rondo; оценка специфического заселения клубеньков инокулянтном
А1	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Россия	NodX+	Контрольные инокуляционные опыты; подтверждение способности афганских генотипов к симбиозу с <i>nodX</i> + штаммами
RCAM1022	<i>Rhizobium ruizarguesonis</i> (ранее <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>)	Россия	NodX-	Сравнительная оценка клубенькообразования у гороха афганского и европейского симбиотических типов
RCAM1026	<i>Rhizobium ruizarguesonis</i> (ранее <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>)	Казахстан	NodX-	Функциональный анализ <i>PsLykX</i> в системе волосистых корней; фенотипическая оценка растений при апробации CAPS-маркера
ARqua1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Коллекционный штамм	-	Трансформация гипокотилей гороха вектором pKSE401-GFP-CRISPR/Cas9 и получение волосистых корней

Штаммы *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* TOM и *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1022 применяли для инокуляции растений гороха в вегетационных, полевых и модельных опытах. Основным критерием их выбора являлось наличие или отсутствие гена *nodX*, кодирующего ацетилтрансферазу, обеспечивающую О-ацетилирование Nod-фактора. Штаммы, несущие *nodX*, способны формировать клубеньки как на европейских, так и на афганских генотипах гороха, тогда как штаммы без *nodX* эффективно взаимодействуют преимущественно с растениями европейского симбиотического типа.

Штамм TOM (*Rh. leguminosarum* bv. *viciae*, NodX+) использовали в вегетационных и полевых опытах с линией A33.18 и сортом Rondo для оценки конкурентного заселения клубеньков интрогрессионной линии, несущей аллель *PsLykX^A*. Штамм A1 (*Rh. leguminosarum* bv. *viciae*, NodX+) применяли в контрольных опытах для подтверждения способности афганских и европейских генотипов образовывать клубеньки в присутствии О-ацетилированного Nod-фактора.

Штаммы RCAM1022 и RCAM1026 относятся к виду *Rhizobium ruizarguesonis* и не содержат гена *nodX*, проявляют устойчивость к антибиотику стрептомицину [162]. В более ранних работах и части коллекционных описаний могли быть отнесены к *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Штамм RCAM1022 использовали для сравнительной оценки способности генотипов гороха афганского и европейского типов к клубенькообразованию при инокуляции NodX–ризобиями. Штамм RCAM1026 применяли в опытах по функциональному анализу *PsLykX* методом CRISPR/Cas9, а также при апробации CAPS-маркера аллели *PsLykX^A*. Взаимодействие растений с данным штаммом служило фенотипическим тестом: отсутствие клубеньков у растений с афганской аллелью *PsLykX^A* соответствовало высокой симбиотической специфичности.

Для трансформации гипокотилей гороха и получения композитных растений с «бородатыми» корнями использовали штамм *Agrobacterium rhizogenes* ARqual, несущий бинарный вектор pKSE401-GFP с кассетой CRISPR/Cas9 для редактирования *PsLykX*. Трансформированные корни идентифицировали по экспрессии зеленого флуоресцентного белка GFP (green fluorescent protein). Данный штамм применяли для функциональной оценки роли *PsLykX* в формировании клубеньков после инокуляции растений штаммом RCAM1026.

2.1.4. Условия культивирования бактериального материала

Штаммы клубеньковых бактерий выращивали на твердой питательной среде 79 следующего состава, г/л: K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,1; дрожжевой экстракт – 0,4; маннит – 10; агар – 15; pH 7,0-7,2 при температуре 28 °С в течение 3 суток. Для приготовления инокулята бактериальную массу ресуспендировали в дистиллированной воде до концентрации около 10^7 КОЕ/мл. Инокуляцию растений в вегетационных опытах проводили в день высадки проростков в субстрат; в каждый сосуд объемом 2 л вносили 150 мл бактериальной суспензии.

Для инокуляции композитных растений гороха, полученных после трансформации *Agrobacterium rhizogenes*, штамм *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026 культивировали в жидкой среде ТУ, содержащей, г/л: триптон – 5; дрожжевой экстракт – 3; $CaCl_2$ – 0,5; pH 7,0-7,2, при 28 °С и аэрации 180 об/мин в течение 16-18 ч. при 28 °С до достижения оптической плотности OD600 0,5-0,8. Ночную культуру разводили стерильной водой в соотношении 1:4; итоговая концентрация клеток составляла не менее 10^6 КОЕ/мл. На первые сутки после переноса растений в стерильный песок под каждое растение вносили 15 мл подготовленной бактериальной суспензии.

Штамм *Agrobacterium rhizogenes* ARqual, несущий бинарный вектор pKSE401-GFP с кассетой CRISPR/Cas9 для редактирования гена *PsLykX*, культивировали на твердой среде YEP, следующего состава, г/л: пептон – 10; дрожжевой экстракт – 10; NaCl – 5; агар – 15; pH 7,0-7,2. Для селекции бактерий, несущих бинарную конструкцию, в среду добавляли канамицин в концентрации 100 мкг/мл. Культуру выращивали при 28 °С в течение 48 ч, после чего бактериальную массу использовали для трансформации проростков гороха.

В полевом опыте для предпосевной инокуляции использовали водную суспензию штамма *Rh. leguminosarum* bv. *viciae* ТОМ с концентрацией 10^8 КОЕ/мл. Семена помещали в пластиковый пакет и обрабатывали 5 мл суспензии на 100 семян; в контрольном варианте вместо инокулята использовали водопроводную воду.

2.1.5. Приборы и принадлежности

Для выполнения молекулярно-генетических исследований использовали стандартное лабораторное оборудование. Амплификацию фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). В отдельных сериях опытов по выявлению бактериальных генов *nodE* и *nodX* использовали амплификатор iCycler

(Bio-Rad, США). Работы, требующие стерильности проводили в ламинарных боксах БМБ-II-«Ламинар-С»-X NEOTERIC (ЗАО Ламинарные системы, Россия).

Разделение продуктов ПЦР и рестрикции осуществляли методом горизонтального электрофореза в 1-2% агарозном геле с использованием камер для горизонтального электрофореза Gel Electrophoresis Cell Model 150 (BioRad, США) и источника постоянного тока BioRad PowerPac Basic (Bio-Rad, США). Визуализацию фрагментов ДНК проводили в ультрафиолетовом или синем свете с применением системы гель-документации ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США) и Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad, США).

Для выделения ДНК из растительного материала, клубеньков и трансформированных корней использовали центрифуги-вортекс diaGene FV2800 (Диаэм, Россия), микроцентрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), настольную центрифугу 5910R (Eppendorf, Германия), термостаты ТТ-1 Гном (ДНК-Технология, Россия) и термошейкеры Innova 40 (New Brunswick Scientific, США). Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Для хранения образцов применяли низкотемпературные морозильные камеры при температуре -20°C LGPv 1420 (Liebherr, Швейцария) и -80°C Platilab Next 340V-4STD (Angelantoni Life Science, Италия).

Трансформированные корни гороха, экспрессирующие ген зеленого флуоресцентного белка GFP, получали в климатических камерах Fitotron SGC 120 (Weisstechnik, Германия) и идентифицировали при освещении синим светом с использованием флуоресцентного осветителя LUYOR-3415RG (LUYOR Instrument Co., Китай) и желтого светофильтра. Учет клубеньков, отбор корневого материала и оценку фенотипа трансформированных корней проводили с использованием бинокулярного микроскопа Stemi 305 (Carl Zeiss Stemi, Германия) и стандартных принадлежностей для работы с растительным материалом (коврик с разметкой, увеличительное стекло, линейка).

Для культивирования бактериальных культур применяли термостатируемые шейкеры Innova 40 (New Brunswick Scientific, США) и суховоздушные термостаты (Binder, США). Оптическую плотность жидких бактериальных культур измеряли спектрофотометрически при длине волны 600 нм на приборе NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Для стерилизации питательных сред, растворов и лабораторной посуды использовали паровой настольный автоклав 2540ML (Tuttnauer, Израиль).

В работе также использовали автоматические дозаторы переменного объема (Eppendorf, Германия), стерильные наконечники с фильтрами (Vertex, Россия), микропробирки объемом 0,2 и 1,5 мл, чашки Петри (ServiceBio, Китай), конические колбы, стеклянные (Химмед, Россия) и пластиковые контейнеры для стерильного выращивания растений Microbox TP750+TPD750 (SacO2, Бельгия).

2.2. Методы

2.2.1. Методы генетической инженерии

Для функционального анализа гена *PsLykX* применяли систему геномного редактирования CRISPR/Cas9 в модели композитных растений гороха с трансформированными «бородатыми корнями» («hairy roots»). В качестве основы использовали бинарный вектор pKSE401, обеспечивающий экспрессию эндонуклеазы Cas9 и направляющих РНК (гРНК, sgRNA). Для визуального отбора трансформированных корней в вектор была введена кассета экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка GFP под контролем промотора *rolD* (рисунок 2.1).

Конструирование вектора pKSE401-rolD-GFP-PsLykX-T1-T2

Фрагмент, включающий промотор *rolD*, кодирующую последовательность *GFP* и терминатор *T35S*, амплифицировали из вектора pB7WG2D. Для амплификации использовали праймеры *rolD_BsaI-EcoRI_FOR* и *P-T35S_BsaI-EcoRI_REV1*, содержащие сайты рестрикции *BsaI* и *EcoRI*. Полученный фрагмент расщепляли эндонуклеазой *BsaI* и клонировали в *EcoRI*-сайт вектора pKSE401. В результате была получена конструкция pKSE401-GFP, позволяющая идентифицировать трансформированные корни по флуоресценции GFP (таблица 2.3).

Для направленного редактирования *PsLykX* были выбраны две мишени в первом экзоне гена (рисунок 2.2). Последовательности направляющих РНК подбирали с учетом присутствия РАМ-мотива SpCas9 типа 5'-NGG-3'. Направляющая РНК T1 находилась под контролем промотора U6-26, а направляющая РНК T2 – под контролем промотора U6-29. Кассеты гРНК клонировали в вектор pKSE401-GFP через сайты рестрикции *BsaI* в соответствии с протоколом Ксинга (Xing et al.) [164]. Корректность вставки целевых последовательностей подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

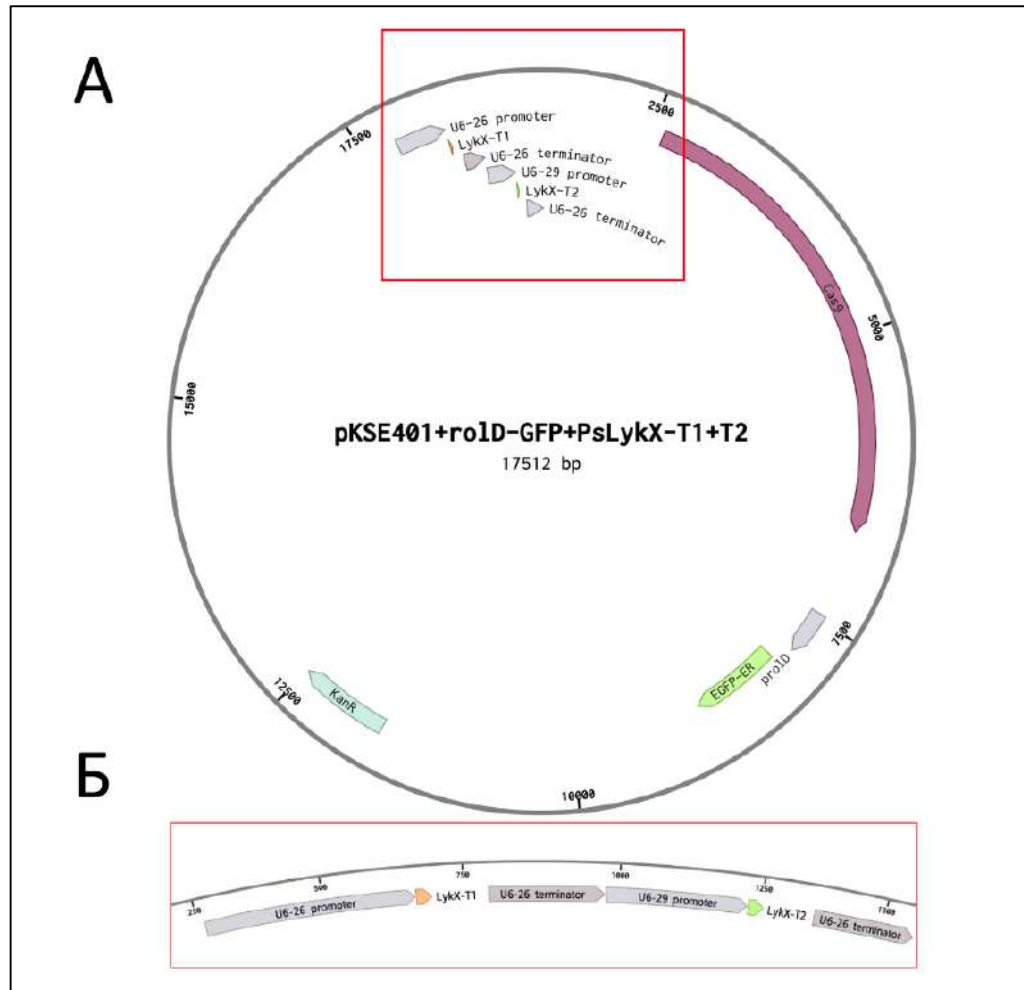


Рисунок 2.1 – Схема CRISPR/Cas9-вектора pKSE401+rolD-GFP+PsLykX-T1+T2, использованного для направленного редактирования гена *PsLykX*: А – общая карта вектора; Б – увеличенный участок расположения направляющих РНК Т1 (LykX-T1) и Т2 (LykX-T2), промоторов U6-26 и U6-29

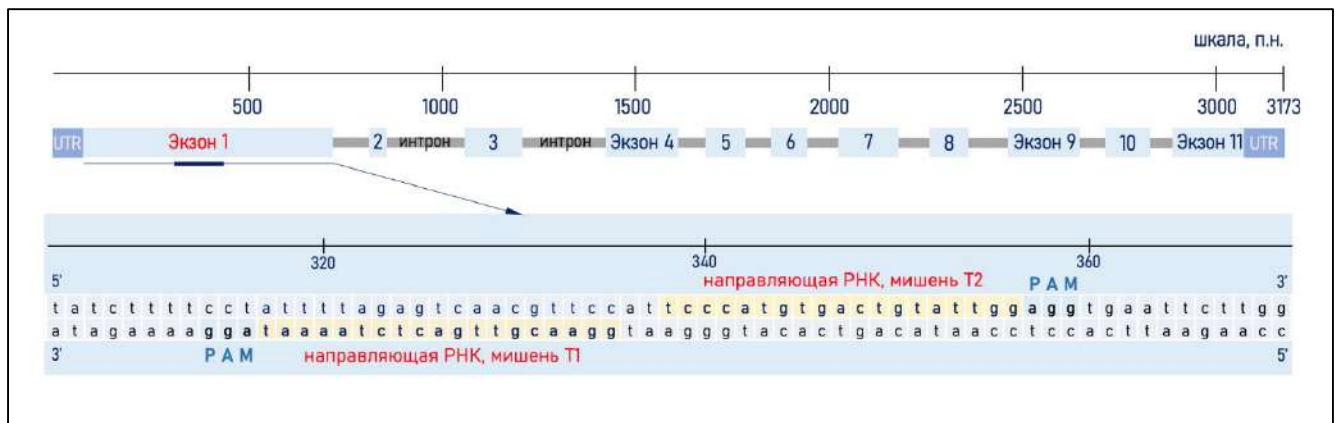


Рисунок 2.2 – Схематическое изображение структуры гена *PsLykX* и мишеней CRISPR/Cas9 (Т1, Т2): структура гена *PsLykX* показана с экзонами (прямоугольники) и интронами (линии), расположенными вдоль геномной последовательности; на обоих концах указаны нетранслируемые области (UTR). Масштаб указан в парах оснований (п. н.) [23]

Таблица 2.3 – Олигонуклеотиды и направляющие РНК, использованные при создании CRISPR/Cas9-конструкции и анализе редактирования *PsLykX*

Назначение	Наименование	Последовательность, 5'–3'
Амплификация кассеты rolD-GFP-T35S	prolD_BsaI-EcoRI_FOR	ATATATGGTCTCGAATTCAGGAGATCAGCTTGGCTCTAGTCG
Амплификация кассеты rolD-GFP-T35S	P-T35S_BsaI-EcoRI_REV1	ATTATTGGTCTCGAATTCGATCCAAGCTCAAGCTAAGCTTGC
Мишень гРНК в первом экзоне <i>PsLykX</i>	T1	GG AAC GTT GAC TCT AAA AT
Мишень гРНК в первом экзоне <i>PsLykX</i>	T2	TCC CAT GTG ACT GTA TTG G
ПЦР-анализ целевого участка <i>PsLykX</i>	PsLykX_5UTR_for	CAA AAC AAA CTC TTT CTT TGC TTC TAT
ПЦР-анализ целевого участка <i>PsLykX</i>	PsLykX_1intron_rev	CAT TTG TAT CAA ACA CAG TTG AGC A

Примечание: последовательности T1 и T2 приведены без РАМ-мотива

Биоинформатическая оценка нецелевых сайтов (off-targets)

Потенциальные внецелевые сайты для обеих гРНК анализировали с использованием программ Cas-OFFinder [165] и CRISPOR [166] относительно референсного генома гороха *Pisum sativum* v1a (v1a from URGI, BioSample: SAMEA5358931). При анализе учитывали последовательности с РАМ-мотивом 5'-NGG-3' и допускали до трех несовпадений между гРНК и потенциальным участком-мишенью без вставок и делеций.

Для мишени T2 был выявлен единственный полностью комплементарный участок с РАМ-мотивом NGG, соответствующий целевой последовательности *PsLykX*. Для T1 обнаруживали дополнительный полностью комплементарный участок, локализованный в некодирующей области генома. Дополнительно были выявлены потенциальные сайты с РАМ-мотивом NAG, расположенные в межгенных областях. Поскольку прогнозируемые внецелевые мишени не затрагивали кодирующие последовательности генов, их влияние на наблюдаемый фенотип считали маловероятным.

Перенос CRISPR/Cas9-конструкции в *Agrobacterium rhizogenes*

Полученную конструкцию pKSE401-GFP, содержащую кассеты гРНК T1 и T2, переносили в клетки *Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 [167] методом замораживания-оттаивания [168]. Трансформированные бактериальные клетки отбирали на твердой среде YEP с добавлением канамицина. Наличие вектора в бактериальной культуре контролировали молекулярно-генетическими методами.

Получение композитных растений в системе «бородатых корней»

Для трансформации использовали семидневные проростки сорта гороха Caméor. Гипокотиль каждого проростка прокалывали стерильной иглой, после чего в область ранения наносили бактериальную массу *A. rhizogenes* ARqua1, несущую конструкцию pKSE401-GFP-*PsLykX*-T1-T2 (рисунок 2.3). Обработанные проростки переносили на питательную среду Fahraeus и культивировали в течение 7 суток до формирования каллусной ткани в зоне инокуляции [103,163].

После предварительного культивирования проростки пересаживали в стерильный песок и выращивали до развития корневой системы. Через 21 сутки после переноса растений в субстрат корни освобождали от песка и анализировали на наличие флуоресценции GFP. Для последующих исследований отбирали GFP-положительные корни длиной более 4,5 см. Нетрансформированные корни, развившиеся на тех же композитных растениях, использовали как внутренний контроль (Приложение Б).

Выделение ДНК и ПЦР-анализ редактируемого участка *PsLykX*

Геномную ДНК из индивидуальных GFP-положительных и контрольных нетрансформированных корней выделяли с использованием набора Plant DNA Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для амплификации участка первого экзона *PsLykX*, содержащего обе CRISPR/Cas9-мишени, применяли праймеры *PsLykX_5UTR_for* и *PsLykX_1intron_rev* (таблица 2.3). Длина ампликона соответствовала ожидаемому 777 п. н.

Анализ ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Tersus DNA Polymerase (Евроген, Россия). Реакционная смесь объемом 25 мкл включала: 0,5 мкл 50X фермента Tersus DNA polymerase; 5 мкл 5X буфера Tersus Red; 0,5 мкл смеси dNTP в концентрации 10 мМ каждого нуклеотид; по 2 мкл каждого праймера с концентрацией 10 пМ/мкл; 1 мкл матричной ДНК с концентрацией 30 нг/мкл; и 14 мкл воды, свободной от нуклеаз. Амплификацию осуществляли по следующей программе: начальная денатурация при 95 °С в течение 3 мин; 34 цикла, включавших денатурацию при 95 °С в течение 30 с, отжиг праймеров при 55 °С в течение 30 с и элонгацию при 72 °С в течение 1 мин; заключительная элонгация при 72 °С в течение 5 мин. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле.

