

На правах рукописи



Журавлев Игорь Юрьевич

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

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Федеральная территория «Сириус»

2026

Работа была выполнена в научном центре генетики и наук о жизни автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

Научный руководитель: **Жуков Владимир Александрович**
кандидат биологических наук,
в.н.с. Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной
микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ),
г. Санкт-Петербург,
с.н.с. Научно-технического университета
«Сириус», Краснодарский край, ФТ «Сириус»

Защита состоится 11 ноября 2026 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.7.12 в АНОО ВО «Университет «Сириус» по адресу 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д.1. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус» <https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchitakh>

Автореферат разослан «9» октября 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ряполова Анастасия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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). По данным FAOSTAT, Россия является мировым лидером среди производителей сухого гороха, продолжая наращивать экспорт, который в 2024 г. составил 2,29 тыс. т.

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 дружественная альтернатива вносимому минеральному азоту, способная уменьшать потребность в удобрениях. Однако практическая реализация потенциала БФА в агроценозах ограничена тем, что эффективность бобово-ризобиального симбиоза в поле определяется не только способностью формировать азотфиксирующие клубеньки на корнях растения, но и конкурентным взаимодействием между бактериями, заселяющими клубеньки. В естественных почвах растение почти всегда взаимодействует с несколькими совместимыми штаммами ризобий, и победа в конкурентной колонизации корня не гарантирует максимальной эффективности азотфиксации. 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. 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-ризобиального 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.

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. 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. Существенный прогресс внесло обнаружение гена *PsLykX* в геномной области *Sym2*, который демонстрирует закономерности полиморфизма аллелей, согласующиеся с различиями по специфичности выбора бактерии-симбионта. 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. 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. 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*). У гороха значительное внимание уделено генетическому локусу I группы сцепления, содержащему ген *Sym2*, который контролирует суженную специфичность симбиоза. 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. 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.

Современные геномные и функциональные исследования указывают на то, что геном-кандидатом *Sym2* является *PsLycX*, кодирующий LysM-рецепторную киназу, однако прямые доказательства его роли в контроле специфичности симбиоза требуют дополнительной экспериментальной верификации. Новые возможности для функционального анализа генов, вовлеченных в симбиотические взаимодействия, открыло внедрение технологии 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 *PsLycX*, практического применения геномного редактирования для управления специфичностью бобово-ризобияльного симбиоза, а также необходимости экспериментальной проверки в полевых условиях способности аллельных вариантов *PsLycX* 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 *PsLycX*, 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 *PsLycX* 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-ризобиального 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 отредактированных корней к образованию симбиотических клубеньков, что подтверждает ключевую роль *PsLykX* в реализации ранних этапов бобово-ризобиального 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. 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* ТОМ более 95% клубеньков линии A33.18 были заселены бактериями именно этого штамма, тогда как у европейского сорта Rondo этот показатель был менее 8%. 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, 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.

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.

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*.

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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение обосновывает актуальность темы, связанную с необходимостью повышения эффективности симбиотической азотфиксации гороха в условиях конкуренции с аборигенными штаммами клубеньковых бактерий. Сформулированы цель и задачи исследования, направленные на изучение гена *PsLykX* как фактора специфичности симбиоза, мишени для геномного

редактирования и молекулярного маркера. Изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены методология, положения, выносимые на защиту, и сведения об апробации результатов.

В первой главе приведен обзор литературы, в котором рассмотрены: горох как модельный объект генетики; современные подходы к редактированию генома с использованием CRISPR/Cas9 и способы доставки компонентов системы в растительные клетки. Описаны основные этапы формирования бобово-ризобияльного симбиоза, механизмы специфичности взаимодействия гороха с клубеньковыми бактериями, включая систему *PsSym2–nodX*, а также структура и предполагаемые функции гена *PsLykX*, кодирующего LysM-рецептороподобную киназу.

Во второй главе охарактеризован растительный и бактериальный материал, условия культивирования, использованные приборы и оборудование. Подробно изложены методы генетической инженерии, включая конструирование CRISPR/Cas9-вектора и получение композитных растений в системе «бородачатых корней»; молекулярно-генетические подходы (выделение ДНК, ПЦР, CAPS-генотипирование, секвенирование); протокол выделения аборигенных штаммов ризобий из почв с использованием линии-ловушки; а также методы статистической обработки результатов.

В третьей главе представлены экспериментальные результаты и их обсуждение.