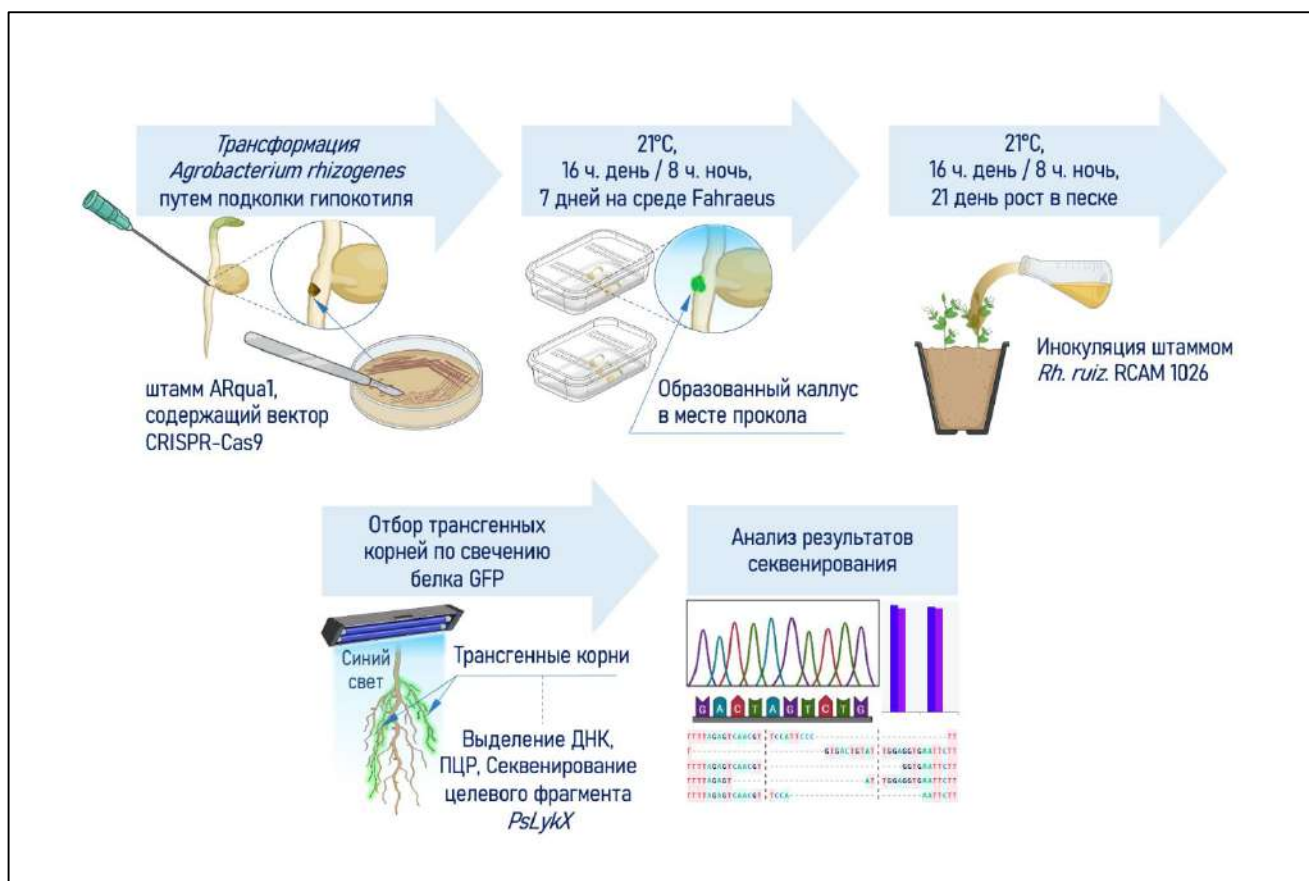


Рисунок 2.3 – Процесс получения трансгенных корней гороха путем трансформации с помощью *Agrobacterium rhizogenes* в системе «бородатых корней»: проростки гороха были трансформированы путем прокалывания hypocotilia с использованием *A. rhizogenes*, несущей конструкцию CRISPR/Cas9, нацеленную на *PsLykX*. Затем проростки были выращены на среде Fahraeus, пересажены в стерильный песок и инокулированы *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026. Через 21 день оценивали образование клубеньков, выявляли GFP-положительные корни, а редактирование генома подтверждали с помощью ПЦР и секвенирования целевого участка [23]

Секвенирование и оценка эффективности редактирования

Ампликоны целевого участка *PsLykX* подвергали секвенированию по Сэнгеру на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные хроматограммы сравнивали с последовательностью гена *PsLykX* сорта Caméor (GenBank MF135533.1).

Для оценки частоты инсерций и делеций в зоне редактирования использовали сервис EditCo ICE Analysis (Synthego, Редвуд, США). В качестве контрольной последовательности применяли ампликон *PsLykX*, полученный из нетрансформированных корней сорта Caméor.

Эффективность редактирования оценивали по доле последовательностей, содержащих инсерции и делеции в области мишеней T1 и T2.

2.2.2. Молекулярно-генетические методы

Молекулярно-генетические исследования включали выделение ДНК из листьев гороха, клубеньков и трансформированных корней, ПЦР-амплификацию целевых фрагментов, CAPS-генотипирование аллелей *PsLykX*, выявление генов *nodE* и *nodX* в ДНК клубеньков, рестрикционный анализ и секвенирование по Сэнгеру.

Выделение ДНК из растительного материала

Для CAPS-генотипирования и анализа аллельного состояния гена *PsLykX* геномную ДНК выделяли из листьев индивидуальных растений гороха с использованием набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Для анализа отбирали по одному листу с каждого растения в фазе двух-трех настоящих листьев. Концентрация выделенных препаратов ДНК составляла 30-100 нг/мкл.

ДНК из GFP-положительных и нетрансформированных корней композитных растений сорта Caméog выделяли с использованием набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Полученную ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации участка первого экзона гена *PsLykX*, содержащего мишени CRISPR/Cas9; условия данного анализа приведены в подразделе 2.2.1.

Выделение ДНК из клубеньков

Для анализа бактериального состава клубеньков клубеньки, полученные от растений одной биологической повторности, объединяли, стерилизовали 96%-ным этанолом, помещали в криопробирки с глицерином и хранили при -80°C до выделения ДНК.

Индивидуальные клубеньки растирали стерильным шпателем в 400 мкл буфера LBX (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2,5 mM EDTA, pH 8,0; 0,25% SDS) в микропробирках объемом 1,5 мл. Образцы инкубировали при 65°C в течение 20 мин, после чего добавляли 400 мкл хлороформа и центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли изопропанол в объеме 0,9 объема образца, перемешивали переворачиванием и центрифугировали при $12000 \times g$ в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок промывали 400 мкл охлажденного 70%-ного этанола и повторно центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин. Осадок высушивали на воздухе, растворяли в воде Milli-Q и хранили при -80°C .

Анализ аллельного состояния гена *PsLykX*

Для идентификации афганской аллели *PsLykX^A* использовали CAPS-маркер, основанный на однонуклеотидной замене с.227C> A в первом экзоне гена *PsLykX*. У носителей аллели *PsLykX^A* данная замена создает сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции Hpy188III, отсутствующий у европейского варианта *PsLykX^E*.

Для амплификации участка, содержащего полиморфный сайт с.227C>A, использовали две пары праймеров: A1/B1 и A2/B2. Праймеры A1/B1 амплифицировали фрагмент длиной 381 п. н., праймеры A2/B2 – фрагмент длиной 208 п. н. Последовательности праймеров приведены в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Праймеры, использованные для CAPS-анализа гена *PsLykX* и выявления генов *nodE* и *nodX*

Ген или анализируемый участок	Праймер	Последовательность, 5'–3'	Размер ампликона, п. н.
<i>PsLykX</i> , CAPS-маркер	A1	СТААТАТТТАGCTTACTATTGTTTCTG	381
<i>PsLykX</i> , CAPS-маркер	B1	CAAAACTTGAAGTCAAACTTGC	
<i>PsLykX</i> , CAPS-маркер	A2	GCTTCTTACCATGTCATGCCTGCA	208
<i>PsLykX</i> , CAPS-маркер	B2	ACACATGTCCCAAGAATTCACCTCCA	
<i>nodE</i>	nodE-F	CACCGATGCTTCCTCTATCTGGAC	1146
<i>nodE</i>	nodE-R	AACGCAAGGACAGCATTTCAT	
<i>nodX</i>	nodX-F	GATGAATGCCACTTTCACAGTAAG	555
<i>nodX</i>	nodX-R	CAGATACTGCAAGATGCCGGTA	

Анализ ПЦР для CAPS-анализа проводили в объеме 50 мкл с использованием набора 5× ScreenMix-HS (Евроген, Москва, Россия). Реакционная смесь включала 10,0 мкл 5× ScreenMix-HS, по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров в концентрации 10 мкМ, 4,0 мкл матричной ДНК и 31,0 мкл деионизированной воды, свободной от нуклеаз.

Амплификацию осуществляли на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующей программе: предварительная денатурация при 95 °C в течение 30 с; 35 циклов, включавших денатурацию при 95 °C в течение 30 с, отжиг праймеров при 55 °C в течение 30 с и элонгацию при 72 °C в течение 60 с; заключительная элонгация при 72 °C в течение 5 мин.

Для повышения специфичности при амплификации некоторых образцов применяли вариант тагдаун-ПЦР (Touchdown-PCR, TD-PCR). После предварительной денатурации при 95°C в течение 30 с проводили семь циклов с последовательным снижением температуры отжига с 62 до 56 °C на 1 °C в каждом цикле. Далее выполняли остальные циклы при температуре отжига 55

°C. Условия денатурации, элонгации и заключительной элонгации соответствовали стандартному протоколу ПЦР [25].

Полученные ампликоны подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции Hpy188III (New England Biolabs, США) в буфере CutSmart. Реакционная смесь объемом 31,5 мкл включала: 15 мкл ПЦР-продукта; 3 мкл 10X буфера CutSmart; 0,5 мкл фермента Hpy188III; и 13 мкл деионизированной воды. Для контрольных образцов рестрикцию проводили при 37 °C в течение 1 ч с последующей инактивацией фермента при 65 °C в течение 25 мин. При генотипировании популяции F₂ (Frisson × NGB2150) продолжительность гидролиза увеличивали до 10 ч (ночь).

Продукты рестрикции разделяли электрофорезом в 2,5% агарозном геле в 1X TAE-буфере в течение 30 мин при 100W. У носителей афганской аллели *PsLykX^A* ампликон длиной 381 п. н., полученный с праймерами A1/B1, гидролизовался на фрагменты длиной 217 и 164 п. н.; ампликон длиной 208 п. н., полученный с праймерами A2/B2, на фрагменты длиной 127 и 81 п. н. У носителей европейской аллели *PsLykX^E* продукты ПЦР не подвергались гидролизу при действии эндонуклеазы рестрикции Hpy188III и их размер сохранялся неизменным. Гетерозиготные растения идентифицировали по наличию одновременно нерасщепленного и рестрикционных фрагментов.

ПЦР-анализ генов *nodE* и *nodX* на матрице ДНК клубеньков

Для определения присутствия бактерий, содержащих ген *nodX*, в клубеньках проводили отдельную ПЦР-амплификацию фрагментов генов *nodE* и *nodX*. Ген *nodE*, присутствующий у исследованных штаммов ризобий, использовали в качестве положительного контроля качества бактериальной ДНК. Наличие ампликона *nodE* при отсутствии продукта *nodX* интерпретировали как отсутствие в данном клубеньке ризобий с аллелью *nodX*, распознаваемой использованными праймерами (таблица 2.4).

Анализ ПЦР проводили на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США) с использованием набора ScreenMix-HS (Евроген, Россия). Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл ScreenMix-HS; по 0,75 мкл прямого и обратного праймеров в концентрации 3,3 мкМ; 1,0 мкл матричной ДНК; и 5,5 мкл воды, свободной от нуклеаз.

Амплификацию проводили по следующей программе: первоначальная денатурация при 95 °C в течение 5 мин; 35 циклов, включавших денатурацию при 95 °C в течение 30 с, отжиг праймеров при 64 °C в течение 30 с и элонгацию при 72 °C в течение 30 с; заключительная элонгация при 72 °C в течение 5 мин. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Для различения аллельных вариантов *nodX* ампликоны подвергали рестрикционному анализу с использованием эндонуклеазы RsaI (СибЭнзим, Россия). Ампликон *nodX*, полученный на ДНК штамма ТОМ и клубеньков, занятых этим штаммом, содержал сайт узнавания RsaI и

расщеплялся на два фрагмента. Ампликон аллели *nodX*, характерной для штамма A1, не содержал данного сайта и после обработки *RsaI* сохранялся нерасщепленным. Результаты рестрикции анализировали в 2%-ном агарозном геле.

Секвенирование и анализ последовательностей

Для подтверждения аллельного состояния *PsLykX*, проверки вставок и делеций после CRISPR/Cas9-редактирования, а также верификации отдельных ПЦР-продуктов применяли секвенирование по Сэнгеру. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США) в Ресурсном центре генетической инженерии (РЦГИ) НТУ «Сириус».

Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали с референсными последовательностями *PsLykX* европейского сорта Caméor (GenBank MF135533.1). Анализ хроматограмм и идентификацию однонуклеотидных замен, инсерций и делеций проводили с использованием программ для просмотра и выравнивания последовательностей EditCo ICE Analysis (Synthego, Редвуд, США).

Полногеномное секвенирование

Для сравнительного анализа интрогрессионной линии A33.18 и ее родительских генотипов – NGB2150 и Rondo, готовили shotgun-библиотеки геномной ДНК с использованием набора TruSeq DNA PCR-Free Kit. Секвенирование выполняли на платформе Illumina NovaSeq 6000 с получением парноконцевых прочтений длиной 150 п. н.

Контроль качества прочтений проводили в программе FastQC. Адаптерные последовательности и низкокачественные участки удаляли с использованием BBDuk из пакета BBTools. Отфильтрованные прочтения картировали на референсный геном сорта Frisson с применением алгоритма bwa mem. Однонуклеотидные замены и инсерции/делеции выявляли программой bcftools для диплоидного генома; варианты с показателем качества менее 20 исключали из дальнейшего анализа. Функциональные последствия выявленных вариантов оценивали с помощью программы SnpEff.

Для выявления участков генома, унаследованных линией A33.18 от афганского сорта, отбирали варианты, общие для A33.18 и NGB2150, но отличающиеся от Rondo. Для последующего анализа исключали варианты, расположенные в межгенных, интронных, вышележащих и нижележащих областях. Функциональную аннотацию генов проводили с использованием сервисов Mercator4 и EggNOG, анализ обогащения онтологическими категориями GO в пакете topGO среды R.

2.2.3. Выделение и первичный отбор аборигенных штаммов клубеньковых бактерий, совместимых с горохом афганского симбиотического типа

Для выявления аборигенных штаммов клубеньковых бактерий, способных формировать симбиоз с горохом афганского типа, использовали почвенные образцы различного происхождения. Почву отбирали в районах п.г.т. Пронск Рязанской области (3 образца), на территории ВНИИСХМ (Санкт-Петербург) (1 образец), а также в окрестностях села Красная Поляна (Краснодарский край) (2 образца). В качестве растительной ловушки для выделения ризобий применяли линию гороха NGB2150.

Для приготовления почвенной вытяжки, 20 г почвы измельчали в ступке и помещали в стеклянный стакан, после чего добавляли 100 мл однократного фосфатно-солевого буфера PBS, содержащего г/л: NaCl – 8,0; KCl – 0,20; Na₂HPO₄ – 1,44; KH₂PO₄ – 0,24; pH 7,4. Смесь перемешивали на магнитной мешалке и фильтровали через бумажный фильтр.

Семена линии NGB2150 проращивали на 1%-ном агаре в течение 4 суток. Проростки высаживали в сосуды со стерильным песком, предварительно изолированные от света. Растения поливали безазотным раствором минерального питания, следующего состава, г/л: MgSO₄×7H₂O – 1; K₂HPO₄ – 1; H₃BO₃ – 0,005; KI – 0,0005; KBr – 0,0006; NaCl – 0,0003; ZnSO₄ × 7H₂O – 0,0002; CuSO₄ – 0,0004; MnSO₄ – 0,0002. Для инокуляции в прикорневую зону каждого растения вносили по 2 мл соответствующей почвенной вытяжки.

Через 4 недели после инокуляции растения извлекали из субстрата, корневую систему промывали водой и проводили учет сформировавшихся клубеньков. Клубеньки разделяли по окраске и морфологическим особенностям. Для выделения бактериальных изолятов клубеньки поверхностно стерилизовали 70%-ным этанолом, промывали стерильной водой, разрезали стерильным скальпелем и высевали истощающим штрихом на твердую питательную среду 79. Чашки Петри инкубировали при 28 °С в течение 2-3 суток. Полученные колонии пересеивали на свежую среду 79 для получения отдельных бактериальных культур.

Первичную оценку симбиотической эффективности выделенных изолятов проводили на линии NGB2150. Бактериальные культуры выращивали в течение 16-18 ч в 50 мл жидкой среды ТУ при 28 °С и перемешивании со скоростью 180 об/мин. Семена линии NGB2150 стерилизовали концентрированной серной кислотой, проращивали на 1%-ном агаре в течение 3-5 суток при 22 °С в темноте и высаживали в стерильные сосуды объемом 500 мл, заполненные стерильным песком.

Перед инокуляцией ночные культуры разводили в 50 мл стерильной дистиллированной воды. Полученную бактериальную суспензию вносили в прикорневую зону растений. В качестве

отрицательного контроля использовали растения, обработанные стерильной водой и выращенные на безазотном растворе минерального питания. Дополнительно использовали контроль с внесением доступного источника азота, позволяющий сопоставить развитие инокулированных растений с ростом при минеральном азотном питании.

Растения выращивали в климатической камере Fitotron SGC 120 (Weisstechnik, Германия) при температуре 21 °С, фотопериоде 16 ч и относительной влажности воздуха 70%. Через 4 недели после инокуляции учитывали количество и окраску клубеньков, а также определяли сухую массу побегов и корневой системы. Для определения сухой массы растения высушивали до постоянной массы.

Штаммы, выделенные из клубеньков линии NGB2150 и обеспечивавшие формирование клубеньков в условиях дефицита доступного азота, рассматривали как кандидаты для дальнейшего изучения. Их эффективность оценивали по совокупности показателей клубенькообразования, развития корневой системы и накопления надземной биомассы относительно неинокулированного контроля и контроля с минеральным азотом. Для длительного хранения перспективные бактериальные изоляты культивировали в среде TY до экспоненциальной фазы роста, смешивали с глицерином до его конечной концентрации 50%, разливали в криопробирки и хранили при –80 °С.

2.2.4. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программной среде R. Уровень статистической значимости для всех проверяемых гипотез принимали равным $\alpha = 0,05$. Визуализацию результатов выполняли с использованием пакета ggplot2: версии 3.5.1 для данных полевого эксперимента и версии 3.4.4 для отдельных результатов молекулярно-генетического анализа.

В опыте с нестерильной почвой число биологических повторностей составляло $n = 6$ для каждого варианта. В опытах на стерильном кварцевом песке с инокуляцией штаммами RCAM1022, TOM и A1 анализировали не менее пяти растений в каждом варианте ($n \geq 5$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$; на рисунках уровни значимости обозначали как * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ и *** - $p < 0,001$.

Полевой эксперимент с линией A33.18 и сортом Rondo проводили в трех биологических повторностях для каждого сочетания «генотип – инокуляция». Каждая повторность включала 30 семян. Через 7,5 недель после посева и инокуляции учитывали число свежих клубеньков, а также

сухую массу побегов и корней. Для параметрического анализа данные по числу клубеньков предварительно логарифмировали с целью приближения их распределения к нормальному. Различия между вариантами оценивали с использованием t-критерия Уэлча. В анализе показателей полевого опыта число учтенных растений составляло не менее 11 в варианте ($n \geq 11$). В частности, при сравнении сухой массы инокулированных растений линии A33.18 и сорта Rondo статистически значимые различия были выявлены для массы побегов при $p < 0,001$ и для массы корней при $p < 0,01$.

При функциональном анализе *PsLykX* на композитных растениях сорта Caméog сравнивали число клубеньков на единицу длины корня у GFP-положительных трансформированных и GFP-отрицательных нетрансформированных корней, сформированных на одних и тех же растениях. Трансформации подвергали 15 растений; у 8 растений были получены GFP-положительные корни. Для статистического анализа отобрали 13 трансформированных корней длиной более 4,5 см и 43 нетрансформированных контрольных корня.

Нормальность распределения данных оценивали критерием Шапиро-Уилка. Для контрольных нетрансформированных корней распределение числа клубеньков на единицу длины корня отклонялось от нормального ($W = 0,89$; $p = 7,51 \times 10^{-4}$). В группе трансформированных корней все значения числа клубеньков были равны нулю, вследствие чего дисперсия отсутствовала, и формальная проверка нормальности не проводилась. Однородность дисперсий оценивали критерием Левена [169]; между группами были выявлены статистически значимые различия дисперсий ($F = 12,75$; $p = 7,58 \times 10^{-4}$).

В связи с нарушением условий параметрического анализа для сравнения трансформированных и контрольных корней применяли U-критерий Манна-Уитни, или критерий ранговых сумм Уилкоксона [170,171]. Трансформированные GFP-положительные корни не образовывали клубеньков, тогда как в контрольной группе клубенькообразование сохранялось. Различия между группами были статистически значимыми: $W = 26$; $p = 6,17 \times 10^{-7}$. Размер эффекта рассчитывали в виде коэффициента ранговой корреляции ($r = 0,67$).

Результаты параметрических сравнений представляли в виде среднего арифметического и стандартного отклонения либо стандартной ошибки среднего, в соответствии с типом представления на конкретном рисунке или в таблице. Для данных, анализируемых непараметрическими методами, приводили индивидуальные значения наблюдений, медиану и межквартильный размах при необходимости. Число биологических повторностей и объем выборки указывали в подписях к рисункам и таблицам.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Определение роли гена *PsLykX* в бобово-ризобийном симбиозе с использованием метода CRISPR/Cas9

Ранее было установлено, что мутации в гене *PsLykX* приводят к снижению числа образуемых клубеньков [22]. Однако, все доступные (и исследованные) мутантные линии несли миссенс-мутации, приводящие к заменам аминокислот в последовательности белка *PsLykX* и, предположительно, не полностью нарушающие работу данной рецептороподобной киназы. Для более точной оценки роли *PsLykX* в формировании бобово-ризобийного симбиоза был использован подход направленного нокаута гена технологией CRISPR/Cas9 в системе композитных растений гороха с трансформированными «бородатыми корнями» [23].

3.1.1. Влияние нокаута *PsLykX* на клубенькообразование

Для прямой функциональной проверки роли *PsLykX* в формировании клубеньков было проведено CRISPR/Cas9-редактирование первого экзона данного гена в трансформированных волосистых корнях гороха сорта Caméor. Данный сорт несет европейскую аллель *PsLykX^E* и в норме способен образовывать клубеньки при инокуляции совместимым штаммом *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026 [162]. Поэтому нарушение клубенькообразования на отредактированных корнях могло рассматриваться как прямое указание на функциональную значимость *PsLykX*.

После агробактериальной трансформации *Agrobacterium rhizogenes* и инокуляции штаммом RCAM1026 на всех трансгенных корнях (GFP-положительных), несущих CRISPR/Cas9-конструкцию, клубеньки отсутствовали. Напротив, на контрольных корнях (GFP-отрицательных) тех же растений клубенькообразование сохранялось. Этот результат показывает, что отсутствие клубеньков не было связано с общим физиологическим состоянием растения, неэффективностью инокуляции или неспособностью сорта Caméor к симбиозу. Нарушение клубенькообразования проявлялось именно на трансгенных корнях, в которых ожидали нокаут *PsLykX* (рисунок 3.1) [23].

Суммарно, GFP-положительные корни были получены у 8 из 15 обработанных растений. Для дальнейшего анализа были отобраны 13 трансформированных корней длиной более 4,5 см.

В качестве внутреннего контроля использовали 43 GFP-отрицательных корня, сформированных на тех же композитных растениях (рисунок 3.2).

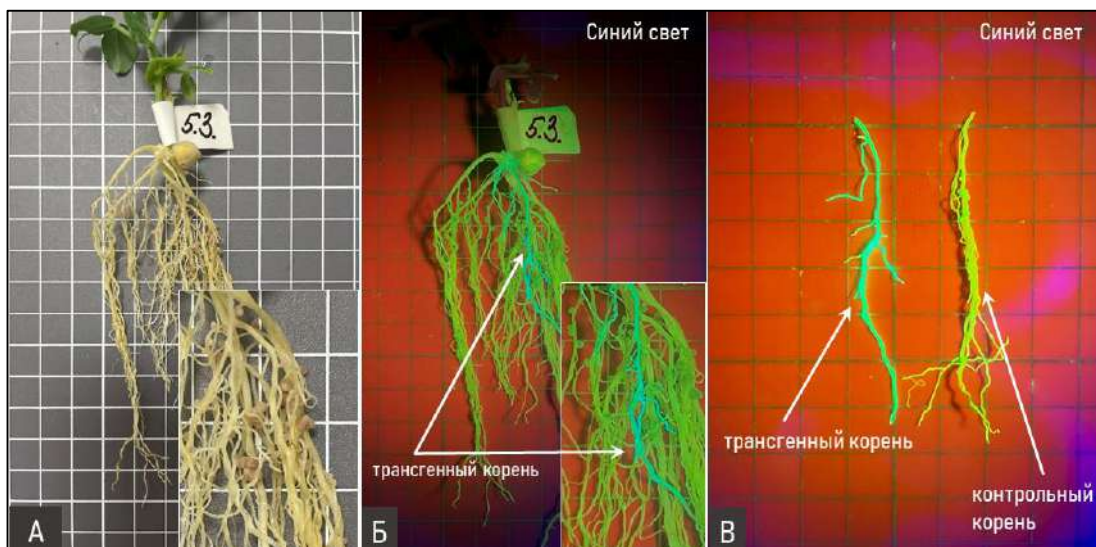


Рисунок 3.1 – Визуализация корней гороха после трансформации с помощью *Agrobacterium rhizogenes* (поколение T0): А – растение после 21 дня роста в песке, инокулированном *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026; Б – корневая система при синем освещении, снятая через желтый фотофильтр: наблюдаемая флуоресценция GFP в трансгенном корне; В – трансгенный корень в сравнении с нетрансгенным контрольным корнем при синем освещении [23]

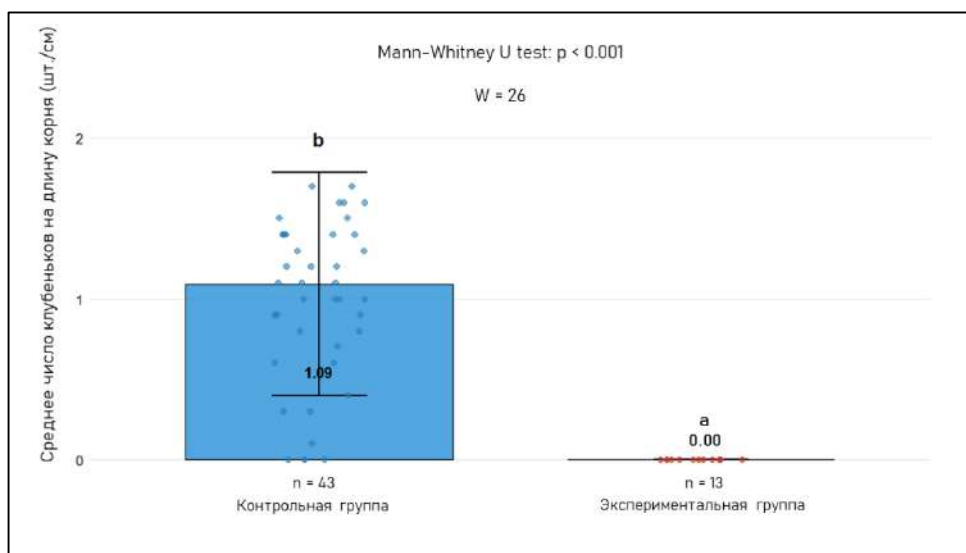


Рисунок 3.2 – Сравнение среднего количества клубеньков в контрольной (не трансгенной, отрицательный контроль, $n_1 = 43$) и трансгенной (GFP-положительной, экспериментальной, $n_2 = 13$) группах образцов корней. Столбцы представляют собой среднее значение стандартное отклонение, с указанием отдельных точек данных количества клубеньков. Трансгенные корни показали нулевую вариативность по количеству клубеньков (все значения = 0). Разные буквы (a, b) указывают на статистически значимые различия между группами (Манн–У-критерий Манна – Уитни: $W = 26$, $p < 0,001$) [23]

Для подтверждения связи наблюдаемого фенотипа с редактированием *PsLykX* был проведен анализ целевого участка гена в GFP-положительных корнях. Секвенирование ампликонов и последующий анализ хроматограмм показали наличие инсерций и делеций в области мишеней T1 и T2 (рисунок 3.3, Приложение Б). В контрольных корнях, сформировавших клубеньки, признаков редактирования выявлено не было. Следовательно, отсутствие клубеньков на трансформированных корнях сопровождалось мутационными изменениями в целевом участке *PsLykX* (Приложение В).

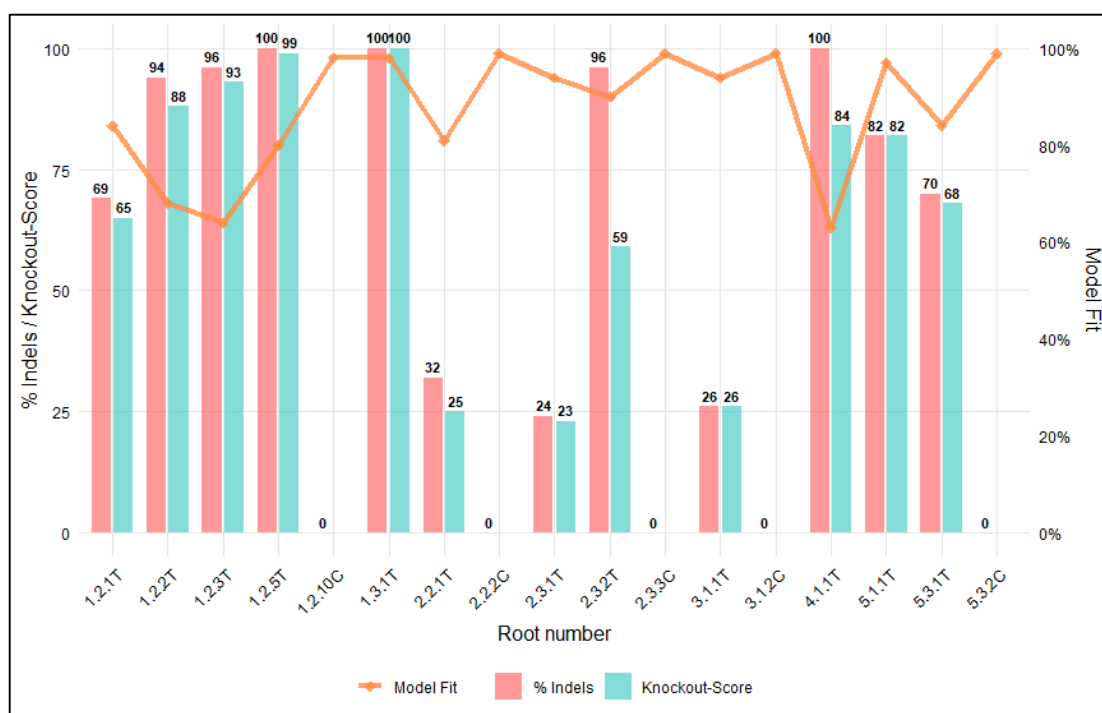


Рисунок 3.3 – Анализ параметров эффективности редактирования CRISPR/Cas9 в образцах корней: 1.2.1 T – горшок № 1, растение № 2, корень № 1; буква «Т» обозначает трансгенный корень, а «С» – контрольный (не трансгенный) корень. Контрольные корни не совпадают с каждым образцом из трансгенной группы. Для секвенирования были выбраны пять случайных не трансгенных корней. Модель Fit (точность прогнозирования) – коэффициент корреляции Пирсона, показывающий, насколько хорошо модель ICE соответствует данным секвенирования (чем выше показатель, тем больше уверенность в результатах), Knockout-Score (эффективность редактирования) и % инделов (частота мутаций) в корневых образцах; Model Fit, Knockout-Score, % Indels были рассчитаны с помощью EditCo ICE [23]

Полученные данные указывают на прямую связь между нарушением структуры *PsLykX* и потерей способности корня к образованию клубеньков. Особенно важно, что контрольные корни на тех же растениях сохраняли способность к нормальному симбиозу. Следовательно, эффект нокаута проявлялся локально, на уровне трансформированной корневой ткани, и не был обусловлен общим нарушением развития растения.

Следует учитывать, что система трансформации «hairy roots» может приводить к мозаичности редактирования, поскольку отдельные клетки одного корня могут различаться по составу мутаций. Поэтому значения доли инделов (например, 29%), рассчитанные по суммарной ДНК корня, не следует трактовать как абсолютную долю мутантных клеток во всей ткани. Тем не менее полное отсутствие клубеньков на всех GFP-положительных корнях, в которых были выявлены мутации целевого участка, свидетельствует о высокой функциональной значимости *PsLykX* для запуска или прохождения ранних стадий клубенькообразования.

Таким образом, направленный нокаут *PsLykX* приводил к утрате способности трансформированных корней гороха образовывать клубеньки при инокуляции совместимым штаммом RCAM1026. Эти данные являются прямым функциональным подтверждением участия *PsLykX* в бобово-ризобийном симбиозе и дополняют генетические данные, связывающие аллельные варианты данного гена с различиями в симбиотической специфичности гороха [16,17,23].

3.1.2. Обсуждение функциональной роли *PsLykX* как рецепторного компонента симбиоза

Результаты CRISPR/Cas9-редактирования подтверждают, что *PsLykX* является функционально значимым геном, необходимым для клубенькообразования (по крайней мере, для симбиотической пары «сорт гороха Caméor - штамм *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026»). Нокаут *PsLykX* в трансформированных корнях сорта Caméor приводил к отсутствию клубеньков после инокуляции совместимым штаммом RCAM1026, тогда как на нетрансформированных корнях тех же растений клубеньки формировались. Таким образом, полученные данные дополняют ранее установленную генетическую связь *PsLykX* с локусом *Sym2* прямым функциональным подтверждением его участия в развитии симбиоза [16,17].

Белок *PsLykX* относится к LysM-рецептороподобным киназам и содержит внеклеточные LysM-домены, трансмембранный участок и внутриклеточный киназный домен. Рецепторы этого класса участвуют в распознавании липохитоолигосахаридных Nod-факторов и передаче сигнала, инициирующего инфекцию корня и образование клубеньков. Аналогичную функцию выполняет рецептор MtLYK3 у *Medicago truncatula*, контролирующей восприятие Nod-факторов и развитие инфекционной нити [12,19].

Расположение *PsLykX* в области локуса *Sym2* и полиморфизм его аллелей согласуются с участием гена в контроле симбиотической специфичности. Афганские генотипы гороха несут варианты *PsLykX*, отличающиеся от европейских форм, в том числе заменами в первом экзоне,

кодирующем внеклеточную часть рецептора [16,17]. Эти различия могут определять распознавание О-ацетилированного Nod-фактора, синтез которого зависит от бактериального гена *nodX*. Следовательно, *PsLykX* участвует не только в формировании общего симбиотического ответа, но и в определении спектра совместимых штаммов ризобий.

Полученные результаты дополняют модель многоуровневого распознавания Nod-факторов у гороха. Ранее было показано, что рецептор *PsSym37* участвует в восприятии различий в жирнокислотном остатке Nod-фактора, определяемых геном *nodE*, но не объясняет афганский фенотип, зависящий от *nodX* [160]. Вероятно, *PsSym37* и *PsLykX* распознают разные структурные элементы Nod-фактора и совместно формируют рецепторную систему, определяющую специфичность взаимодействия гороха с ризобиями.

Вместе с тем результаты нокаута не доказывают прямого связывания *PsLykX* с Nod-фактором. Белок может функционировать как самостоятельный рецептор, корецептор или компонент комплекса, обеспечивающего передачу симбиотического сигнала. Для уточнения механизма его действия необходимы исследования связывания с Nod-факторами, анализ белок-белковых взаимодействий и направленный мутагенез аминокислотных остатков внеклеточного домена.

Таким образом, *PsLykX* является необходимым компонентом клубенькообразования и одновременно участвует в контроле симбиотической специфичности. Аллель *PsLykX^A* связана с избирательным взаимодействием с NodX+ штаммами, тогда как нокаут гена блокирует образование клубеньков у европейского сорта Caméor [16,17,23]. Это обосновывает использование *PsLykX* как мишени геномного редактирования для направленного изменения специфичности симбиоза и как молекулярного маркера при отборе генотипов гороха с заданным спектром совместимых клубеньковых бактерий.

3.2. Ген *PsLykX* как молекулярный маркер

3.2.1. Разработка маркера для идентификации высокоспецифичной аллели *PsLykX^A*

После подтверждения функциональной роли *PsLykX* как ключевого компонента, определяющего специфичность бобово-ризобияльного симбиоза, следующим этапом исследования стала разработка молекулярного маркера, позволяющего быстро идентифицировать аллельные варианты данного гена. Наличие такого маркера необходимо для

практического использования *PsLykX* в селекции, поскольку позволяет проводить отбор растений без постановки трудоемких инокуляционных опытов и секвенирования.

Основой для создания маркера послужил сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *PsLykX* у генотипов гороха, различающихся по типу симбиотической специфичности (рисунок 3.4). Проведенный анализ выявил однонуклеотидный полиморфизм, формирующий сайт узнавания рестриктазы *Hpy188I* только у афганской аллели *PsLykX^A*. У европейского варианта *PsLykX^E* вследствие нуклеотидной замены данный сайт отсутствует, что позволило использовать данный полиморфизм в качестве основы CAPS-маркера (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence* – полиморфизм амплифицированной последовательности, выявляемый после рестрикции) (рисунок 3.5).

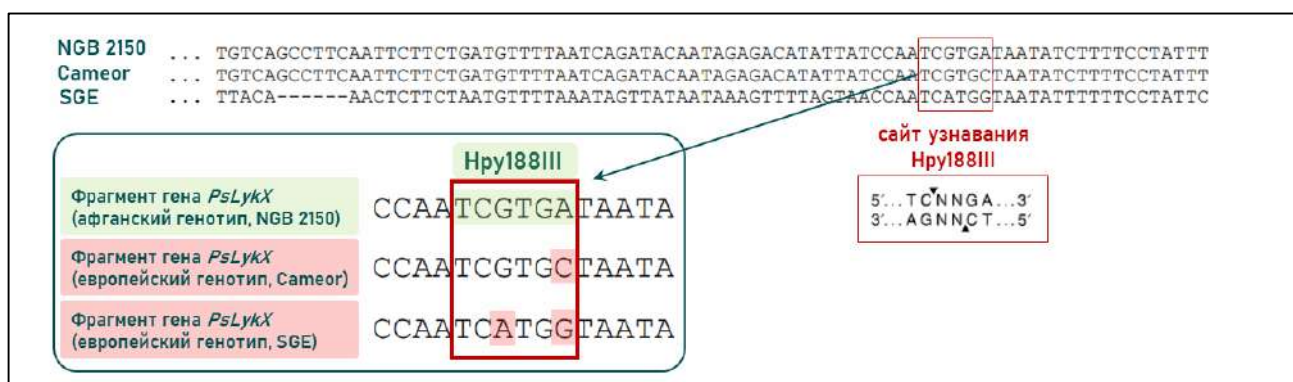


Рисунок 3.4 – Выравнивание последовательностей фрагментов гена *PsLykX* для афганского (линия NGB2150) и европейских симбиотических фенотипов (сорт Caméor, линия SGE): в красной рамке зеленым цветом указан сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *Hpy188I*, характерный только афганской высокоспецифичной аллели гена *PsLykX*

После рестрикции амплифицированного фрагмента длиной 381 п.н. (в случае праймеров A2B2 – 208 п. н.) афганская аллель расщеплялась на два фрагмента размером 217 и 164 п.н. (в случае праймеров A2B2 на 127 и 81 п. н.), тогда как европейская аллель сохраняет исходный размер ампликона. У гетерозигот одновременно присутствовали все три фрагмента, что позволяло легко различать все три возможных генотипа (рисунки 3.6 – 3.8).

Полученная система обладает рядом преимуществ по сравнению с фенотипической оценкой симбиотической специфичности. В отличие от инокуляционных тестов, требующих выращивания растений и использования специальных штаммов ризобий, разработанный CAPS-маркер позволял определить аллель *PsLykX^A* уже на стадии проростков по небольшому количеству листовой ткани, что существенно ускоряет генотипирование и делает возможным массовый скрининг селекционного материала.



Рисунок 3.5 – Принцип работы CAPS-маркера для идентификации высокоспецифичной аллели *PsLykX^A* гороха. Параметры проведения тагдаун-ПЦР (TD PCR) отражены в главе 2

3.2.2. Апробация CAPS-маркера на контрастных генотипах и популяции F₂ (Frisson × NGB2150)

Работоспособность разработанного CAPS-маркера была проверена сначала на группе генотипов с заранее известным типом симбиотической специфичности (рисунок 3.6), а затем на гибридной популяции F₂ (Frisson × NGB2150) (рисунок 3.7, 3.8).

При анализе контрастных образцов маркер полностью соответствовал ранее известным данным о происхождении и симбиотическом типе исследуемых линий. Афгаские формы гороха формировали характерный профиль из двух рестрикционных фрагментов, тогда как европейские сорта сохраняли нерасщепленный ампликон. У гибридных растений одновременно выявлялись все три ожидаемых фрагмента, что подтверждало возможность надежного различения гетерозигот (рисунки 3.7, 3.8).

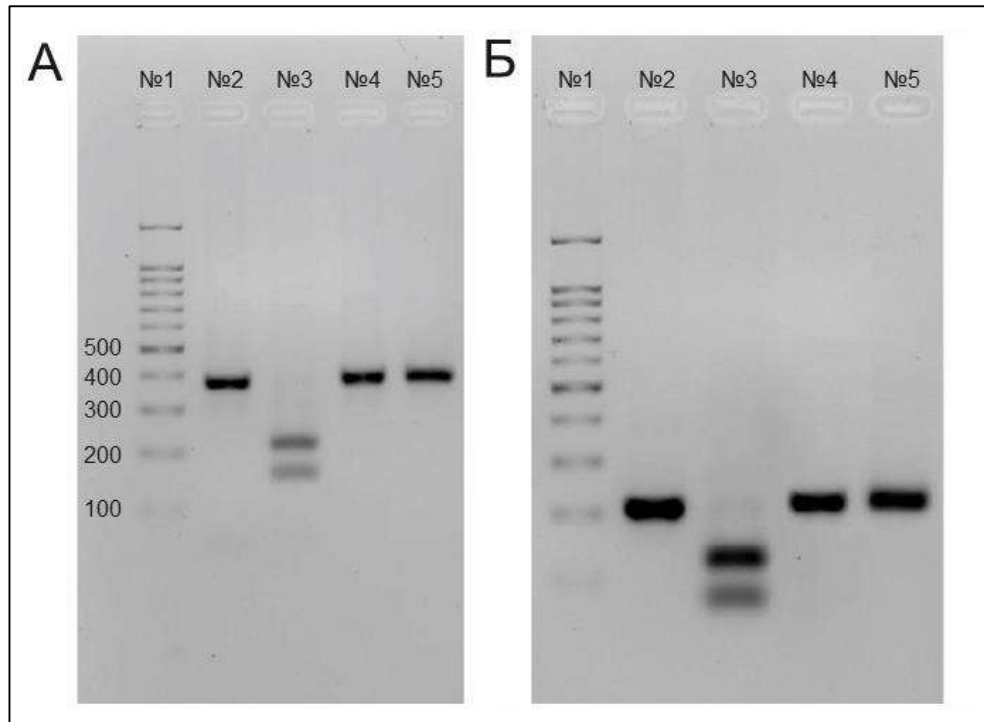


Рисунок 3.6 – Электрофореграмма, демонстрирующая результат тагдаун-ПЦР с последующим гидролизом эндонуклеазой рестрикции Hru188III проведенной на ДНК контрастных линий гороха (афганский симбиотический фенотип и европейский симбиотический фенотип): **А** – гидролиз ПЦР-продуктов с праймерами A1B1 размером 381 п. н. (№1 маркер длин 100+bp (Евроген, Москва); №2 гидролиз ПЦР-продукта линии SGE; №3 гидролиз ПЦР-продукта линии NGB2150; №4 гидролиз ПЦР-продукта сорта Frisson; №5 гидролиз ПЦР-продукта сорта Caméor; **Б** – гидролиз ПЦР-продуктов с праймерами A2B2 размером 208 п. н. (№1 маркер длин 100+bp (Евроген, Москва); №2 гидролиз ПЦР-продукта линии SGE; №3 гидролиз ПЦР-продукта линии NGB2150; №4 гидролиз ПЦР-продукта сорта Frisson; №5 гидролиз ПЦР-продукта сорта Caméor

Полученные результаты показали высокую воспроизводимость анализа и отсутствие неоднозначной интерпретации. Благодаря выраженным различиям между генотипами определение аллельного состояния *PsLykX* могло выполняться визуально без применения дополнительного программного анализа.

Следующим этапом стала апробация CAPS-маркера на гибридной популяции F_2 , полученной от скрещивания европейского сорта Frisson и афганской линии NGB2150 (рисунки 3.7, 3.8). Данная комбинация была выбрана вследствие контрастности родительских форм по аллельному состоянию *PsLykX*.

Всего было проанализировано 103 растения F_2 . Распределение генотипов полностью соответствовало ожидаемой менделевской схеме наследования одного кодоминантного локуса. Среди исследованных растений были выявлены 27 гомозигот по европейской аллели, 51 гетерозигота и 25 гомозигот по афганской аллели, что соответствует соотношению 1:2:1.

Статистический анализ с использованием критерия χ^2 Пирсона не выявил достоверных отклонений наблюдаемого распределения от теоретически ожидаемого 1:2:1 ($\chi^2 = 0,087$; $p > 0,95$), что свидетельствует о корректной работе разработанного маркера и отсутствии сцепления гена *PsLykX* с какими-либо детерминантами, потенциально влияющими на жизнеспособность растений.