В пункте 3.1 проведен функциональный анализ гена *PsLykX* методом CRISPR/Cas9. Для направленного редактирования были выбраны две мишени T1 и T2 в первом экзоне гена. Конструкцией CRISPR/Cas9 (pKSE401-GFP-PsLykX-T1-T2) переносили в *Agrobacterium rhizogenes* штамма ARqua1 и использовали для трансформации проростков гороха сорта Caméor (европейский симбиотический фенотип). Растения инокулировали штаммом *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026. Через 21 сутки после трансформации GFP-положительные корни длиной более 4,5 см отбирали для дальнейшего анализа; нетрансформированные корни тех же растений использовали как внутренний контроль (рисунок 1). Анализ

трансформированных GFP-положительных корней показал отсутствие сформированных симбиотических клубеньков, в отличие от контрольных. Редактирование *PsLykX* подтверждали секвенированием целевой последовательности трансгенных корней. Полученные данные свидетельствуют о наличии мутаций в области мишеней CRISPR/Cas9. В экспериментальной группе было исследовано 13 трансгенных корней, тогда как контрольную группу составили 43 нетрансформированных корня; на всех трансгенных корнях количество клубеньков было равно нулю (рисунок 2). Различия между группами были статистически значимыми по U-критерию Манна–Уитни ($W = 26$; $p < 0,001$), размер эффекта составил $r = 0,67$. При этом на нетрансформированных корнях тех же растений клубенькообразование сохранялось. Таким образом, впервые посредством направленного нокаута получено прямое функциональное подтверждение необходимости *PsLykX* для формирования симбиотических клубеньков у гороха.

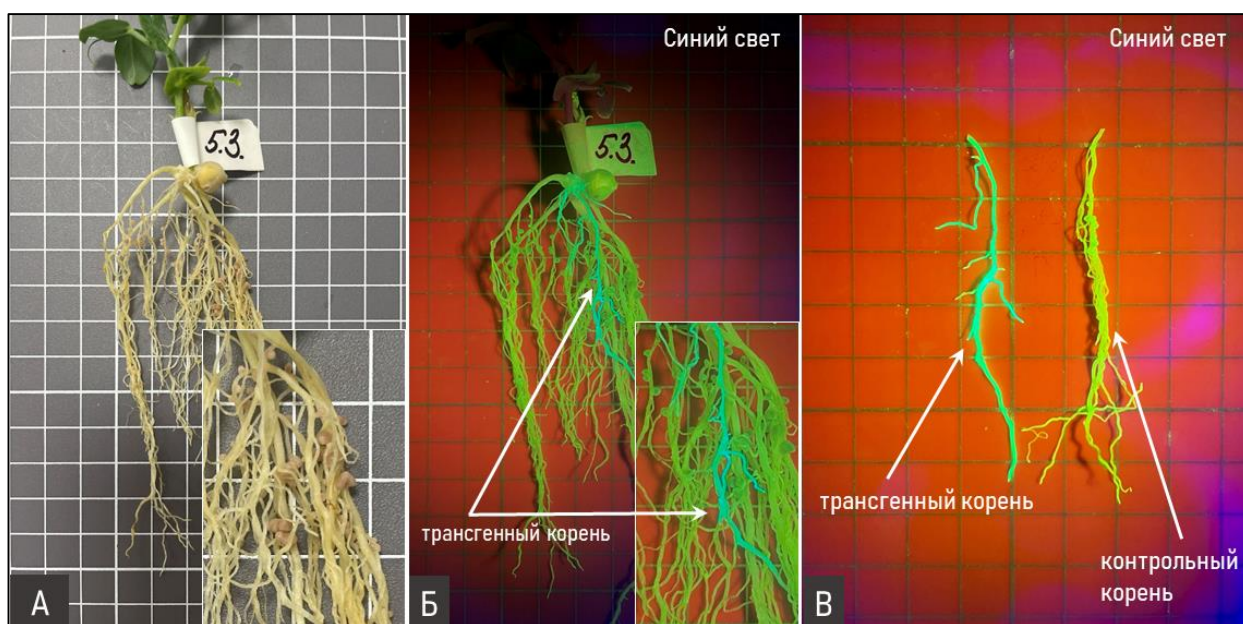


Рисунок 1 – Визуализация корней гороха после трансформации с помощью *Agrobacterium rhizogenes* (поколение T0): А – растение после 21 дня роста в песке, инокулированном *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026; Б – корневая система при синем освещении, снятая через желтый фотофильтр: наблюдаемая флуоресценция GFP в трансгенном корне; В – трансгенный корень в сравнении с нетрансгенным контрольным корнем при синем освещении