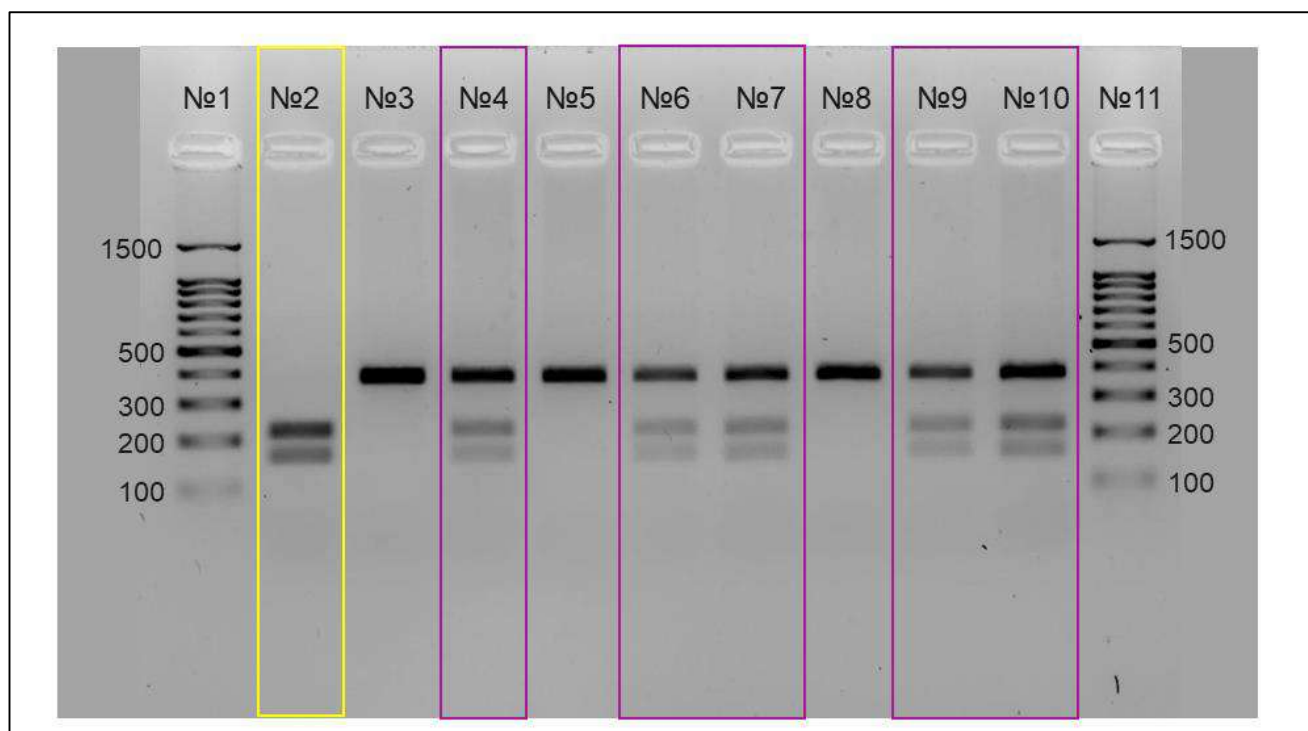


Рисунок 3.7 – Электрофореграмма, демонстрирующая результат тагдаун-ПЦР (праймеры A1B1) с последующим гидролизом эндонуклеазой рестрикции Hpy188III проведенной на ДНК гибридов Frisson × NGB2150: №1 и №11 маркер длин 100+bp (Евроген, Москва); №2 гидролиз ПЦР-продукта растения, гомозиготного по аллели *PsLykX^A* (в рамке желтого цвета); №3, №5, №8 гидролиз ПЦР-продуктов растений, гомозиготных по аллели *PsLykX^E*; №4, №6, №7, №9, №10 гидролиз ПЦР-продуктов растений, гетерозиготных по аллели *PsLykX* (в рамке фиолетового цвета)

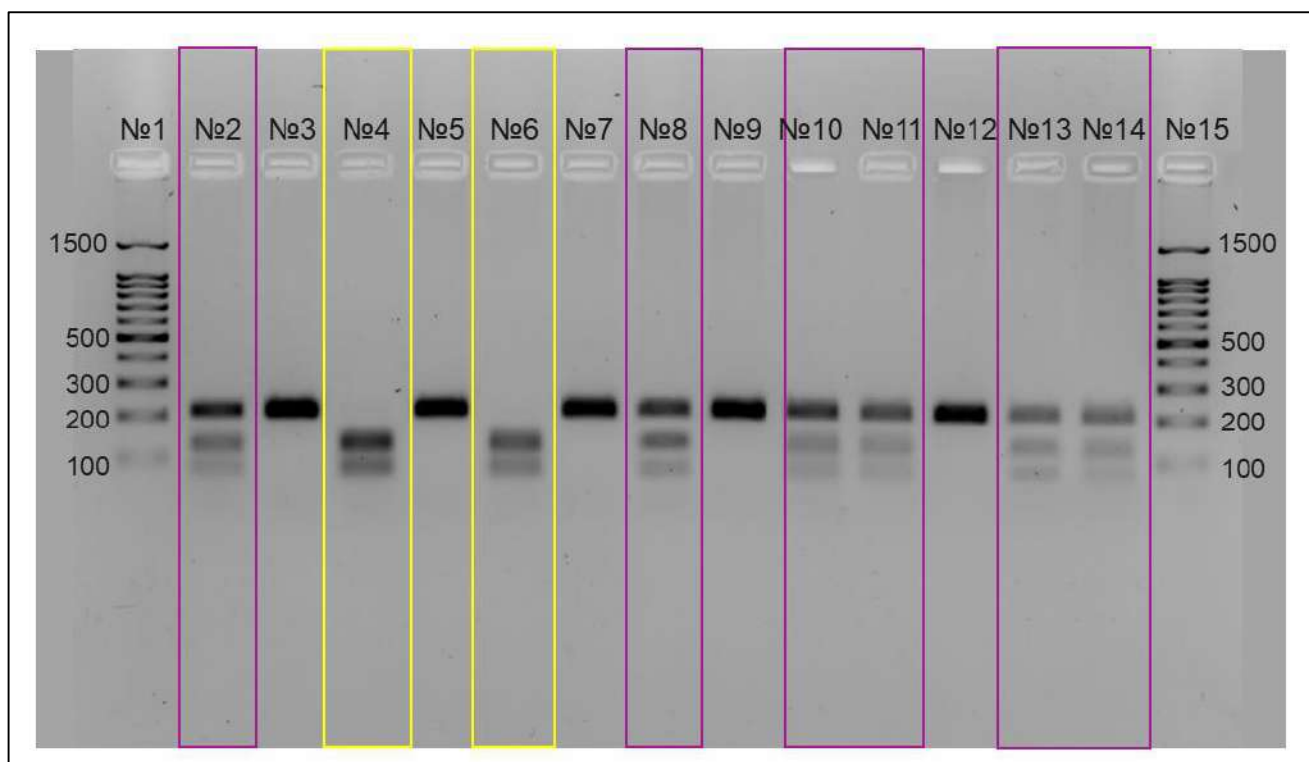


Рисунок 3.8 – Электрофореграмма, демонстрирующая результат тагдаун-ПЦР (праймеры A2B2) с последующим гидролизом эндонуклеазой рестрикции Hpy188III проведенной на ДНК гибридов Frisson × NGB2150: №1 и №15 маркер длин 100+bp (Евроген, Москва); №4, №6 гидролиз ПЦР-продукта растения, гомозиготного по аллели *PsLykX^A* (в рамке желтого цвета); №3, №5, №7, №9, №12 гидролиз ПЦР-продуктов растений, гомозиготных по аллели *PsLykX^E*; №2, №8, №10, №11, №13, №14 гидролиз ПЦР-продуктов растений, гетерозиготных по аллели *PsLykX* (в рамке фиолетового цвета)

Разработанный маркер лег в основу патента РФ № 2815453 на изобретение: «Молекулярно-генетический маркер типа CAPS у растений гороха посевного *Pisum sativum* L. и способ идентификации растений, гомозиготных по аллели, обуславливающей формирование повышенной специфичности по отношению к симбиотическим клубеньковым бактериям» [25].

3.3. Аллель *PsLykX^A* как фактор избирательного взаимодействия гороха с клубеньковыми бактериями

3.3.1. Характеристика линии A33.18 как модели для изучения афганского типа специфичности

Для анализа роли афганского типа специфичности в бобово-ризобиальном симбиозе была использована интрогрессионная линия гороха A33.18. Данная линия представляет особый интерес, поскольку позволяет оценивать влияние аллели высокой специфичности *PsLykX^A* в генетическом фоне европейского сорта Rondo, без сопутствующего влияния большинства признаков афганских форм гороха.

Линия A33.18 была получена в результате интрогрессии участка генома афганского сорта Afghanistan (NGB2150) в геном европейского сорта Rondo. Согласно результатам генетического картирования [172], A33.18 несет аллель *PsLykX^A* в гомозиготном состоянии и характеризуется наименьшей по размеру интрогрессией среди всех ранее полученных линий с афганским типом специфичности [24,173]. Это делает ее удобной моделью для изучения вклада именно региона *Sym2* в контроль взаимодействия растения с клубеньковыми бактериями.

По морфологическим признакам надземной части линия A33.18 сходна с родительским сортом Rondo: растения имеют укороченные междоузлия и белые цветки. Напротив, афганский сорт Afghanistan характеризуется длинными междоузлиями и фиолетовой окраской цветков. Таким образом, по комплексу видимых морфологических признаков A33.18 ближе к европейскому сорту Rondo, однако по симбиотическому фенотипу воспроизводит афганский тип специфичности [24].

В работе было проведено полногеномное секвенирование A33.18 и родительских генотипов Rondo и Afghanistan, что позволило уточнить состав генома данной интрогрессионной линии. Было показано, что приблизительно 3,1% генома A33.18 унаследовано от сорта Afghanistan. Основной интрогрессированный участок расположен на хромосоме 2, соответствующей группе сцепления I, где ранее был картирован локус *Sym2*. Размер данного участка составляет 18,2 Mb; он включает 63 гена, среди которых находятся гены рецептороподобных киназ *PsSym37*, *PsK1* и ген *PsLykX* (рисунок 3.9) [14,15,24].

Особое значение имеет присутствие в интрогрессированном участке гена *PsLykX*, кодирующего LysM-рецептороподобную киназу. Ранее в работах А.С.Сулимы и др. было показано, что варианты *PsLykX* различаются у афганских и европейских форм гороха, а

гаплотипы первого экзона этого гена согласуются с фенотипом высокой симбиотической специфичности [16,17]. Поскольку первый экзон кодирует внеклеточную рецепторную область белка, данные различия могут быть связаны с распознаванием структурных особенностей Nod-факторов, включая О-ацетильную модификацию, обусловленную *nodX*.

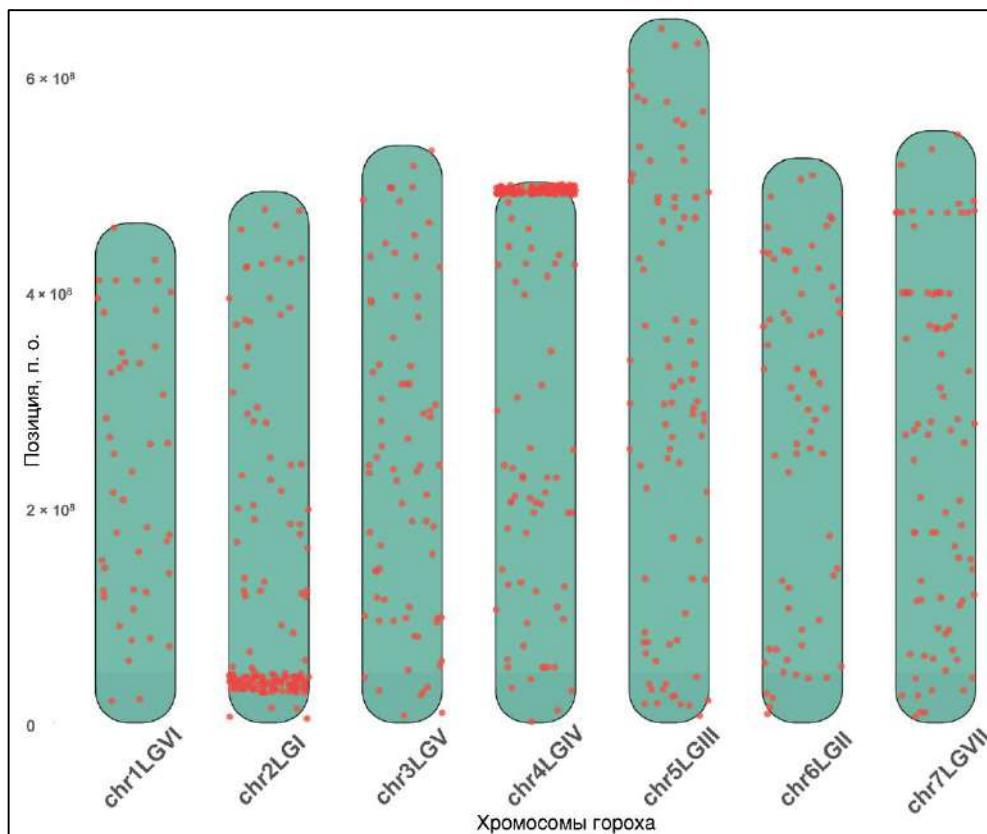


Рисунок 3.9 – Распределение однонуклеотидных замен и инделов, унаследованных линией A33.18 от сорта Afghanistan, по хромосомам гороха. Наиболее выраженный интрогрессированный участок локализован на хромосоме 2 / группе сцепления I и соответствует области локуса *Sym2*, включающей кандидатный ген *PsLykX* [24]

Таким образом, линия A33.18 сочетает европейский генетический фон сорта Rondo с интрогрессированным афганским регионом *Sym2*, содержащим аллель *PsLykX^A*. Такая генетическая структура позволяет рассматривать линию A33.18 как модель для проверки двух взаимосвязанных положений: во-первых, что афганский аллельный вариант *PsLykX^A* ограничивает взаимодействие с несовместимыми аборигенными ризобиями; и во-вторых, что этот же вариант может повышать избирательное заселение клубеньков совместимыми *nodX*⁺ штаммами. Поэтому дальнейший анализ линии A33.18 был направлен на оценку клубенькообразования и состава ризобий, заселяющих клубеньки, в условиях вегетационного и полевого экспериментов.

3.3.2. Оценка клубенькообразования у линии A33.18 и контрольных генотипов при инокуляции различными штаммами ризобий

Для проверки симбиотического фенотипа линии A33.18 была проведена серия вегетационных опытов с использованием штаммов клубеньковых бактерий, различающихся по наличию гена *nodX*. Такой подход позволил оценить, сохраняет ли линия A33.18 афганский тип специфичности на генетическом фоне европейского сорта Rondo, а также определить, зависит ли клубенькообразование от способности бактерий синтезировать О-ацетилированный Nod-фактор.

В первом опыте растения A33.18 и сорта Rondo выращивали в нестерильной почве, содержащей аборигенные штаммы клубеньковых бактерий. В контрольном варианте, без внесения инокулянта, линия A33.18 образовывала лишь небольшое число клубеньков. Напротив, сорт Rondo формировал значительное количество клубеньков как в контроле, так и при инокуляции штаммом TOM. Такое различие указывает на то, что аборигенная ризобияльная микробиота данной почвы в основном совместима с европейским сортом Rondo, но ограниченно взаимодействует с линией A33.18, несущей афганский вариант *PsLykX*.

Инокуляция линии A33.18 штаммом TOM, содержащим ген *nodX*, приводила к восстановлению клубенькообразования до уровня, сопоставимого с нормальным симбиотическим фенотипом. Это подтверждает, что ограниченное клубенькообразование A33.18 в нестерильной почве связано не с общей неспособностью линии к симбиозу, а с избирательностью ее взаимодействия с определенными штаммами ризобий. Наличие *nodX* у штамма TOM позволяет бактериям преодолевать барьер специфичности, задаваемый афганским вариантом *PsLykX* (рисунок 3.10) [24].

Во втором опыте растения выращивали в стерильном песке и инокулировали отдельными штаммами ризобий. Использование стерильного субстрата позволило исключить влияние почвенной микробиоты и напрямую сопоставить реакцию растений на штаммы с разным генетическим составом. При инокуляции штаммом *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1022, не содержащим *nodX*, линия A33.18 и сорт Afghanistan не образовывали клубеньков. В то же время европейский сорт Triumph демонстрировал нормальное клубенькообразование. Этот результат показывает, что штамм RCAM1022 является совместимым с горохом европейского симбиотического типа, но не способен эффективно взаимодействовать с генотипами афганского типа специфичности.

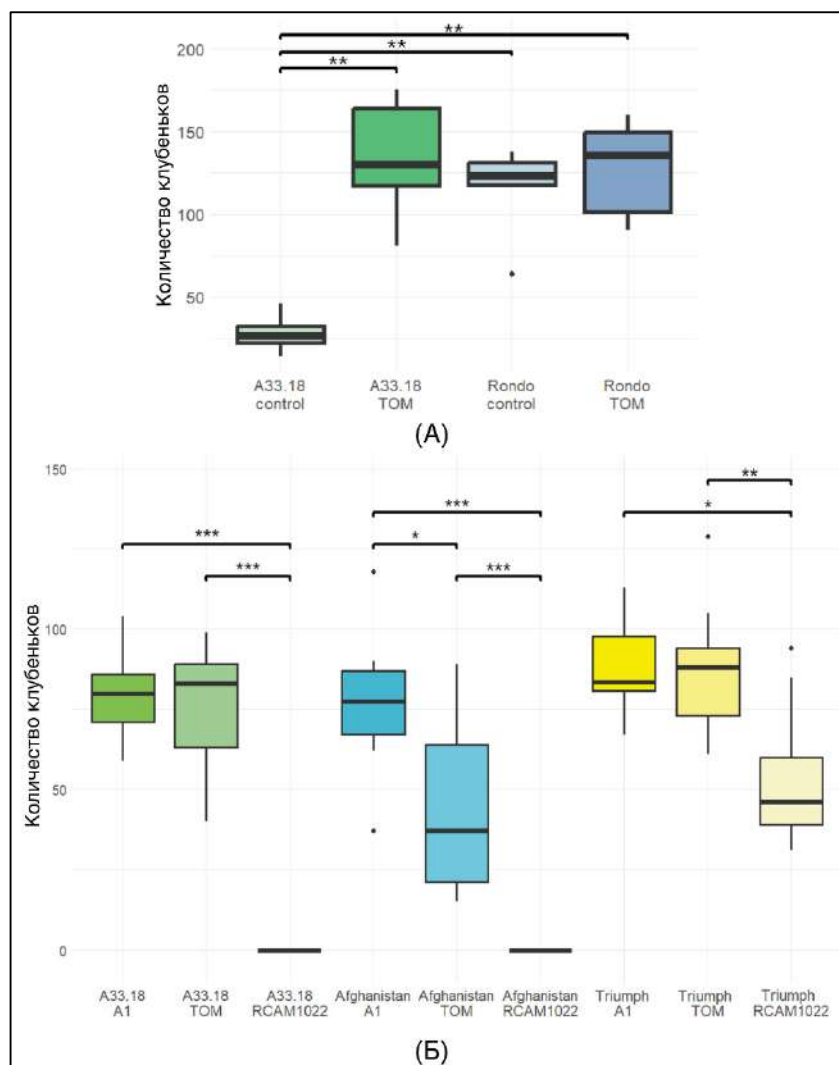


Рисунок 3.10 – Клубенькообразование у линии A33.18 и контрольных генотипов гороха при инокуляции штаммами ризобий, различающимися по наличию гена *nodX*: (А) – клубенькообразование линии A33.18 и сорта Rondo в нестерильной почве без инокуляции и при внесении штамма TOM (NodX+); (Б) – клубенькообразование A33.18, сорта Afghanistan и сорта Triumph в стерильном песке при инокуляции штаммами RCAM1022 (NodX–), TOM (NodX+) и A1 (NodX+) ($n \geq 5$). * p -value <0,05, ** p -value <0,01, *** p -value <0,001 [24]

Иная картина наблюдалась при инокуляции штаммами TOM и A1, несущими *nodX*. В этих вариантах клубеньки формировались у всех исследованных генотипов: линии A33.18, сорта Afghanistan и европейского сорта Triumph. Следовательно, присутствие *nodX* у бактерий является достаточным условием для преодоления ограничения клубенькообразования у генотипов афганского типа. Полученные данные согласуются с представлением о том, что продукт *nodX* модифицирует Nod-фактор, создавая структуру сигнальной молекулы, распознаваемую растениями с аллелью *Sym2^A* [10,18].

Дополнительное значение имеет сравнение A33.18 с сортом Afghanistan. Оба генотипа демонстрировали сходную реакцию на штаммы RCAM1022, TOM и A1: отсутствие клубеньков

при инокуляции NodX[–] штаммом и восстановление клубенькообразования при инокуляции NodX⁺ штаммами. Это подтверждает, что линия A33.18 действительно воспроизводит афганский тип симбиотической специфичности, несмотря на то что ее общий генетический фон соответствует европейскому сорту Rondo.

При этом реакция A33.18 отличалась от реакции европейских генотипов. Сорт Rondo в нестерильной почве и сорт Triumph в стерильном песке сохраняли способность к клубенькообразованию с более широким кругом ризобий, включая штаммы без *nodX*. Это соответствует европейскому типу симбиотической специфичности, при котором растение не предъявляет строгого требования к O-ацетилированию Nod-фактора. Таким образом, различия между A33.18 и европейскими генотипами определяются не общей эффективностью роста растений, а особенностями раннего распознавания бактериального симбиотического сигнала.

Отдельного внимания заслуживает результат инокуляции A33.18 штаммом RCAM1026, также не содержащим *nodX*. В дополнительном опыте данный штамм индуцировал образование редких клубеньков на корнях A33.18, тогда как сорт Afghanistan клубеньков не образовывал [24]. Этот результат показывает, что афганский тип специфичности не является абсолютно непроницаемым барьером для всех NodX[–] штаммов. Вероятно, отдельные бактериальные генотипы могут частично преодолевать ограничение за счет других особенностей структуры Nod-факторов или дополнительных факторов взаимодействия с растением. Однако общее направление реакции сохраняется: A33.18 резко ограничивает клубенькообразование с несовместимыми штаммами и формирует нормальный симбиоз преимущественно с NodX⁺ бактериями.

В совокупности результаты вегетационных опытов подтверждают связь интрогрессированного региона *Sym2*, включая *PsLysX^A* с избирательным распознаванием ризобий и создают основу для дальнейшей проверки способности A33.18 направленно ограничивать заселение клубеньков аборигенными штаммами в пользу совместимого инокулянтного штамма TOM.

3.3.3. Конкурентное заселение клубеньков линии A33.18 инокулятом

Одной из центральных задач исследования было установить, способна ли линия A33.18 не только проявлять афганский тип специфичности в контролируемых условиях, но и избирательно взаимодействовать с совместимым инокулянтным штаммом в присутствии аборигенной почвенной микробиоты. Такая постановка задачи имеет прикладное значение, поскольку

эффективность ризобияльных биопрепаратов часто ограничивается конкуренцией со стороны местных почвенных штаммов, которые могут активно занимать клубеньки, но не всегда обеспечивают высокий уровень азотфиксации [174]. В связи с этим генетическое ограничение круга совместимых микросимбионтов рассматривается как потенциальный способ повышения доли клубеньков, занятых целевым эффективным инокулянтом.