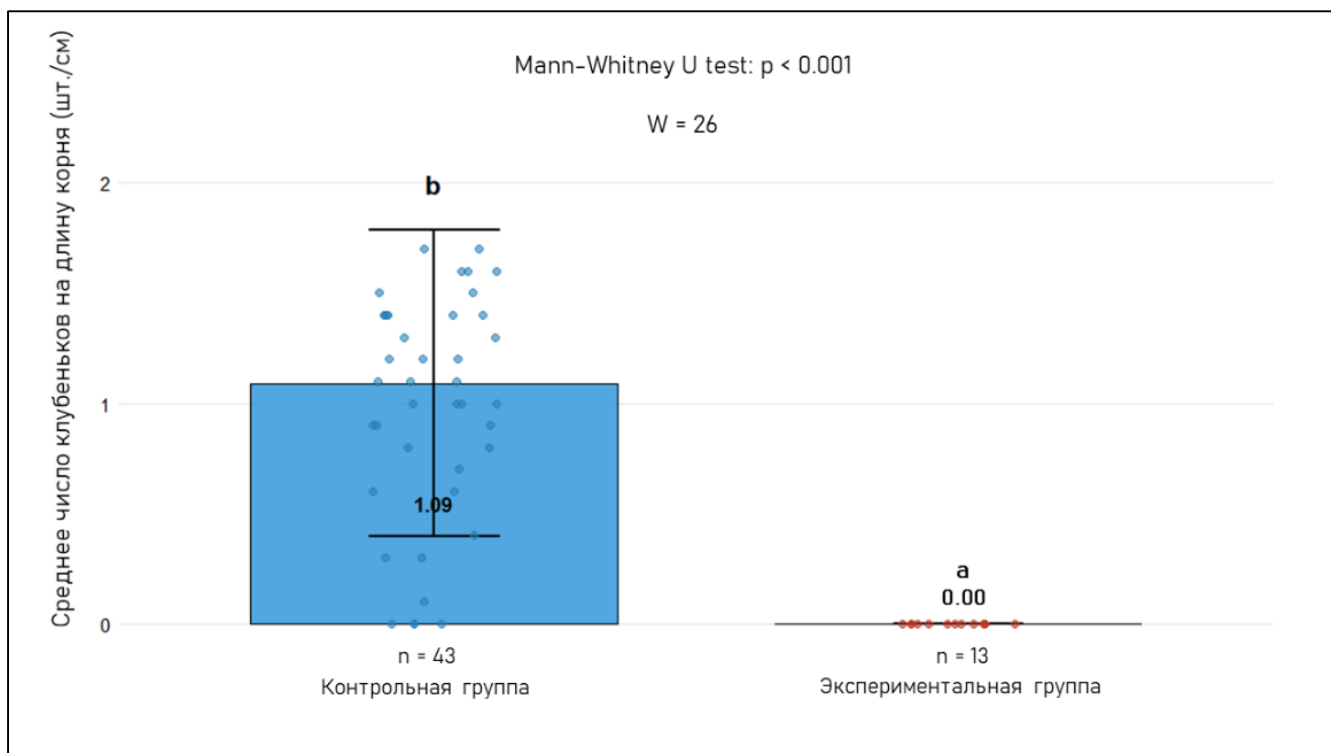


Рисунок 2 – Сравнение среднего количества клубеньков в контрольной (не трансгенной, отрицательный контроль, $n_1 = 43$) и трансгенной (GFP-положительной, экспериментальной, $n_2 = 13$) группах образцов корней. Столбцы представляют собой среднее значение стандартное отклонение, с указанием отдельных точек 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–U-критерий Манна – Уитни: $W = 26$, $p < 0,001$)

Пункт 3.2 описывает разработку CAPS-маркера для идентификации высокоспецифичной аллели *PsLykX^A*. В основе маркера использован однонуклеотидный полиморфизм *PsLykX* с.227C>A, формирующий сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции Hpy188III в афганской аллели и отсутствующий в европейской. Для анализа разработаны две пары праймеров A1B1 и A2B2, амплифицирующие фрагменты длиной соответственно 381 и 208 п. н. После рестрикции фрагмент A1B1, полученный на ДНК афганской аллели, расщеплялся на продукты 217 и 164 п. н., тогда как европейская аллель сохраняла исходный размер ампликона; у гетерозигот выявлялись оба типа фрагментов (рисунок 3).