Для проверки этого предположения был проведен полевой опыт с линией A33.18 и сортом Rondo. В качестве инокулянта использовали штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* TOM, несущий ген *nodX*. Данный штамм является модельным для системы *PsLykX^A – nodX*, поскольку способен формировать клубеньки на афганских формах гороха, тогда как большинство обычных европейских штаммов не преодолевает барьер, задаваемый аллелью *PsLykX^A* [10,18,24].

Для идентификации бактерий, заселяющих клубеньки, был использован ПЦР-рестрикционный маркер на основе последовательности гена *nodX* (рисунок 3.11). Данный подход позволял различать клубеньки, занятые штаммом TOM, клубеньки с другими NodX+ штаммами и клубеньки, образованные бактериями без *nodX*. Принцип анализа основан на амплификации фрагмента *nodX* и последующем гидролизе рестриктазой *RsaI*: сайт узнавания данного фермента присутствует в варианте *nodX* штамма TOM, но отсутствует у близкого NodX+ штамма A1 [24].

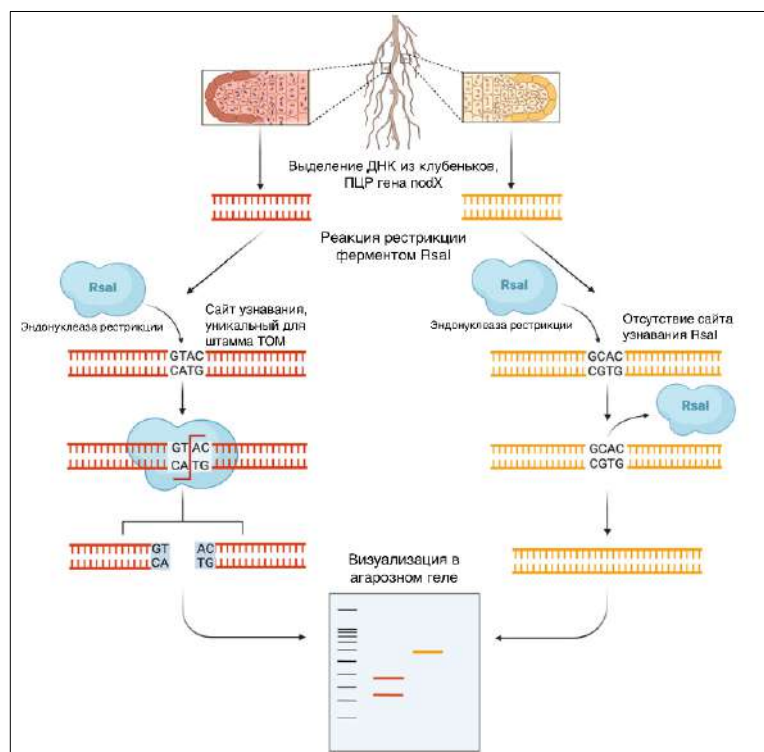


Рисунок 3.11 – Схема ПЦР-рестрикционного анализа аллельного состояния гена *nodX*, использованного для идентификации штамма TOM в клубеньках гороха. Наличие сайта рестрикции *RsaI* позволяет отличать вариант *nodX* штамма TOM от других близких NodX+ вариантов [24]

В полевом опыте линия A33.18 как в контрольном варианте, так и при инокуляции штаммом ТОМ образовывала меньше клубеньков, чем сорт Rondo. Однако реакция двух генотипов на инокуляцию различалась. У A33.18 внесение ТОМ приводило к увеличению числа клубеньков, тогда как у Rondo число клубеньков оставалось высоким независимо от инокуляции. Это указывает на то, что сорт Rondo активно взаимодействовал с аборигенными ризобиями почвы, тогда как A33.18 ограничивала клубенькообразование с большей частью местной микробиоты и отвечала преимущественно на внесение совместимого NodX+ штамма.

Анализ ДНК клубеньков показал принципиальные различия в составе микросимбионтов у двух генотипов. В контрольном варианте у сорта Rondo 97% клубеньков были образованы NodX– штаммами, а только 3% клубеньков содержали NodX+ бактерии, не относящиеся к штамму ТОМ. После инокуляции ТОМ картина изменилась слабо: 92% клубеньков Rondo по-прежнему были заняты NodX– штаммами, 4% содержали ТОМ, 3% – смесь ТОМ и других NodX+ штаммов, а 1% – другие NodX+ бактерии. Следовательно, внесенный штамм ТОМ обладал низкой конкурентоспособностью по сравнению с аборигенными ризобиями почвы [24].

Иная картина наблюдалась у линии A33.18. В контрольном варианте большинство клубеньков линии также было сформировано NodX– штаммами, однако их доля составляла 87%, а 13% клубеньков содержали NodX+ штаммы, отличные от ТОМ (рисунок 3.12). Этот результат показывает, что специфичность A33.18 не является абсолютной: отдельные аборигенные штаммы способны преодолевать барьер афганского типа даже без внесения инокулянта. Однако после инокуляции штаммом ТОМ структура заселения клубеньков резко изменилась. У A33.18 фрагмент *nodX* был выявлен почти во всех клубеньках; 64% клубеньков содержали ТОМ, 32% – смесь ТОМ и других NodX+ штаммов, и только 4% были заняты другими NodX+ штаммами без выявления ТОМ. Таким образом, более 95% клубеньков A33.18 в варианте с инокуляцией содержали штамм ТОМ либо его смесь с другими NodX+ ризобиями [24].

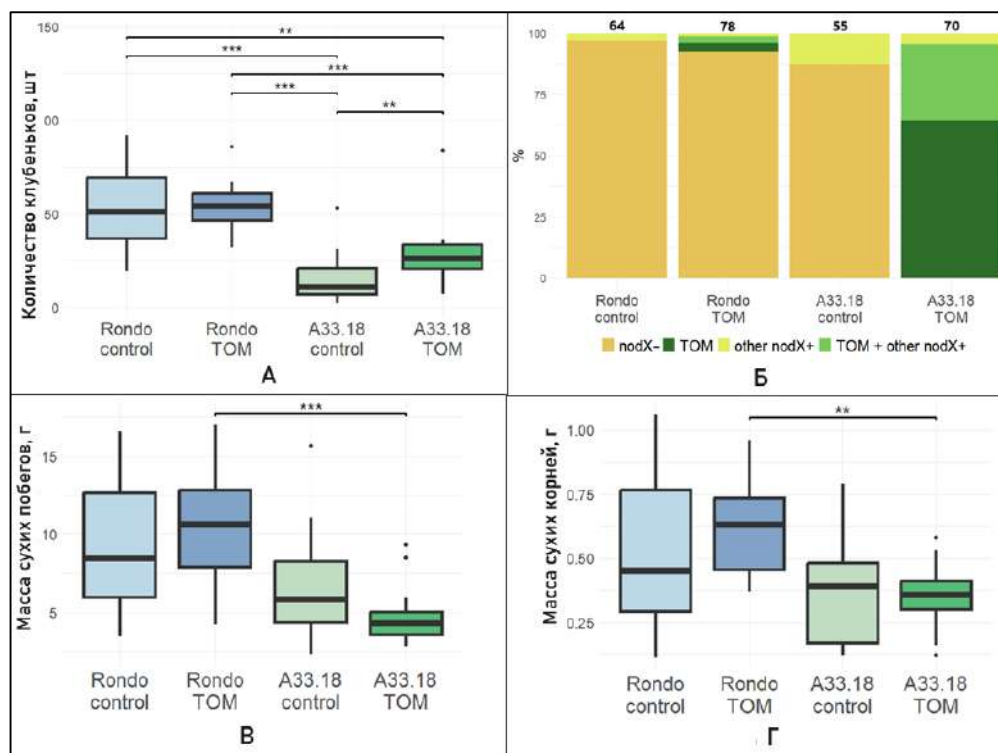


Рисунок 3.12 – Клубенькообразование, состав ризобий в клубеньках и показатели роста линии A33.18 и сорта Rondo в полеовом опыте при инокуляции штаммом TOM: А – число клубеньков ($n \geq 11$); Б – распределение клубеньков по присутствию NodX⁻ штаммов, штамма TOM и других NodX⁺ ризобий; В, Г – сухая масса побегов и корней растений ($n \geq 11$). ** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001 [24]

Полученные данные показывают, что интрогрессия афганского региона *Sym2*, содержащего *PsLykX*, существенно изменяет конкурентные отношения между ризобиями при заселении клубеньков. У сорта Rondo, обладающего европейским типом специфичности, аборигенные NodX⁻ штаммы сохраняли конкурентное преимущество даже после внесения штамма TOM. Напротив, у A33.18 наличие афганского варианта *PsLykX*^A ограничивало заселение клубеньков несовместимыми штаммами и создавало преимущество для внесенного NodX⁺ инокулянта. Это подтверждает, что генетически обусловленная высокая специфичность может использоваться как механизм направленного контроля состава симбиотической микробиоты.

Вместе с тем анализ сухой массы растений показал, что преимущественное заселение клубеньков штаммом TOM не сопровождалось однозначным повышением продуктивности A33.18. При инокуляции TOM сухая масса побегов и корней Rondo возрастала, тогда как у A33.18 наблюдалась тенденция к снижению этих показателей. В варианте с инокуляцией различия между генотипами были статистически значимыми: для сухой массы побегов $p < 0,001$, для сухой массы корней $p < 0,01$ [24]. Этот результат важен для интерпретации прикладного значения системы *PsLykX*^A – *nodX*: высокая специфичность обеспечивает преимущественное заселение

клубеньков совместимым штаммом, но сама по себе не гарантирует максимальной эффективности азотфиксации.

Таким образом, полевой эксперимент подтвердил, что линия A33.18 является моделью генетически управляемой специфичности симбиоза. На фоне естественной почвенной микробиоты она избирательно взаимодействовала с внесенным штаммом ТОМ, тогда как европейский сорт Rondo преимущественно образовывал клубеньки с аборигенными NodX–ризобиями. Эти данные подтверждают прикладную перспективность использования аллели *PsLykX^A* для защиты клубеньков от заселения нежелательными почвенными штаммами. Однако для практического применения такой системы необходим подбор NodX+ штаммов, сочетающих способность преодолевать афганский барьер специфичности с высокой симбиотической эффективностью.

3.3.4. Обсуждение роли *PsLykX* в управлении составом симбиотической микробиоты

Полученные результаты показывают, что линия A33.18 может рассматриваться как экспериментальная модель генетически управляемой специфичности бобово-ризобияльного симбиоза. В отличие от сорта Rondo, сохраняющего широкий круг совместимых микросимбионтов, линия A33.18 ограничивала клубенькообразование с аборигенными ризобиями и преимущественно взаимодействовала со штаммами, несущими *nodX*. Такая реакция соответствует классическому афганскому типу специфичности, ранее описанному для образцов гороха из Афганистана [154,156,157].

Интрогрессионная линия A33.18 позволила проверить, сохраняется ли такой тип специфичности на европейском генетическом фоне. Результаты вегетационных опытов показали, что A33.18 по симбиотическому фенотипу сходна с сортом Afghanistan: она не образовывала клубеньков при инокуляции NodX–штаммом RCAM1022, но формировала клубеньки при инокуляции NodX+ штаммами ТОМ и A1 (рисунок 3.2). Следовательно, интрогрессированного участка, включающего *PsLykX*, достаточно для переноса специфичности афганского типа на европейский генетический фон [24].

Наиболее важным результатом является изменение состава микросимбионтов, заселяющих клубеньки в полевом опыте. У сорта Rondo клубеньки преимущественно занимали аборигенные NodX–ризобии, даже после внесения штамма ТОМ. Это указывает на высокую конкурентоспособность местной почвенной микробиоты и объясняет одну из ключевых проблем применения ризобияльных биопрепаратов: внесенный эффективный штамм не всегда способен

занять значительную долю клубеньков при наличии многочисленных аборигенных конкурентов [175,176].

У линии А33.18 ситуация была иной. После инокуляции штаммом ТОМ более 95% клубеньков содержали этот штамм либо его смесь с другими NodX⁺ ризобиями (рисунок 3.4). Так, афганский аллельный вариант гена *PsLykX* не просто снижал общее взаимодействие с несовместимыми ризобиями, но и создавал селективное преимущество для совместимого NodX⁺ инокулянта. Поэтому *PsLykX^A* можно рассматривать как генетический фильтр, ограничивающий проникновение в клубеньки нежелательных аборигенных штаммов и направляющий симбиоз в сторону бактерий с подходящей структурой Nod-фактора.

Такой механизм имеет прикладное значение. В агроценозах растение взаимодействует не с одним штаммом, а с комплексом почвенных ризобий, различающихся по конкурентоспособности и симбиотической эффективности [6]. Даже при внесении высокоэффективного инокулянта клубеньки могут быть заняты местными штаммами, которые хорошо конкурируют за инфекционные ниши, но обеспечивают низкий уровень азотфиксации [6,177]. Использование сортов гороха, несущих высокоспецифичную аллель *PsLykX^A*, потенциально позволяет изменить эту ситуацию: растение становится менее доступным для широкого круга аборигенных штаммов и более избирательно взаимодействует с заранее подобранным совместимым инокулянтом.

Вместе с тем результаты полевого опыта показывают, что высокая специфичность сама по себе не является достаточным условием повышения продуктивности. Инокуляция А33.18 штаммом ТОМ обеспечивала преимущественное заселение клубеньков данным штаммом, однако не приводила к выраженному увеличению сухой массы растений. Напротив, сорт Rondo при инокуляции ТОМ демонстрировал более высокие показатели биомассы, несмотря на низкую долю клубеньков, занятых самим инокулянтом [24]. Это означает, что практическое использование системы *PsLykX^A-nodX* требует не только генетического ограничения круга совместимых бактерий, но и подбора штаммов, сочетающих совместимость с афганским типом специфичности и высокую симбиотическую эффективность.

Данный вывод принципиален для дальнейшего развития работы. Аллель *PsLykX^A* может рассматриваться как инструмент управления составом симбиотической микробиоты, но ее прикладной потенциал реализуется только в сочетании с эффективными NodX⁺ штаммами. Поэтому логичным продолжением является поиск в почвах Российской Федерации аборигенных штаммов, способных преодолевать афганский барьер специфичности и одновременно обеспечивать высокий уровень развития растения. Такой подход позволяет перейти от описания феномена специфичности к созданию эффективной микробно-растительной системы,

включающей два компонента: сорт гороха отобранной аллелью *PsLykX^A* и совместимый эффективный штамм клубеньковых бактерий (см. раздел 3.4).

3.4. Выделение новых эффективных аборигенных штаммов клубеньковых бактерий из почв России

3.4.1. Использование линии NGB2150 как селективной системы для выделения аборигенных клубеньковых бактерий

Одной из задач настоящей работы являлась проверка гипотезы о том, что растения гороха, имеющие афганскую аллель *PsLykX^A*, могут использоваться в качестве естественной селективной системы для выделения из природных почв штаммов ризобий, способных преодолевать высокий уровень симбиотической специфичности. Если данная гипотеза верна, то клубеньки на таких растениях должны формироваться только теми бактериями, которые обладают соответствующими генетическими детерминантами совместимости.

После инокуляции растений линии NGB2150 почвенными вытяжками из различных районов России на корневой системе были обнаружены клубеньки, что свидетельствует о присутствии в исследованных почвах природных штаммов ризобий, совместимых с афганским типом симбиотической специфичности. Данный результат представляет особый интерес, поскольку большинство известных европейских штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* не способны эффективно взаимодействовать с растениями, несущими аллель *PsLykX^A*, без дополнительных детерминант специфичности (гена *nodX*).

При анализе растений было установлено, что сформировавшиеся клубеньки значительно различались по окраске и внешнему виду (таблица 3.1). Помимо типичных розовых клубеньков были выявлены белые, желтые и коричневые формы, что свидетельствует о высокой неоднородности выделенной популяции симбиотических бактерий (рисунок 3.13).

Таблица 3.1 – Фенотипы клубеньков, образованные ризобиями из вытяжек различных почв

Почва/Фенотип клубеньков	Желтые клубеньки	Красные клубеньки	Розовые клубеньки	Коричневые клубеньки	Белые клубеньки
Пронск 1	10	8	-	-	-

Продолжение Таблицы 3.1

Пронск 2	2	6	-	-	-
Пронск 3	-	5	-	-	-
Поле ВНИИСХМ (дерново- подзолистая супесь)	-	-	-	2	-
Красная поляна (поле)	-	-	7	-	4
Красная поляна (лес)	-	-	5	-	-

Все фенотипически различающиеся клубеньки были использованы для выделения чистых культур бактерий. В результате была сформирована коллекция аборигенных штаммов ризобий, способных вступать в симбиоз с носителем афганской аллели *PsLykX^A*. Так, использование высокоспецифичной линии гороха позволило провести отбор микроорганизмов непосредственно из почвенного микробного сообщества.

Полученные результаты показывают, что почвы Российской Федерации содержат штаммы ризобий, обладающие высокой симбиотической специфичностью по отношению к растениям афганского типа. Это открывает возможность поиска перспективных микросимбионтов не только среди коллекционных культур, но и непосредственно в природных популяциях.



Рисунок 3.13 – Морфологическое разнообразие клубеньков, сформированных на линии NGB2150 после инокуляции почвенными вытяжками. Представлены клубеньки различной окраски: А – желтые, Б – белые, В – розовые

3.4.2. Оценка симбиотической эффективности выделенных штаммов

После формирования коллекции совместимых штаммов была проведена их первичная оценка по способности обеспечивать эффективный симбиоз с линией NGB2150. При этом анализировали не только образование клубеньков, но и влияние каждого штамма на рост растений, что позволяет, косвенно судить об эффективности биологической фиксации азота.

На первом этапе сравнили количество клубеньков, образованных каждым из выделенных изолятов. Полученные результаты показали существенные различия между исследуемыми штаммами (рисунок 3.14). Наиболее интенсивное клубенькообразование наблюдалось при инокуляции штаммами, выделенными из желтых клубеньков (образец «Пронск 1») и коричневых клубеньков (ВНИИСХМ, дерново-подзолистая супесь). В контрольном варианте без инокуляции клубеньки отсутствовали, что подтверждает отсутствие контаминации и корректность проведения эксперимента.

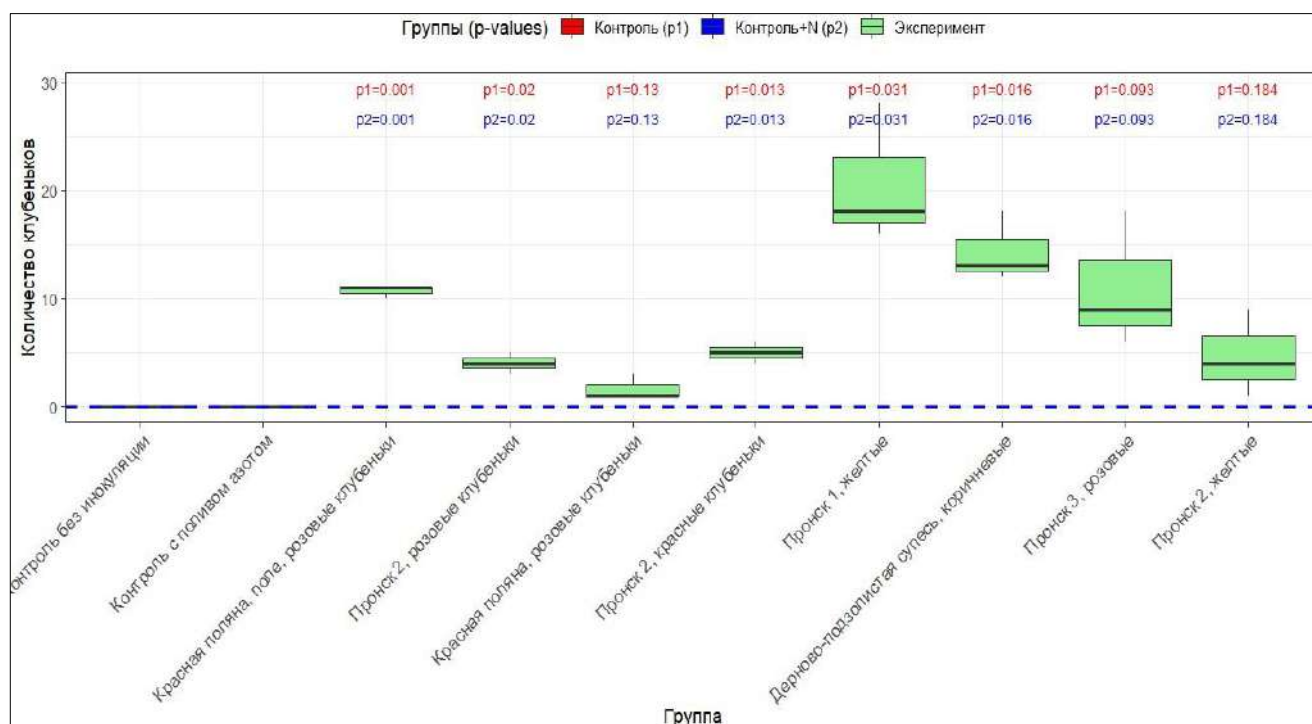


Рисунок 3.14 – Количество клубеньков, сформированных на растениях линии NGB2150 после инокуляции выделенными аборигенными штаммами клубеньковых бактерий

Однако число клубеньков не отражало в полной мере эффективность симбиоза. Поэтому следующим этапом была проведена оценка биомассы растений.

Анализ сухой массы корневой системы показал, что наиболее интенсивное развитие корней наблюдалось у растений, инокулированных штаммами, выделенными из розовых клубеньков образцов «Красная Поляна (поле)» и «Пронск 3» (рисунок 3.15). По данному показателю они практически не уступали растениям контрольного варианта, выращенным при наличии минерального азота, что свидетельствует о высокой эффективности этих штаммов.