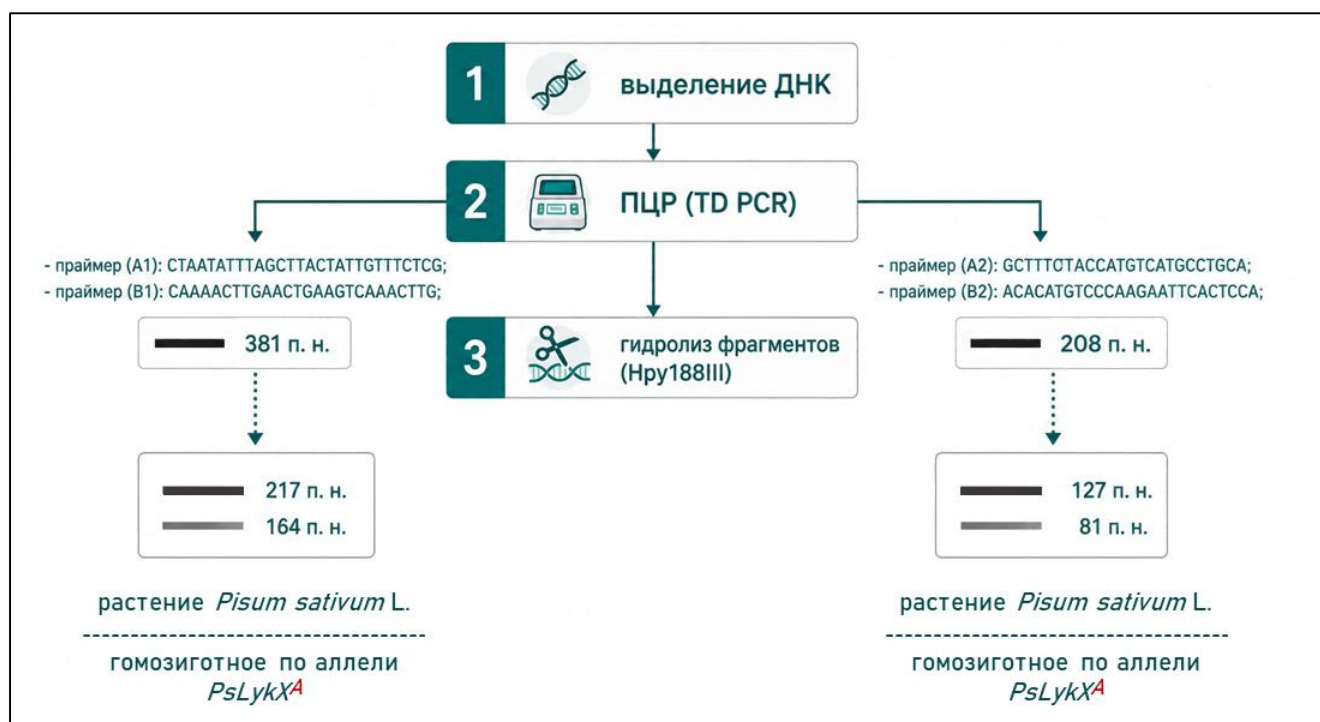


Рисунок 3 – Принцип работы CAPS-маркера для идентификации высокоспецифичной аллели *PsLykX^A* гороха

Эффективность CAPS-маркера проверена на контрастных генотипах и гибридной популяции F_2 от скрещивания европейской и афганской линий Frisson $\times$ NGB2150. Маркер позволил однозначно различить растения, гомозиготные по *PsLykX^A*, гомозиготные по европейской аллели *PsLykX^E* и гетерозиготы (рисунок 4). Распределение генотипов в F_2 соответствовало ожидаемому менделевскому соотношению 1:2:1. Разработанный маркер позволяет проводить ранний отбор растений по аллельному состоянию *PsLykX* без проведения длительных инокуляционных тестов и фенотипической оценки клубенькообразования. Новизна разработки защищена патентом Российской Федерации № 2815453.