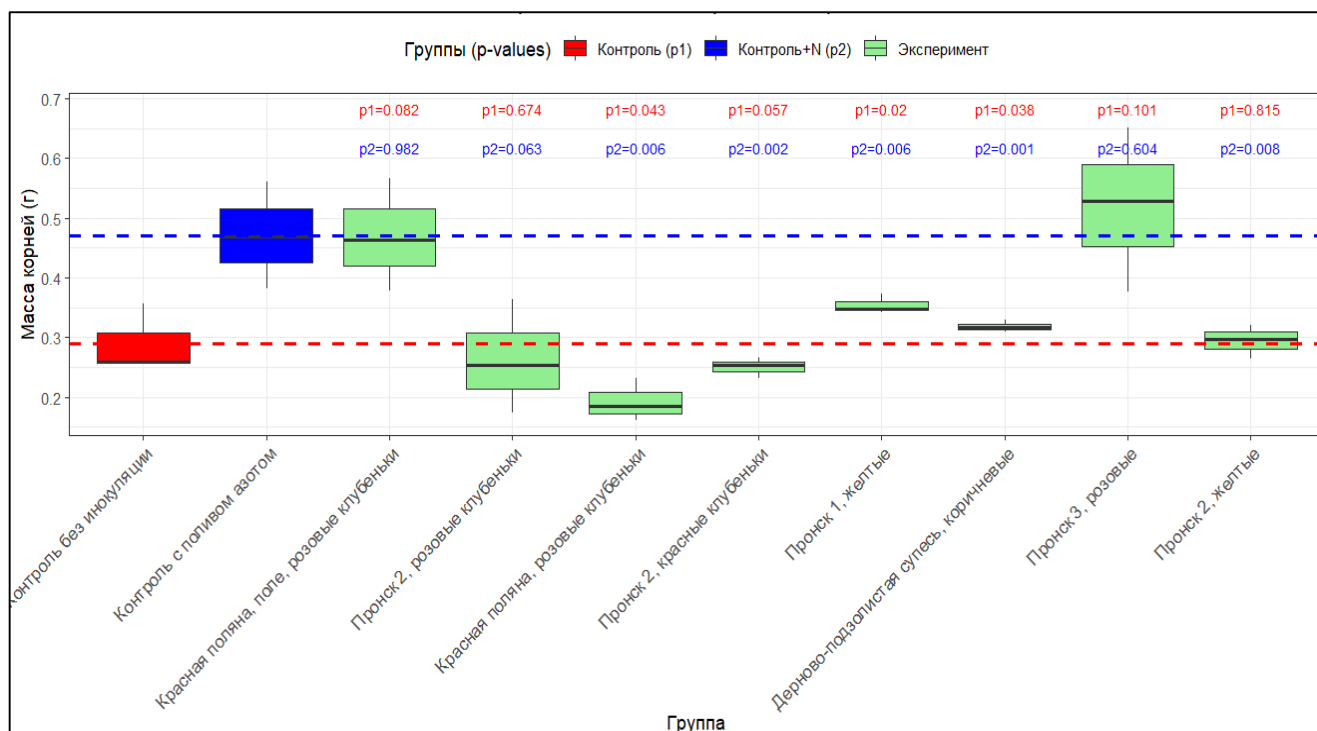


Рисунок 3.15 – Сухая масса корневой системы растений линии NGB2150 после инокуляции выделенными штаммами клубеньковых бактерий

Аналогичная тенденция была выявлена при анализе сухой массы надземной части растений (рисунок 3.16). Максимальные значения были зарегистрированы у растений, инокулированных штаммом, выделенным из розового клубенька образца «Пронск 3». Развитие побегов в данном варианте практически соответствовало растениям, выращенным при обеспечении связанным азотом, что свидетельствует о высокой эффективности симбиотической азотфиксации.

Полученные результаты показали, что способность бактерий формировать большое количество клубеньков не всегда сопровождается высокой эффективностью симбиоза. Некоторые штаммы обеспечивали интенсивное клубенькообразование, однако прирост биомассы растений оставался сравнительно невысоким. В то же время отдельные изоляты, образующие меньшее число клубеньков, значительно эффективнее обеспечивали растения

доступным азотом. Это подтверждает, что при оценке перспективности штаммов необходимо учитывать не только количество клубеньков, но и их функциональную активность.

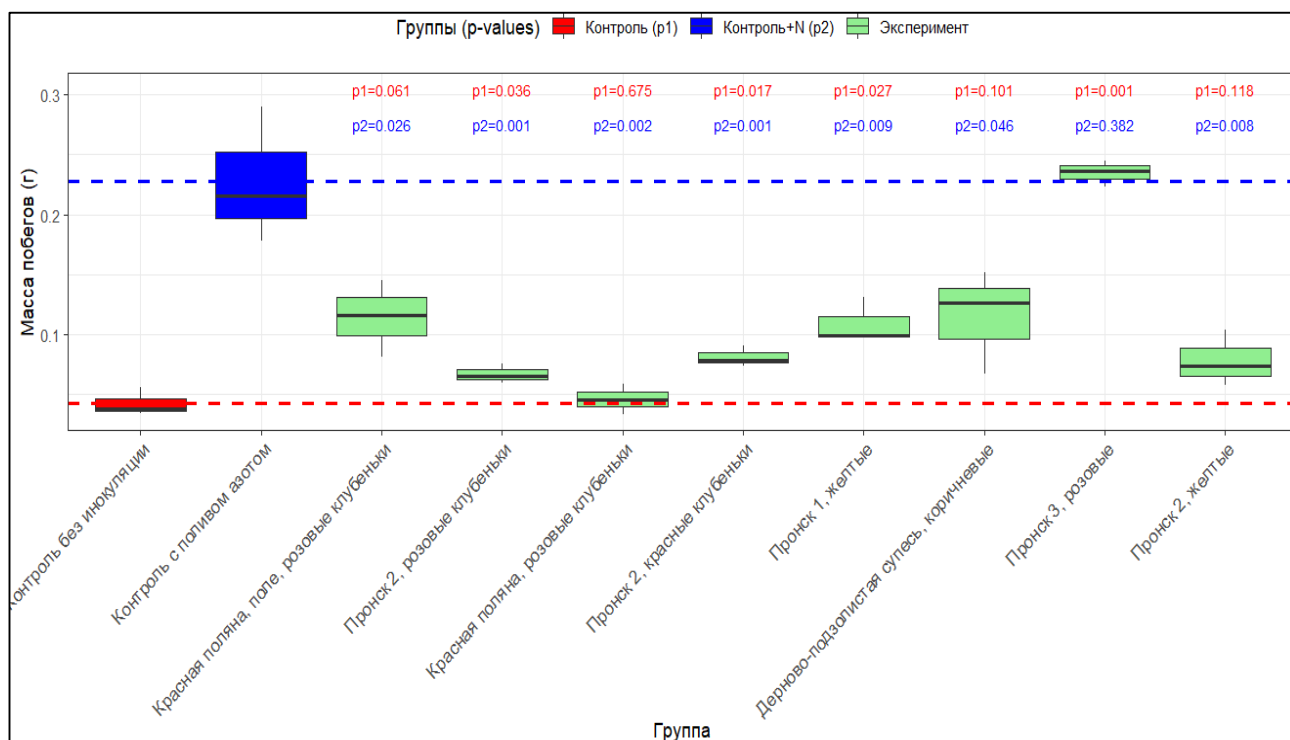


Рисунок 3.16 – Сухая масса надземной части растений линии NGB2150 после инокуляции выделенными штаммами клубеньковых бактерий

По совокупности исследованных показателей наиболее перспективным оказался штамм «Пронск 3.2», выделенный из розовых клубеньков образца почвы вблизи пгт Пронск. Он сочетал способность эффективно взаимодействовать с носителем аллели *PsLycX^A* и обеспечивал наиболее интенсивный рост растений в условиях отсутствия минерального азота. Для штамма «Пронск 3.2», и других выделенных из розовых клубеньков образца почвы «Пронск 3», методом ПЦР была проведена идентификация наличия гена *nodX* (Приложение Г).

Таким образом, использование гороха афганского симбиотического типа позволило не только выделить из природных почв ранее совместимые штаммы ризобий, но и выявить среди них высокоэффективные азотфиксирующие изоляты. Полученные результаты подтверждают, что в почвах Российской Федерации присутствуют штаммы клубеньковых бактерий, одновременно обладающие высокой специфичностью и высокой симбиотической эффективностью. Это создает предпосылки для разработки биопрепаратов нового поколения, предназначенных для сортов гороха, несущих аллель *PsLycX^A*.

3.5. Обсуждение результатов

Выполненная работа показывает, что управление бобово-ризобияльным симбиозом следует рассматривать как один из инструментов в адаптивном растениеводстве [106]. Для бобовых культур ключевое значение имеет биологическая фиксация азота, однако ее эффективность определяется не только способностью растения образовывать клубеньки, но и соответствием между генотипом растения, составом почвенной микробиоты и свойствами инокулянта [6,144,152,178]. В этой связи исследование *PsLykX* направлено на выявление механизма, позволяющего повысить управляемость и предсказуемость симбиоза.

Особый интерес представляет специфичность бобово-ризобияльного симбиоза, проявляемая афганскими формами гороха по отношению к клубеньковым бактериям с усложненной структурой сигнальных молекул [179]. Показано, что растение ограничивает круг совместимых микросимбионтов в зависимости от наличия у бактерий гена *nodX* [156,157]. Это прикладное значение, поскольку в естественной почве даже высокоэффективные инокулянтные штаммы часто уступают аборигенной микробиоте в конкуренции за образование клубеньков [6,144,180]. Следовательно, для повышения вклада БФА в продуктивность недостаточно выделить эффективный штамм; необходимо также обеспечить его преимущественный отбор со стороны растения.

Именно в такой логике в диссертации анализируется *PsLykX*. Аллельные различия этого гена связаны с изменением спектра совместимых ризобий [16], а нокаут *PsLykX* приводит к утрате клубенькообразования [23]. Это указывает на его принципиальную роль в симбиозе и позволяет рассматривать *PsLykX* как функциональный элемент, определяющий специфичность взаимодействия гороха и клубеньковых бактерий.

Полевой блок исследования имеет особое значение, поскольку позволяет оценить проявление специфичности в условиях конкуренции с аборигенной микробиотой. В лабораторных и вегетационных опытах специфичность может быть описана как свойство пары «растение – штамм бактерии», тогда как в поле она определяется взаимодействием всей сложной системы, включая влияние аборигенных штаммов. Полученные результаты показывают, что наличие *Sym2^A/PsLykX^A* изменяет состав клубеньковой популяции и может повышать долю клубеньков, занятых заданным инокулянтом [24]. Это подтверждает возможность целенаправленного смещения конкурентного баланса в пользу совместимого штамма и, следовательно, более контролируемого использования биопрепаратов.

Разработка CAPS-маркера является прямым прикладным продолжением этих результатов. Если *PsLykX* определяет параметры отбора микросимбионта, то селекция по этому гену позволяет формировать генотипы с заданным типом симбиотической специфичности еще до

фенотипической оценки [25]. Практическая ценность маркера состоит в том, что он позволяет перейти от трудоемких экспериментов с инокуляцией к прямому генотипированию селекционного растительного материала.

Выделение совместимых бактериальных изолятов из почв дополняет растительный блок работы. Если генетический и маркерный подходы позволяют управлять растением, то коллекция выделенных изолятов расширяет возможности управления бактериальным компонентом симбиоза. Важно, что поиск проводился непосредственно в природных почвах, а не только среди коллекционных штаммов. Результаты показывают, что локальные почвенные микробные сообщества могут служить источником совместимых микросимбионтов. Вместе с тем полученные данные также указывают на ограничения такого подхода: совместимость с растением, конкурентоспособность и симбиотическая эффективность не являются тождественными признаками. Поэтому для практического использования необходимы дальнейшая генетическая идентификация изолятов [181], анализ *nod*-генов, прямая оценка азотфиксации и проверка поведения штаммов в нестерильной почве и полевых условиях.

В целом диссертация показывает, что адаптивное растениеводство бобовых культур должно основываться на согласованном управлении двумя компонентами симбиоза: генотипом растения и составом инокулируемого биопрепарата (рисунок 3.17). В этом контексте, *PsLykX^A* можно рассматривать как ключевой ген, через который возможно направленно изменять специфичность взаимодействия гороха с клубеньковыми бактериями.



Рисунок 3.17 – Схема, демонстрирующая использование двух согласованных компонентов в адаптивном растениеводстве: генотипа гороха с высокоспецифичной аллелью *PsLykX^A* и биопрепарата на основе клубеньковых бактерий с геном *nodX*

Перспективы работы связаны с точным редактированием аминокислотных замен в *PsLykX*, молекулярно-генетической характеристикой выделенных бактериальных изолятов и их испытанием на разных генотипах гороха в условиях открытого грунта. Это позволит перейти от доказательства принципиальной возможности управления симбиозом к созданию технологии, в которой генотип растения и бактериальный штамм подбираются как согласованная пара.

Таким образом, работа объединяет фундаментальный и прикладной уровни исследования и показывает, что специфичность симбиоза может быть объектом целенаправленного управления. Практическое значение этого подхода состоит в возможности повысить предсказуемость инокуляции, уменьшить зависимость от аборигенной низкоэффективной микробиоты и более полно использовать потенциал БФА при возделывании гороха, и сельском хозяйстве в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе решена научная задача, связанная с установлением функциональной роли гена *PsLykX* в контроле специфичности симбиоза гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с клубеньковыми бактериями и обоснованием возможности его использования в качестве мишени геномного редактирования и молекулярного маркера. Проведенные исследования позволили объединить оценку конкурентного клубенькообразования, разработку инструментов молекулярного генотипирования и выделение новых штаммов клубеньковых бактерий из почв РФ.

Функциональная значимость *PsLykX* подтверждена с использованием технологии CRISPR/Cas9 в системе композитных растений. Направленное индуцирование мутаций в гене приводило к полному отсутствию клубенькообразования на отредактированных корнях. Это свидетельствует о ключевой роли *PsLykX* на ранних этапах распознавания симбионтов и позволяет рассматривать ген *PsLykX* как мишень не только для нокаута, но для редактирования отдельных нуклеотидов, определяющих аминокислотные различия между аллельными вариантами рецептора. В дальнейшем особый интерес представляет применение более точных систем редактирования, включая base editing и prime editing, для направленного воспроизведения природных аллельных вариантов *PsLykX* без полного нарушения функции гена. Такой подход позволит перейти от выключения рецептора к тонкой модификации его специфичности и экспериментально проверить вклад отдельных аминокислотных замен во внеклеточной LysM-содержащей области белка в распознавание Nod-факторов.

Для практического использования разработан и апробирован CAPS-маркер, позволяющий идентифицировать варианты *PsLykX*, ассоциированные с широкой и узкой специфичностью симбиоза. Работоспособность маркера подтверждена на контрастных генотипах и гибридном материале гороха, а новизна разработки защищена патентом.

В вегетационных и полевых экспериментах показано, что аллельное состояние *PsLykX* определяет избирательность взаимодействия гороха со штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, различающимися по структуре Nod-факторов. Установлено, что интрогрессионная линия A33.18, несущая высокоспецифичную аллель *PsLykX*^A в генетическом окружении европейского сорта, преимущественно формирует клубеньки с NodX⁺ штаммами и ограничивает участие неспецифичной аборигенной микробиоты. При инокуляции штаммом ТОМ более 95% клубеньков линии A33.18 были заняты инокулянтom, тогда как у европейского сорта данный показатель не превышал 8%. Полученные результаты подтверждают возможность направленного

управления составом бактериальных симбионтов посредством сочетания определенного аллельного варианта растительного рецептора и соответствующего штамма-инокулянта.

Таким образом, ген *PsLykX* обоснован как функционально значимый компонент системы распознавания клубеньковых бактерий и перспективный инструмент управления специфичностью бобово-ризобияльного симбиоза. Полученные результаты создают научную основу для маркер-ассоциированной селекции сортов гороха, ориентированных на преимущественное взаимодействие с целевыми высокоэффективными NodX⁺ штаммами.

Выделение из почв РФ штаммов, сочетающих высокую специфичность, эффективность азотфиксации и адаптацию к локальным условиям, подтверждает перспективность разработки отечественных биопрепаратов нового поколения. Практическая реализация подхода создания эффективной микробно-растительной системы должна основываться на совместном отборе растительных генотипов с заданной специфичностью и бактериальных штаммов, обладающих конкурентоспособностью и высокой симбиотической эффективностью.

ВЫВОДЫ

1. Редактирование (нокаут) гена *PsLykX* технологией CRISPR/Cas9 у композитных растений гороха в системе «hairy roots» приводит к полному подавлению клубенькообразования, что подтверждает ключевую роль *PsLykX* в развитии бобово-ризобиального симбиоза.
2. Фрагмент гена *PsLykX* может быть использован как молекулярный маркер признака высокой специфичности клубенькообразования, определяемого аллелью *PsLykX^A*.
3. Интрогрессионная линия гороха A33.18 несет 3,1% генома афганского генотипа NGB2150 (Afghanistan) в геномном окружении европейского сорта Rondo, в том числе участок хромосомы 2 (группы сцепления I), содержащий ген *PsLykX*, и характеризуется фенотипом высокой специфичности взаимодействия с клубеньковыми бактериями.
4. В условиях полевого эксперимента аллель *PsLykX^A* обеспечивает проникновение NodX+ штамма ТОМ в 95% клубеньков, образованных интрогрессионной линией A33.18, в то время как у исходного сорта Rondo доля клубеньков, образованных штаммом ТОМ, не превышает 8%.
5. Использование линии NGB2150 (Afghanistan) в качестве «растения-ловушки» позволяет отбирать штаммы клубеньковых бактерий, сочетающих признаки высокой специфичности и высокой эффективности азотфиксации, из различных почв Российской Федерации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Zhuravlev, I. Y.**, Subkhanov, L. R., Sulima, A. S., Zhernakov, A. I., Tikhonovich, I. A., & Zhukov, V. A. (2025). Genome editing of pea (*Pisum sativum* L.) using CRISPR/Cas9 technology. *Ecological genetics*, 23(1), 81 [26].
2. Sulima A. S., **Zhuravlev I. Y.**, Alexeeva E. A., Kliukova M. S., Zorin E. A., Rakova V. A., Gordon M.L., Kulaeva O.A., Romanyuk D.A., Akhtemova G.A., Zhernakov A.I., Semenova E.V., Vishnyakova M.A., Tikhonovich I. A. & Zhukov, V. A. (2025). The genomic and phenotypic characterization of the *Sym2^A* introgression line A33.18 of pea (*Pisum sativum* L.) with the increased specificity of root nodule symbiosis. *Plants*, 14(3), 427 [24].
3. **Zhuravlev, I. Y.**, Lyakhovets, A. A., Matveenkov, A. G., Lebedeva, M. A., Zhernakov, A. I., Simonova, V. Y., Sulima A. S., Tikhonovich I. A. & Zhukov, V. A. (2026). CRISPR/Cas9-mediated knockout of *PsLykX* gene of pea (*Pisum sativum* L.) leads to loss of symbiotic nodules. *Transgenic Research*, 35(1), 14 [23].
4. Жуков В. А., **Журавлев И. Ю.**, Тихонович И. А. Молекулярно-генетический маркер типа CAPS у растений гороха посевного *Pisum sativum* L. и способ идентификации растений, гомозиготных по аллели, обуславливающей формирование повышенной специфичности по отношению к симбиотическим клубеньковым бактериям: пат. RU2815453C1. 2024 [25].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BAC – (от англ. Bacterial Artificial Chromosome), бактериальная искусственная хромосома; используется для клонирования крупных фрагментов геномной ДНК;

BAC-библиотека – коллекция BAC-клонов, содержащих крупные фрагменты геномной ДНК организма;

CAPS-маркер – (от англ. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence marker), молекулярный маркер, основанный на амплификации участка ДНК с последующим рестрикционным анализом;

CRISPR/Cas9 – (от англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9), система направленного геномного редактирования, основанная на Cas9-нуклеазе и направляющей РНК;

GFP – (от англ. Green Fluorescent Protein), зеленый флуоресцентный белок; используется как репортерный маркер трансформации;

gRNA, sgRNA, гРНК – (от англ. single guide RNA), направляющая РНК, обеспечивающая адресную доставку Cas9 к целевому участку ДНК;

GWAS – (от англ. Genome-Wide Association Study), полногеномный ассоциативный анализ;

LysM-домены – лизин-мотивные домены рецепторных белков, участвующие в распознавании хитиноподобных и липохитоолигосахаридных молекул, включая Nod-факторы;

NodX⁺ – штамм клубеньковых бактерий, несущий функциональный ген *nodX* и способный синтезировать соответствующим образом, модифицированный Nod-фактор;

NodX[–] – штамм клубеньковых бактерий, не имеющий функционального гена *nodX* или не обеспечивающий *nodX*-зависимую модификацию Nod-фактора;

TD-PCR – (от англ. TouchDown PCR), вариант полимеразной цепной реакции с постепенным снижением температуры отжига праймеров;

TILLING – (от англ. Targeting Induced Local Lesions In Genomes), метод выявления индуцированных мутаций в целевых генах;

tRNA-gRNA – кассета экспрессии нескольких направляющих РНК, в которой последовательности gRNA разделены тРНК-элементами для последующего процессинга;

Т-ДНК – (от англ. transfer DNA), участок ДНК Ti/Ri-плазмиды агробактерий, переносимый в геном растительной клетки;

КОЕ – колониеобразующие единицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kokkini M. и др. Enhancing ecosystem services in agriculture: the special role of legume intercropping // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. Frontiers Media SA, 2025. Т. 9. С. 1547879.
2. FAOSTAT [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/TCL> (дата обращения: 17.07.2026).
3. Provorov N. A. Agricultural microbiology and symbiogenetics: synthesis of classical ideas and construction of highly productive agroecosystems (review) // *S-h. biol.* 2022. Т. 57, № 5. С. 821-831 (In Russ).
4. Kaziūnienė J. и др. Competitiveness and Nitrogen Fixation Efficiency Analysis of *Rhizobium leguminosarum* Strains in Different Field Pea (*Pisum sativum* L.) Genotypes // *Agriculture*. 2025. Т. 15, № 16. С. 1784.
5. Allito B., Nana E.-M., Alemneh A. Rhizobia Strain and Legume Genome Interaction Effects on Nitrogen Fixation and Yield of Grain Legume: A Review // *msb*. 2015.
6. Mendoza-Suárez M. и др. Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the *Rhizobium*-Legume Symbioses // *Front. Plant Sci.* 2021. Т. 12. С. 690567.
7. Tikhonovich I. A., Provorov N. A. From plant-microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the interspecies genetic integration // *Annals of Applied Biology*. 2009. Т. 154, № 3. С. 341–350.
8. Geurts R. и др. Sym2 of pea is involved in a nodulation factor-perception mechanism that controls the infection process in the epidermis // *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, 1997. Т. 115, № 2. С. 351–359.
9. Holl F. B. Host plant control of the inheritance of dinitrogen fixation in the *Pisum*-*Rhizobium* symbiosis // *Euphytica*. 1975. Т. 24, № 3. С. 767–770.
10. Davis E. O., Evans I. J., Johnston A. W. B. Identification of nodX, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas // *Mol Gen Genet*. 1988. Т. 212, № 3. С. 531–535.
11. Kozik A. и др. Pea lines carrying sym1 or sym2 can be nodulated by *Rhizobium* strains containing nodX; sym1 and sym2 are allelic // *Plant Science*. 1995. Т. 108, № 1. С. 41–49.
12. Limpens E. и др. LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection // *Science*. 2003. Т. 302, № 5645. С. 630–633.
13. Madsen E. B. и др. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals // *Nature*. Nature Publishing Group UK London, 2003. Т. 425, № 6958. С. 637–640.
14. Zhukov V. и др. The Pea Sym37 Receptor Kinase Gene Controls Infection-Thread Initiation and Nodule Development // *MPMI*. 2008. Т. 21, № 12. С. 1600–1608.
15. Kirienko A. N. и др. Role of a receptor-like kinase K1 in pea *Rhizobium* symbiosis development // *Planta*. 2018. Т. 248, № 5. С. 1101–1120.
16. Sulima A. S. и др. New sources of *Sym2^A* allele in the pea (*Pisum sativum* L.) carry the unique variant of candidate LysM-RLK gene *LykX* // *PeerJ*. 2019. Т. 7. С. e8070.
17. Sulima A. S. и др. Selection Signatures in the First Exon of Paralogous Receptor Kinase Genes from the Sym2 Region of the *Pisum sativum* L. Genome // *Front. Plant Sci.* 2017. Т. 8. С. 1957.
18. Firmin J. L. и др. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by nodX, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor // *Molecular Microbiology*. 1993. Т. 10, № 2. С. 351–360.
19. Smit P. и др. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling // *Plant physiology*. American Society of Plant Biologists, 2007. Т. 145, № 1. С. 183–191.
20. Amor B. B. и др. The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation // *The Plant Journal*. 2003. Т. 34, № 4. С. 495–506.