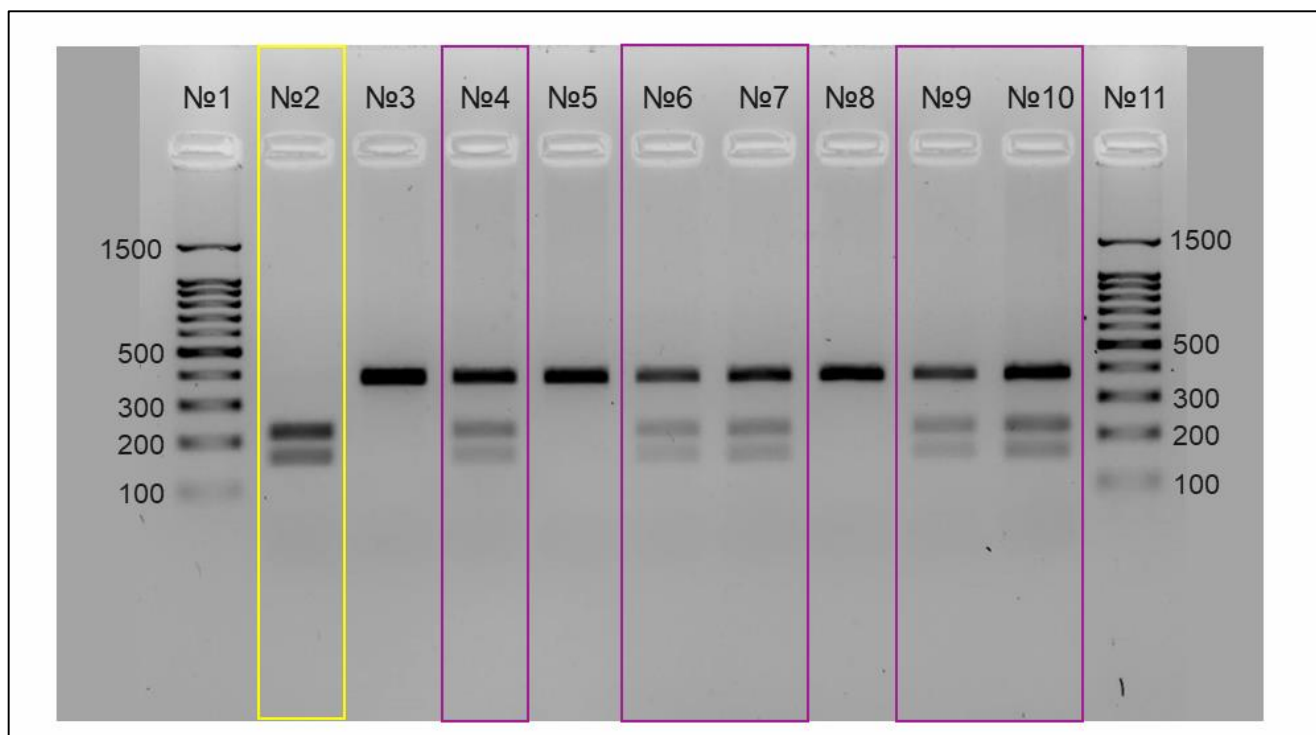


Рисунок 4 – Электрофореграмма, демонстрирующая результат тагдаун-ПЦР (праймеры A1B1) с последующим гидролизом эндонуклеазой рестрикции Hpy188III проведенной на ДНК гибридов Frisson × NGB2150: №1 и №11 маркер длин 100+bp (Евроген, Москва); №2 гидролиз ПЦР-продукта растения, гомозиготного по аллели *PsLykX^A* (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)

В пункте 3.3 исследована роль аллели *PsLykX^A* в избирательном взаимодействии гороха с клубеньковыми бактериями. В качестве модели использовали интрогрессионную линию A33.18, полученную путем обратного скрещивания с родительским европейским сортом Rondo и несущую участок генома афганского донора NGB2150. Полногеномный анализ показал, что около 3,1% генома A33.18 унаследовано от NGB2150, включая участок хромосомы 2 с геном *PsLykX* (рисунок 5A). Функциональная характеристика линии проведена в вегетационных опытах с использованием NodX[–] штамма RCAM1022 и NodX⁺ штаммов ТОМ и А1.

В условиях вегетационных опытов A33.18 не образовывала клубеньков при инокуляции NodX[–] штаммом RCAM1022, но формировала клубеньки при

взаимодействии с NodX⁺ штаммами, что соответствовало афганскому типу симбиотической специфичности.

Для проверки конкурентоспособности совместимого инокулянта в условиях естественной почвенной микробиоты проведен полевой эксперимент с инокуляцией штаммом ТОМ. Состав ризобий в отдельных клубеньках определяли по ПЦР-анализу гена *nodX* и разработанному молекулярному тесту, позволяющему отличать штамм ТОМ от других NodX⁺ ризобий (рисунок 5Б).