21. Young J. P. W. Linkage of sym-2, the symbiotic specificity locus of *Pisum sativum* // *Journal of Heredity*. 1985. Т. 76, № 3. С. 207–208.
22. Сулима А. С. Характеристика гена *LykX*, определяющего специфичность взаимодействий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum*: Диссертация. Санкт-Петербург: ФГБНУ «ВНИИСХМ», 2020. 135 с.
23. Zhuravlev I. Yu. и др. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *PsLykX* gene of pea (*Pisum sativum* L.) leads to loss of symbiotic nodules // *Transgenic Res.* 2026. Т. 35, № 1. С. 14.
24. Sulima A. S. и др. The Genomic and Phenotypic Characterization of the Sym2A Introgression Line A33.18 of Pea (*Pisum sativum* L.) with the Increased Specificity of Root Nodule Symbiosis // *Plants*. 2025. Т. 14, № 3. С. 427.
25. Жуков В. А., Журавлев И. Ю., Тихонович И. А. Молекулярно-генетический маркер типа CAPS у растений гороха посевного *Pisum sativum* L. и способ идентификации растений, гомозиготных по аллели, обуславливающей формирование повышенной специфичности по отношению к симбиотическим клубеньковым бактериям: пат. RU2815453C1 USA. 2024.
26. Zhuravlev I. Yu. и др. Genome editing of pea (*Pisum sativum* L.) using CRISPR/Cas9 technology: Review // *Ecological genetics*. 2025. Т. 23, № 1. С. 81–98.
27. Zohary D., Hopf M. Domestication of Pulses in the Old World: Legumes were companions of wheat and barley when agriculture began in the Near East. // *Science*. 1973. Т. 182, № 4115. С. 887–894.
28. Vavilov N. I. Geographical centers of our cultivated plants // *Proceedings of the 5th International Congress of Genetics*, NY. 1928. С. 342–369.
29. Smýkal P. и др. Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era: 2 // *Agronomy. Molecular Diversity Preservation International*, 2012. Т. 2, № 2. С. 74–115.
30. Smýkal P. и др. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding // *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2015. Т. 34, № 1–3. С. 43–104.
31. Bennetau-Pelissero C. Plant Proteins from Legumes // *Bioactive Molecules in Food* / под ред. Mérillon J.-M., Ramawat K. G. Cham: Springer International Publishing, 2019. С. 223–265.
32. Калорийность Горох, зерно цельное. Химический состав и пищевая ценность. [Электронный ресурс]. URL: https://health-diet.ru/base_of_food/sostav/68.php?ysclid=mosboxoqbc744041271 (дата обращения: 05.05.2026).
33. Sharma A. и др. Garden Pea (*Pisum sativum* L.) // *Vegetable Crops*. Springer, 2025. С. 933–978.
34. Smýkal P. Pea (*Pisum sativum* L.) in biology prior and after Mendel's discovery // *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2014. Т. 50, № 2. С. 52–64.
35. Vishniyakova M. A. и др. VIR GLOBAL COLLECTION OF GRAIN LEGUME CROP GENETIC RESOURCES: REPLENISHMENT, CONSERVATION AND STUDYING. N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources: Federal Research Center the N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 2018.
36. Parihar A. K. и др. Genomics Enabled Breeding Strategies for Major Biotic Stresses in Pea (*Pisum sativum* L.) // *Front. Plant Sci.* 2022. Т. 13. С. 861191.
37. Hirsch A. M. Developmental biology of legume nodulation // *New Phytologist*. Wiley Online Library, 1992. Т. 122, № 2. С. 211–237.
38. Shumilina J. и др. Signaling in Legume–Rhizobia Symbiosis // *IJMS*. 2023. Т. 24, № 24. С. 17397.
39. Regus J. U. и др. Cell autonomous sanctions in legumes target ineffective rhizobia in nodules with mixed infections // *American Journal of Botany*. Wiley Online Library, 2017. Т. 104, № 9. С. 1299–1312.
40. Srivastava R. K., Yetgin A., Srivastava S. The role of legume roots in carbon sequestration, soil health enhancement, and salinity mitigation under climate change: A comprehensive review // *Soil and Tillage Research*. 2025. Т. 253. С. 106656.

41. Provorov N. A., Borisov A. Yu., Tikhonovich I. A. Developmental Genetics and Evolution of Symbiotic Structures in Nitrogen-fixing Nodules and Arbuscular Mycorrhiza // *Journal of Theoretical Biology*. 2002. T. 214, № 2. С. 215–232.
42. Shtark O. Y. и др. Mutually beneficial legume symbioses with soil microbes and their potential for plant production // *Symbiosis*. 2012. T. 58, № 1. С. 51–62.
43. Gobbato E. и др. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling // *Current Biology*. Elsevier, 2012. T. 22, № 23. С. 2236–2241.
44. Teyssier E. и др. A plant Lysin Motif Receptor-Like Kinase plays an ancestral function in mycorrhiza // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2025. T. 122, № 24. С. e2426063122.
45. Frank S. A. Models of symbiosis // *The American Naturalist*. The University of Chicago Press, 1997. T. 150, № S1. С. S80-s99.
46. Santoyo G. и др. Plant growth-promoting bacterial endophytes // *Microbiological Research*. 2016. T. 183. С. 92–99.
47. Gellért C. и др. Not All Allies Are Welcome: Partner Discrimination in Legume–Rhizobium Symbiosis // *MPMI*. 2026. T. 39, № 2. С. 192–204.
48. Partida-Martínez L. P., Heil M. The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact? // *Front. Plant Sci*. 2011. T. 2.
49. Van Rhijn P., Vanderleyden J. The Rhizobium-plant symbiosis // *Microbiol Rev*. 1995. T. 59, № 1. С. 124–142.
50. Weeden N. F., Kneen B. E., LaRue T. A. Genetic analysis of sym genes and other nodule-related genes in *Pisum sativum* // *Nitrogen Fixation* / под ред. Gresshoff P. M. и др. Boston, MA: Springer US, 1990. С. 323–330.
51. Tsyganov V. E., Tsyganova A. V. Symbiotic Regulatory Genes Controlling Nodule Development in *Pisum sativum* L. // *Plants*. 2020. T. 9, № 12. С. 1741.
52. Tsyganov V. E. и др. Symbiotic gene Sym 33 is located on linkage group I. 2006.
53. Temnykh S. V. и др. Localization of nod-3, a gene conditioning hypernodulation, and identification of a novel translocation in *Pisum sativum* L. cv. Rondo. 1995.
54. Feng C. и др. Genomic and genetic insights into Mendel’s pea genes // *Nature*. 2025. T. 642, № 8069. С. 980–989.
55. Kreplak J. и др. A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution // *Nat Genet*. 2019. T. 51, № 9. С. 1411–1422.
56. Yang T. и др. Improved pea reference genome and pan-genome highlight genomic features and evolutionary characteristics // *Nat Genet*. 2022. T. 54, № 10. С. 1553–1563.
57. PEAGDB|Blast [Электронный ресурс]. URL: <https://peagdb.com/blast/> (дата обращения: 16.06.2026).
58. Liu N. и др. Reference genome sequence and population genomic analysis of peas provide insights into the genetic basis of Mendelian and other agronomic traits // *Nat Genet*. 2024. T. 56, № 9. С. 1964–1974.
59. Zhernakov A. I. и др. Application of Quantitative Trait Loci (QTL) mapping to study the interactions of pea (*Pisum sativum* L.) with rhizosphere microorganisms // *Ecological genetics*. 2025. T. 23, № 1. С. 65–79.
60. Tsyganov V. E., Tsyganova A. V. Symbiotic Regulatory Genes Controlling Nodule Development in *Pisum sativum* L. // *Plants*. 2020. T. 9, № 12. С. 1741.
61. Deineko E. V. Modification of the Plant Genome by Genetic Engineering Methods: Directions and Ways of Development // *Russ J Plant Physiol*. 2024. T. 71, № 5. С. 155.
62. Permyakova N. V., Deineko E. V. Crop Improvement: Comparison of Transgenesis and Gene Editing // *Horticulturae*. 2024. T. 10, № 1. С. 57.
63. Barrangou R. и др. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes // *Science*. 2007. T. 315, № 5819. С. 1709–1712.
64. Jinek M. и др. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity // *Science*. 2012. T. 337, № 6096. С. 816–821.

65. Gasiunas G. и др. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. Т. 109, № 39.
66. Shan Q. и др. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system // *Nat Biotechnol.* 2013. Т. 31, № 8. С. 686–688.
67. Li J.-F. и др. Multiplex and homologous recombination–mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 // *Nat Biotechnol.* 2013. Т. 31, № 8. С. 688–691.
68. Nekrasov V. и др. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease // *Nat Biotechnol.* 2013. Т. 31, № 8. С. 691–693.
69. Sun X. и др. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system // *Sci Rep. Nature Publishing Group*, 2015. Т. 5, № 1. С. 10342.
70. Ji J. и др. Genome Editing in Cowpea *Vigna unguiculata* Using CRISPR-Cas9 // *IJMS.* 2019. Т. 20, № 10. С. 2471.
71. Badhan S., Ball A. S., Mantri N. First Report of CRISPR/Cas9 Mediated DNA-Free Editing of 4CL and RVE7 Genes in Chickpea Protoplasts // *IJMS.* 2021. Т. 22, № 1. С. 396.
72. Tvorogova V. E. и др. The transformation and genome editing of *Pisum sativum*: protocols and their modifications // *Ecological genetics.* 2023. Т. 21, № 3S. С. 32–33.
73. Li G. и др. Development of an *Agrobacterium*-mediated CRISPR/Cas9 system in pea (*Pisum sativum* L.) // *The Crop Journal.* 2023. Т. 11, № 1. С. 132–139.
74. Bhowmik P. и др. CRISPR/Cas9-mediated lipoxygenase gene-editing in yellow pea leads to major changes in fatty acid and flavor profiles // *Front. Plant Sci. Frontiers*, 2023. Т. 14.
75. Hodgins C. L. и др. Creating saponin-free yellow pea seeds by CRISPR/Cas9-enabled mutagenesis on β -amyrin synthase // *Plant Direct.* 2024. Т. 8, № 1. С. e563.
76. Soulard C. и др. Efficient and heritable gene editing through CRISPR -Cas9 in *Pisum sativum* // *Plant Biotechnology Journal.* 2025. Т. 23, № 8. С. 3398–3400.
77. Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S. P. Virus-induced gene silencing in tomato // *The Plant Journal.* 2002. Т. 31, № 6. С. 777–786.
78. Kaur N. и др. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome // *Funct Integr Genomics.* 2018. Т. 18, № 1. С. 89–99.
79. Jelen H. *Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties.* CRC Press, 2011. 506 с.
80. Wang J. и др. Generation of seed lipoxygenase-free soybean using CRISPR-Cas9 // *The Crop Journal.* 2020. Т. 8, № 3. С. 432–439.
81. LeBlanc C. и др. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress // *The Plant Journal.* 2018. Т. 93, № 2. С. 377–386.
82. Vernoud V. и др. β -Amyrin Synthase1 Controls the Accumulation of the Major Saponins Present in Pea (*Pisum sativum*) // *Plant and Cell Physiology.* 2021. Т. 62, № 5. С. 784–797.
83. Jinek M. и др. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation // *Science.* 2014. Т. 343, № 6176. С. 1247997.
84. Lieber M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. Т. 79, № 1. С. 181–211.
85. San Filippo J., Sung P., Klein H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination // *Annu. Rev. Biochem.* 2008. Т. 77, № 1. С. 229–257.
86. Rozov S. M., Deineko E. V. Recombinase-Based Engineering of Plant Genomes in the Era of Genome Editing // *Mol Biol.* 2025. Т. 59, № 6. С. 849–864.
87. Komor A. C. и др. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage // *Nature.* 2016. Т. 533, № 7603. С. 420–424.
88. Gaudelli N. M. и др. Publisher Correction: Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage // *Nature.* 2018. Т. 559, № 7714. С. E8–E8.
89. Li C. и др. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors // *Nat Biotechnol.* 2020. Т. 38, № 7. С. 875–882.

90. Anzalone A. V. и др. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA // *Nature*. 2019. Т. 576, № 7785. С. 149–157.
91. Molla K. A. и др. Precise plant genome editing using base editors and prime editors // *Nat. Plants*. 2021. Т. 7, № 9. С. 1166–1187.
92. Ludvíková M., Griga M. Pea transformation: History, current status and challenges // *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2022. Т. 58, № 3. С. 127–161.
93. Lutova L. A., Zabelina E. K. Callus and shoot formation in different forms of *Pisum sativum* L. in vitro // *Genetica*. 1988. Т. 24. С. 1632–1640.
94. Aftabi M., Teresa Negawo A., Hassan F. Improved Protocol for *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Pea (*Pisum sativum*) // *Mol Biol.* 2017. Т. 7, № 1.
95. Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. Study of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.) // *Molecular Breeding*. 2000. Т. 6, № 2. С. 185–194.
96. Cardi T. и др. CRISPR/Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation // *Trends in Plant Science*. 2023. Т. 28, № 10. С. 1144–1165.
97. Altpeter F. и др. Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing // *Plant Cell*. 2016. С. tpc.00196.2016.
98. Pniewski T., Kapusta J. Efficiency of transformation of Polish cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) with various regeneration capacity by using hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strains // *Journal of Applied Genetics*. 2005. Т. 46, № 2. С. 139–147.
99. Ran Y., Liang Z., Gao C. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing // *Sci. China Life Sci.* 2017. Т. 60, № 5. С. 490–505.
100. Sanford J. C. Biolistic plant transformation // *Physiologia Plantarum*. 1990. Т. 79, № 1. С. 206–209.
101. Chowrira G. M. и др. Transgenic grain legumes obtained by in planta electroporation-mediated gene transfer // *Mol Biotechnol.* 1996. Т. 5, № 2. С. 85–96.
102. Wu S. и др. Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana // *BMC Plant Biology*. Springer, 2020. Т. 20, № 1. С. 425.
103. Kiryushkin A. S. и др. Hairy CRISPR: Genome Editing in Plants Using Hairy Root Transformation // *Plants*. 2021. Т. 11, № 1. С. 51.
104. Niazi M. и др. Optimization of in vitro and ex vitro *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of soybean for visual screening of transformants using RUBY // *Front. Plant Sci.* 2023. Т. 14. С. 1207762.
105. Dodds P. N., Chen J., Outram M. A. Pathogen perception and signaling in plant immunity // *The Plant Cell*. 2024. Т. 36, № 5. С. 1465–1481.
106. Porter S. S. и др. Host-imposed control mechanisms in legume–rhizobia symbiosis // *Nat Microbiol.* 2024. Т. 9, № 8. С. 1929–1939.
107. Fronk D. C., Sachs J. L. Symbiotic organs: the nexus of host–microbe evolution // *Trends in Ecology & Evolution*. 2022. Т. 37, № 7. С. 599–610.
108. Quilbé J. и др. Molecular Mechanisms of Intercellular Rhizobial Infection: Novel Findings of an Ancient Process // *Front. Plant Sci.* 2022. Т. 13. С. 922982.
109. Downie J. A. Legume nodulation // *Current biology*. Elsevier, 2014. Т. 24, № 5. С. R184–R190.
110. Vyas V. и др. Legume-symbiosome signal exchange driving nodulation and nitrogen fixation // *Symbiosis*. 2026. Т. 99, № 2. С. 99–120.
111. Bhatt R. и др. Sustainable strategies to limit nitrogen loss in agriculture through improving its use efficiency—aiming to reduce environmental pollution // *Journal of Agriculture and Food Research*. 2025. Т. 22. С. 101957.
112. Soudzilovskaia N. A. и др. Legumes affect alpine tundra community composition via multiple biotic interactions // *Ecosphere*. Wiley Online Library, 2012. Т. 3, № 4. С. 1–15.
113. Compant S. и др. Harnessing the plant microbiome for sustainable crop production // *Nat Rev Microbiol.* 2025. Т. 23, № 1. С. 9–23.

114. Zipfel C., Oldroyd G. E. D. Plant signalling in symbiosis and immunity // *Nature*. 2017. T. 543, № 7645. C. 328–336.
115. Velandia K., Reid J. B., Foo E. Right time, right place: The dynamic role of hormones in rhizobial infection and nodulation of legumes // *Plant Communications*. 2022. T. 3, № 5. C. 100327.
116. Ferguson B. J. и др. Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation // *JIPB*. 2010. T. 52, № 1. C. 61–76.
117. Marañón G., Kondorosi A. Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? // *Front. Microbiol.* 2014. T. 5.
118. Tsyganova A. V., Brewin N. J., Tsyganov V. E. Structure and Development of the Legume-Rhizobial Symbiotic Interface in Infection Threads // *Cells*. 2021. T. 10, № 5. C. 1050.
119. Wang Q., Liu J., Zhu H. Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions // *Front. Plant Sci.* 2018. T. 9. C. 313.
120. Perret X., Staehelin C., Broughton W. J. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 2000. T. 64, № 1. C. 180–201.
121. Geurts R., Bisseling T. *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling // *Plant Cell*. 2002. T. 14, № suppl 1. C. S239–S249.
122. Schultze M., Kondorosi A. Regulation of symbiotic root nodule development // *Annu. Rev. Genet.* 1998. T. 32, № 1. C. 33–57.
123. Larrainzar E. и др. Deep Sequencing of the *Medicago truncatula* Root Transcriptome Reveals a Massive and Early Interaction between Nodulation Factor and Ethylene Signals // *Plant Physiology*. 2015. T. 169, № 1. C. 233–265.
124. Mergaert P., Montagu M. V., Holsters M. Molecular mechanisms of Nod factor diversity // *Molecular microbiology*. 1997. T. 25, № 5. C. 811–817.
125. Dénarié J., Debellé F., Promé J.-C. RHIZOBIUM LIPO-CHITOOLIGOSACCHARIDE NODULATION FACTORS: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. T. 65, № 1. C. 503–535.
126. Gysel K. и др. Structural basis for size-selective perception of chitin in plants. *Plant Biology*, 2025.
127. Bourion V. и др. Co-inoculation of a Pea Core-Collection with Diverse Rhizobial Strains Shows Competitiveness for Nodulation and Efficiency of Nitrogen Fixation Are Distinct traits in the Interaction // *Front. Plant Sci.* 2018. T. 8. C. 2249.
128. Radutoiu S. и др. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // *Nature*. Nature Publishing Group UK London, 2003. T. 425, № 6958. C. 585–592.
129. Wang D. и др. A kinase mediator of rhizobial symbiosis and immunity in *Medicago* // *Nature*. 2025. T. 643, № 8072. C. 768–775.
130. Bozsoki Z. и др. Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017. T. 114, № 38.
131. Ibáñez F., Wall L., Fabra A. Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots // *EXBOTJ*. 2016. C. erw387.
132. Quilbé J. и др. Molecular Mechanisms of Intercellular Rhizobial Infection: Novel Findings of an Ancient Process // *Front. Plant Sci.* 2022. T. 13. C. 922982.
133. Gao J.-P. и др. Unraveling the rhizobial infection thread // *Journal of Experimental Botany* / под ред. Chiurazzi M. 2024. T. 75, № 8. C. 2235–2245.
134. Walker L., Lagunas B., Gifford M. L. Determinants of host range specificity in legume-rhizobia symbiosis // *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, 2020. T. 11. C. 585749.
135. Su C. и др. Transcellular progression of infection threads in *Medicago truncatula* roots is associated with locally confined cell wall modifications // *Current Biology*. 2023. T. 33, № 3. C. 533–542.e5.

136. Mergaert P. и др. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium–legume symbiosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences. National Academy of Sciences*, 2006. Т. 103, № 13. С. 5230–5235.
137. Udvardi M., Poole P. S. Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. Т. 64, № 1. С. 781–805.
138. Vasse J. и др. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules // *J Bacteriol.* 1990. Т. 172, № 8. С. 4295–4306.
139. Yang J., Gao F., Pan H. Essential roles of nodule cysteine-rich peptides in maintaining the viability of terminally differentiated bacteroids in legume–rhizobia symbiosis // *JIPB*. 2025. Т. 67, № 4. С. 1077–1085.
140. Oono R., Denison R. F. Comparing Symbiotic Efficiency between Swollen versus Nonswollen Rhizobial Bacteroids // *Plant Physiology*. 2010. Т. 154, № 3. С. 1541–1548.
141. Prell J., Poole P. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules // *Trends in Microbiology*. 2006. Т. 14, № 4. С. 161–168.
142. Denison R. F., Layzell D. B. Measurement of Legume Nodule Respiration and O₂ Permeability by Noninvasive Spectrophotometry of Leghemoglobin // *Plant Physiol.* 1991. Т. 96, № 1. С. 137–143.
143. Lepetit M., Brouquisse R. Control of the rhizobium–legume symbiosis by the plant nitrogen demand is tightly integrated at the whole plant level and requires inter-organ systemic signaling // *Frontiers in Plant Science. Frontiers Media SA*, 2023. Т. 14. С. 1114840.
144. Yeremko L. и др. Role of Environmental Factors in Legume-Rhizobium Symbiosis: A Review // *Biomolecules*. 2025. Т. 15, № 1. С. 118.
145. Liu Y. и др. Interactive influences of intercropping by nitrogen on flavonoid exudation and nodulation in faba bean // *Sci Rep*. 2019. Т. 9, № 1. С. 4818.
146. Ralston E. J., Imsande J. Nodulation of Hydroponically Grown Soybean Plants and Inhibition of Nodule Development by Nitrate // *J Exp Bot.* 1983. Т. 34, № 10. С. 1371–1378.
147. Li S. и др. Systemic regulation of nodule structure and assimilated carbon distribution by nitrate in soybean // *Front. Plant Sci.* 2023. Т. 14. С. 1101074.
148. Lin J., Frank M., Reid D. No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis // *Plant Communications*. 2020. Т. 1, № 5. С. 100104.
149. Tsyganova A. V. и др. Morphology of Vavilovia formosa (Steven) Fed. Nodules Induced by Different Rhizobia Strains // *Plants*. 2025. Т. 14, № 24. С. 3764.
150. Rahman A. и др. Competitive interference among rhizobia reduces benefits to hosts // *Current Biology*. 2023. Т. 33, № 14. С. 2988-3001.e4.
151. Younginger B. S., Friesen M. L. Connecting signals and benefits through partner choice in plant–microbe interactions // *FEMS Microbiology Letters*. 2019. Т. 366, № 18. С. fnz217.
152. Тихонович И. А. и др. Принцип дополнительности геномов в расширении адаптационного потенциала растений // *Генетика*. 2015. Т. 51, № 9. С. 973–990.
153. Cooper J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue: Early legume-rhizobia interactions // *Journal of Applied Microbiology*. 2007. Т. 103, № 5. С. 1355–1365.
154. Razumovskaya Z. G. Nodule formation in different varieties of peas // *Microbiology*. 1937. Т. 6, № 3. С. 321-328 (In Russ).
155. Govorov L. I. Afghan peas // *Proceedings on applied botany, genetics and breeding (Gorokh Afganistana. Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii)*. 1928. Т. 19. С. 497–522.
156. Lie T. A. Symbiotic specialisation in pea plants: The requirement of specific Rhizobium strains for peas from Afghanistan // *Annals of Applied Biology*. 1978. Т. 88, № 3. С. 462–465.
157. Lie T. A. Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European Rhizobium leguminosarum strains // *Plant Soil*. 1984. Т. 82, № 3. С. 415–425.
158. Geurts R. и др. Sym2 of Pea Is Involved in a Nodulation Factor-Perception Mechanism That Controls the Infection Process in the Epidermis // *Plant Physiology*. 1997. Т. 115, № 2. С. 351–359.

159. Borisov A. Yu. и др. Regulatory genes of garden pea (*Pisum sativum* L.) controlling the development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza: A review of basic and applied aspects // *Appl Biochem Microbiol.* 2007. Т. 43, № 3. С. 237–243.
160. Li R. и др. Natural Variation in Host-Specific Nodulation of Pea Is Associated with a Haplotype of the SYM37 LysM-Type Receptor-Like Kinase // *MPMI.* 2011. Т. 24, № 11. С. 1396–1403.
161. Zorin E. A. и др. Genomic and Transcriptomic Analysis of Pea (*Pisum sativum* L.) Breeding Line ‘Triumph’ with High Symbiotic Responsivity // *Plants.* 2023. Т. 13, № 1. С. 78.
162. Afonin A. и др. Draft genome of the strain RCAM1026 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Genomics Data.* 2017. Т. 11. С. 85–86.
163. Fahraeus G. The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique // *Microbiology. Microbiology Society,* 1957. Т. 16, № 2. С. 374–381.
164. Xing H.-L. и др. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants // *BMC plant biology.* Springer, 2014. Т. 14, № 1. С. 327.
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.* Oxford University Press, 2014. Т. 30, № 10. С. 1473–1475.
166. Concordet J.-P., Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens // *Nucleic Acids Research.* 2018. Т. 46, № W1. С. W242–W245.
167. Quandt H. J., Pühler A., Broer I. Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules // *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions.* St. Paul, MN: APS Press, 1993. Т. 6, № 6. С. 699–706.
168. Wise A. A., Liu Z., Binns A. N. Three Methods for the Introduction of Foreign DNA into *Agrobacterium* // *Agrobacterium Protocols.* New Jersey: Humana Press, 2006. Т. 343. С. 43–54.
169. Shaphiro S., Wilk M. An analysis of variance test for normality // *Biometrika.* 1965. Т. 52, № 3. С. 591–611.
170. Wilcoxon F. Individual Comparisons by Ranking Methods // *Biometrics Bulletin.* 1945. Т. 1, № 6. С. 80.
171. Mann H. B., Whitney D. R. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other // *Ann. Math. Statist.* 1947. Т. 18, № 1. С. 50–60.
172. Kozik A. Fine mapping of the sym2 locus of pea linkage group 1. Wageningen University and Research, 1996.
173. Kozik A. Fine mapping of the sym2 locus of pea linkage group 1. – Wageningen University and Research, 1996. 1996.
174. Streeter J. G. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation // *Can. J. Microbiol.* 1994. Т. 40, № 7. С. 513–522.
175. Provorov N. A. и др. Microevolution, speciation and macroevolution in rhizobia: Genomic mechanisms and selective patterns // *Front. Plant Sci.* 2022. Т. 13. С. 1026943.
176. Onishchuk O. P., Vorobyov N. I., Provorov N. A. Nodulation competitiveness of nodule bacteria: Genetic control and adaptive significance: Review // *Appl Biochem Microbiol.* 2017. Т. 53, № 2. С. 131–139.
177. Tsyganov V. E., Tsyganova A. V. Symbiotic Regulatory Genes Controlling Nodule Development in *Pisum sativum* L. // *Plants.* 2020. Т. 9, № 12. С. 1741.
178. Belimov A. A. и др. Role of Plant Genotype and Soil Conditions in Symbiotic Plant-Microbe Interactions for Adaptation of Plants to Cadmium-Polluted Soils // *Water Air Soil Pollut.* 2015. Т. 226, № 8. С. 264.
179. Govorov L. I. The peas of Afghanistan // *Bull. Appl. Bot.* 1928. Т. 19. С. 497–522.
180. Provorov N. A., Tikhonovich I. A. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. Genetic Resources and Crop Evolution // *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2003. Т. 50, № 1. С. 89–99.
181. Andronov E. E. и др. Strain-Specific Markers of Rhizobia according to Whole Genome Sequencing Data // *Microbiology.* Springer, 2025. Т. 94, № 1. С. 29–37.

ПРИЛОЖЕНИЕ А.

Пищевая ценность и химический состав гороха

Таблица А1 – Пищевая ценность и химический состав цельного зерна гороха: в таблице указаны средние нормы витаминов и минералов для взрослого человека

Нутриент	Количество	Норма	% от нормы в 100 г	% от нормы в 100 ккал
Калорийность	298 ккал	1684 ккал	17,7%	5,9%
Белки	20,5 г	76 г	27%	9,1%
Жиры	2 г	56 г	3,6%	1,2%
Углеводы	49,5 г	219 г	22,6%	7,6%
Углеводы (общие)	60,7 г	~		
Пищевые волокна	11,2 г	20 г	56%	18,8%
Вода	14 г	2273 г	0,6%	0,2%
Витамины				
Витамин А, РЭ	2 мкг	900 мкг	0,2%	0,1%
<i>бета Каротин</i>	0,01 мг	5 мг	0,2%	0,1%
Витамин В1, тиамин	0,81 мг	1,5 мг	54%	18,1%
Витамин В2, рибофлавин	0,15 мг	1,8 мг	8,3%	2,8%
Витамин В4, холин	200 мг	500 мг	40%	13,4%
Витамин В5, пантотеновая	2,2 мг	5 мг	44%	14,8%
Витамин В6, пиридоксин	0,27 мг	2 мг	13,5%	4,5%
Витамин В9, фолаты	16 мкг	400 мкг	4%	1,3%
Витамин Е, альфа токоферол, ТЭ	0,7 мг	15 мг	4,7%	1,6%
Витамин Н, биотин	19 мкг	50 мкг	38%	12,8%
Витамин РР, НЭ	6,5 мг	20 мг	32,5%	10,9%
<i>Ниацин</i>	2,2 мг	~		
Макроэлементы				

Продолжение Таблицы А1

Калий, K	873 мг	2500 мг	34,9%	11,7%
Кальций, Ca	115 мг	1000 мг	11,5%	3,9%
Кремний, Si	83 мг	30 мг	276,7%	92,9%
Магний, Mg	107 мг	400 мг	26,8%	9%
Натрий, Na	33 мг	1300 мг	2,5%	0,8%
Сера, S	190 мг	1000 мг	19%	6,4%
Фосфор, P	329 мг	800 мг	41,1%	13,8%
Хлор, Cl	137 мг	2300 мг	6%	2%
Микроэлементы				
Алюминий, Al	1180 мкг	~		
Бор, B	670 мкг	~		
Ванадий, V	150 мкг	~		
Железо, Fe	6,8 мг	18 мг	37,8%	12,7%
Йод, I	5,1 мкг	150 мкг	3,4%	1,1%
Кобальт, Co	13,1 мкг	10 мкг	131%	44%
Марганец, Mn	1,75 мг	2 мг	87,5%	29,4%
Медь, Cu	750 мкг	1000 мкг	75%	25,2%
Молибден, Mo	84,2 мкг	70 мкг	120,3%	40,4%
Никель, Ni	246,6 мкг	~		
Олово, Sn	16,2 мкг	~		
Селен, Se	13,1 мкг	55 мкг	23,8%	8%
Стронций, Sr	80 мкг	~		
Титан, Ti	181 мкг	~		
Фтор, F	30 мкг	4000 мкг	0,8%	0,3%
Хром, Cr	9 мкг	50 мкг	18%	6%
Цинк, Zn	3,18 мг	12 мг	26,5%	8,9%
Цирконий, Zr	11,2 мкг	~		
Усвояемые углеводы				
Крахмал и декстрины	44,9 г	~		
Моно- и дисахариды (сахара)	4,6 г	~		
Галактоза	0,9 г	~		
Глюкоза (декстроза)	1 г	~		
Мальтоза	0,7 г	~		
Сахароза	0,8 г	~		
Фруктоза	1,3 г	~		
Незаменимые аминокислоты				
Аргинин*	1,62 г	~		
Валин	1,01 г	~		

Продолжение Таблицы А1

Гистидин*	0,46 г	~		
Изолейцин	1,09 г	~		
Лейцин	1,65 г	~		
Лизин	1,55 г	~		
Метионин	0,21 г	~		
Метионин + Цистеин	0,46 г	~		
Треонин	0,84 г	~		
Триптофан	0,26 г	~		
Фенилаланин	1,01 г	~		
Фенилаланин+Тирозин	1,7 г	~		
Заменимые аминокислоты				
Аланин	0,91 г	~		
Аспарагиновая кислота	2,23 г	~		
Глицин	0,95 г	~		
Глутаминовая кислота	3,17 г	~		
Пролин	0,66 г	~		
Серин	0,84 г	~		
Тирозин	0,69 г	~		
Цистеин	0,25 г	~		
Жирные кислоты				
Омега-3 жирные кислоты	0,12 г	от 0,9 до 3,7 г	13,3%	4,5%
Омега-6 жирные кислоты	0,91 г	от 4,7 до 16,8 г	19,4%	6,5%
бета Ситостерол	50 мг	~		
Насыщенные жирные кислоты	0,2 г	max 18,7 г		
16:0 Пальмитиновая	0,2 г	~		
18:0 Стеариновая	0,04 г	~		
20:0 Арахидовая	0,01 г	~		

Продолжение Таблицы А1

Мононенасыщенные жирные кислоты	0,36 г	min 16,8 г	2,1%	0,7%
18:1 Олеиновая (ud)	0,36 г	~		
Полиненасыщенные жирные кислоты	1,03 г	от 11,2 до 20,6 г	9,2%	3,1%
18:2 Линолевая (ud)	0,91 г	~		
18:3 Линоленовая (ud)	0,12 г	~		

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.

Характеристика трансформированных и контрольных корней

Таблица Б1 – Характеристика трансформированных и контрольных корней: длина корня, количество клубеньков и эффективность редактирования CRISPR/Cas9. Примечание: Обозначение 1.2.1Т указывает на горшок №1, растение №2, корень №1; буква «Т» обозначает трансгенный корень, а «С» – контрольный (нетрансгенный) корень. Параметры Model Fit (Степень соответствия модели), Knockout-Score (Показатель нокаута), % Indels (% индел) были рассчитаны автоматически, в программе EditCo ICE: Model Fit (Степень соответствия модели, R²) – коэффициент корреляции Пирсона, показывающий, насколько хорошо модель ICE соответствует данным секвенирования (более высокие значения указывают на большую достоверность результатов); Knockout Score (Показатель нокаута) – процент последовательностей, предсказанных к приводящим к функциональному нокауту гена (сдвиг рамки считывания или индел ≥ 21 п. н.); % Indel (% инделов) – доля последовательностей, содержащих вставки или делеции, рассчитанная путем сравнения отредактированных и контрольных кривых

Номер горшка, кол-во растений	Номер корня	Длина корня, см	Кол-во клубеньков, шт.	Среднее число клубеньков на корень, шт/см	Model Fit	Knockout-Score	% Indels
№1, 3 растения	1.1.	-	-	Нет трансгенных корней	-	-	-
	1.2.1Т	7,2	0	0	0,84	65	69
	1.2.2Т	5,1	0	0	0,68	88	94
	1.2.3Т	5	0	0	0,64	93	96
	1.2.4С	7,1	10	1,4	-	-	-
	1.2.5Т	4,6	0	0	0,8	99	100
	1.2.6С	5,2	8	1,5	-	-	-
	1.2.7С	6,2	6	1	-	-	-
	1.2.8С	5,5	5	0,9	-	-	-
	1.2.9С	7,3	9	1,2	-	-	-
	1.2.10С	6,9	10	1,4	0,98	-	0
	1.3.1Т	5,2	0	0	0,98	100	100
	1.3.2С	7,9	5	0,6	-	-	-
	1.3.3С	7,5	5	0,7	-	-	-
	1.3.4С	6,9	12	1,7	-	-	-
	1.3.5С	8,9	9	1	-	-	-
№2, 3 растения	2.1.	-	-	Нет трансгенных корней	-	-	-
	2.2.1Т	5,5	0	0	0,81	25	32
	2.2.2С	7,5	12	1,6	0,99	-	0
	2.2.3С	10,1	8	0,8	-	-	-
	2.2.4С	11,8	14	1,2	-	-	-

Продолжение Таблицы Б1

	2.2.5C	5	4	0,8	-	-	-
	2.2.6C	13,1	16	1,2	-	-	-
	2.2.7C	7,4	8	1,1	-	-	-
	2.2.8C	9,8	10	1	-	-	-
	2.2.9C	12,7	39	3,1	-	-	-
	2.3.1T	4,4	0	0	0,94	23	24
	2.3.2T	7,1	0	0	0,9	59	96
	2.3.3C	6,3	0	0	0,99	-	0
	2.3.4C	10,3	0	0	-	-	-
	2.3.5C	5,7	0	0	-	-	-
	2.3.6C	5,1	0	0	-	-	-
№3, 3 растения	3.1.1T	7,1	0	0	0,94	26	26
	3.1.2C	7	9	1,3	0,99	-	0
	3.1.3C	11,7	7	0,6	-	-	-
	3.1.4C	14,3	13	0,9	-	-	-
	3.1.5C	13	22	1,7	-	-	-
	3.1.6C	8,8	3	0,3	-	-	-
	3.1.7C	9,1	9	1	-	-	-
	3.2.	-	-	Нет трансгенных корней	-	-	-
	3.3.	-	-	Нет трансгенных корней	-	-	-
№4, 3 растения	4.1.1T	5	0	0	0,63	84	100
	4.1.2T	5,1	0	0	-	-	-
	4.1.3C	7,2	3	0,4	-	-	-
	4.1.4C	5,9	20	3,4	-	-	-
	4.1.5C	10	11	1,1	-	-	-
	4.2.	-	-	Нет трансгенных корней	-	-	-
	4.3.	-	-	Нет трансгенных корней	-	-	-
№5, 3 растения	5.1.1T	4,5	0	0	0,97	82	82
	5.1.2C	5,9	8	1,4	-	-	-
	5.1.3C	13,3	12	0,9	-	-	-
	5.1.4C	14,7	24	1,6	-	-	-
	5.1.7C	7,1	1	0,1	-	-	-
	5.1.8C	11	15	1,4	-	-	-
	5.2.	-	-	Нет трансгенных корней	-	-	-
	5.3.1T	6,5	0	0	0,84	68	70
	5.3.2C	6,3	8	1,3	0,99	-	0
	5.3.3C	10,2	15	1,5	-	-	-
	5.3.4C	13,1	4	0,3	-	-	-
	5.3.5C	6,5	9	1,4	-	-	-
	5.3.6C	14,8	16	1,1	-	-	-
	5.3.7C	4,9	8	1,6	-	-	-
	5.3.8C	5,1	7	1,4	-	-	-

ПРИЛОЖЕНИЕ В.

Анализ эффективности редактирования CRISPR/Cas9



Рисунок В1 – Анализ эффективности редактирования CRISPR/Cas9 с использованием программного обеспечения EditCo ICE: А – образец 5.1.1Т, показывающий 82 % редактирования с обнаруженным вариантом делеции. Б – контрольный нетрансформированный корень с 0 % редактирования, представляющий последовательность дикого типа. Вклады указывают на предполагаемые отредактированные последовательности и их относительное соотношение. Сайты расщепления Cas9 представлены вертикальными пунктирными линиями, а последовательность дикого типа отмечена символом «+».

ПРИЛОЖЕНИЕ Г.

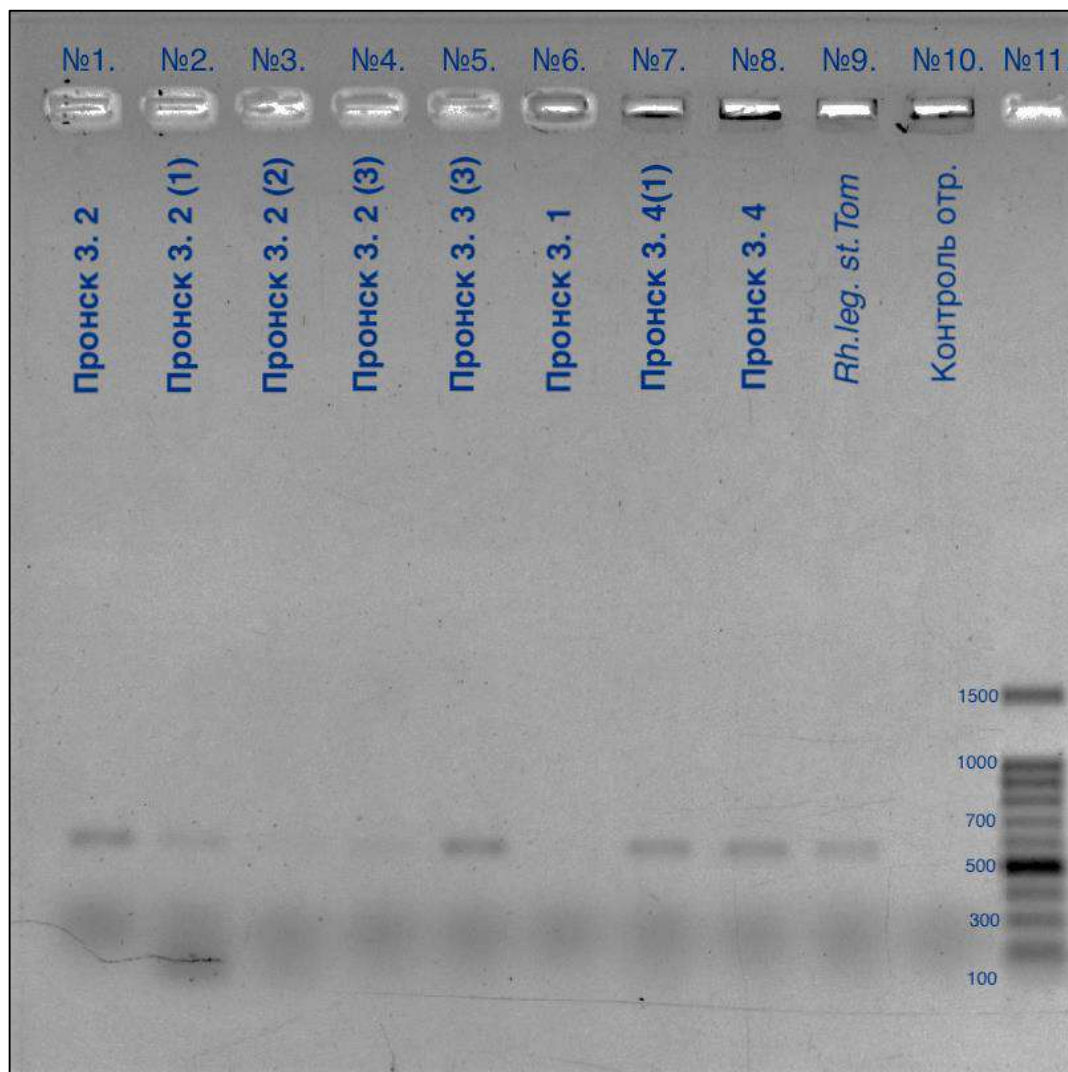
ПЦР-анализ идентификации гена *nodX* у выделенных штаммов клубеньковых бактерий

Рисунок Г1 – Электрофореграмма, демонстрирующая результат ПЦР с праймерами к гену *nodX* (таблица 2.4), проведенной на ДНК новых выделенных штаммов клубеньковых бактерий: №1 – ПЦР-продукт с ДНК штамма Пронск 3.2, участвующего в экспериментах по инокуляции линии NGB2150 для оценки параметров, описанных в пункте 3.4.2; №2 ПЦР-продукт с ДНК штамма Пронск 3.2 (1); №3 ПЦР-продукт с ДНК штамма Пронск 3.2 (2); №4 ПЦР-продукт с ДНК штамма Пронск 3.2 (3); №5 ПЦР-продукт с ДНК штамма Пронск 3.3 (3); №6 ПЦР-продукт с ДНК штамма Пронск 3.1; №7 ПЦР-продукт с ДНК штамма Пронск 3.4 (1); №8 ПЦР-продукт с ДНК штамма Пронск 3.4; №9 ПЦР-продукт с ДНК штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ТОМ (положительный контроль); №10 ПЦР-продукт без ДНК (отрицательный контроль); №11 маркер длин 100+bp (Евроген, Москва). Параметры ПЦР описаны в пункте 2.2.2; размер целевого фрагмента, включающего фрагмент гена *nodX* – 555 п. н.