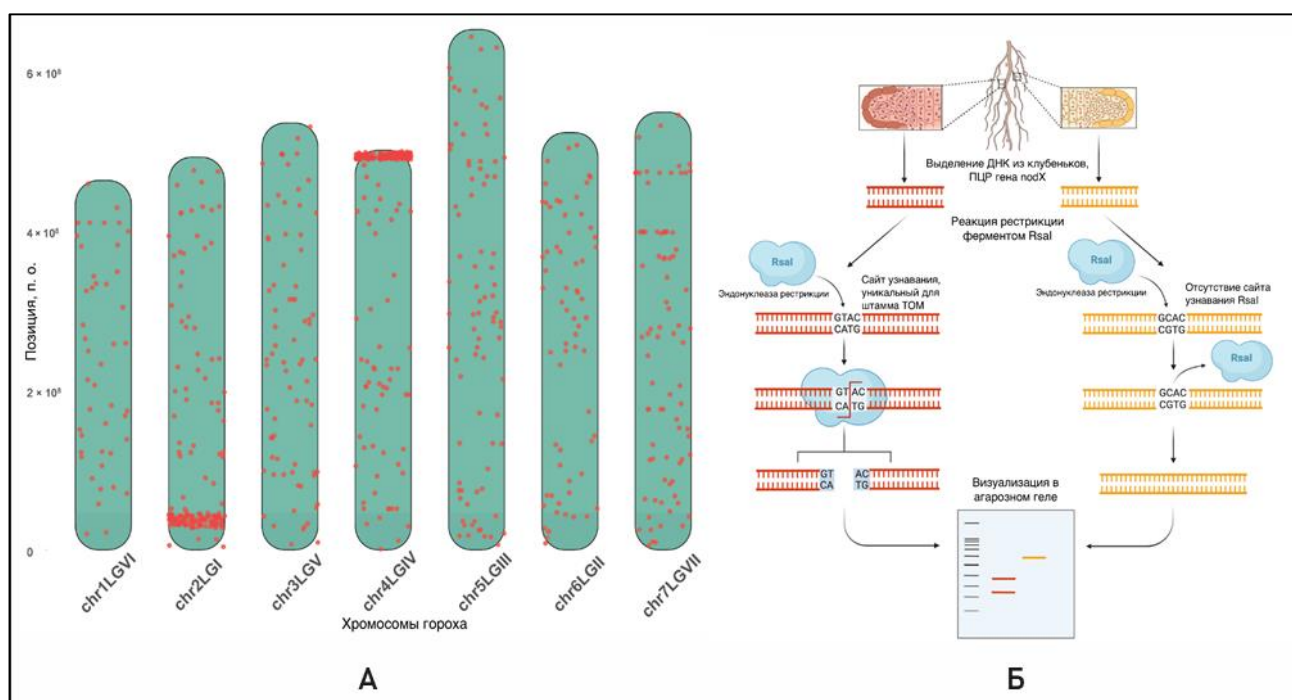


Рисунок 5 – **А:** Распределение однонуклеотидных замен и инделов, унаследованных линией A33.18 от сорта Afghanistan (NGB2150), по хромосомам гороха. Наиболее выраженный интрогрессированный участок локализован на хромосоме 2 / группе сцепления I и соответствует области локуса *Sym2*, включающей кандидатный ген *PsLykX*. **Б:** Схема ПЦР-рестрикционного анализа аллельного состояния гена *nodX*, использованного для идентификации штамма ТОМ в клубеньках гороха. Наличие сайта рестрикции RsaI позволяет отличать вариант *nodX* штамма ТОМ от других близких NodX⁺ вариантов

У сорта Rondo в контрольном варианте 97% клубеньков были сформированы NodX[–] штаммами и только 3% NodX⁺ (рисунок 6). После инокуляции штаммом ТОМ 92% клубеньков Rondo по-прежнему содержали NodX[–] ризобии; штамм ТОМ был выявлен только в 4% клубеньков, еще в 3% обнаруживалась смесь ТОМ с другими NodX⁺ ризобиями. В отличие от этого, у A33.18 после инокуляции ТОМ

64% клубеньков содержали непосредственно штамм ТОМ, 32% – смесь ТОМ и других NodX+ штаммов, и только 4% были заняты другими NodX+ ризобиями. Таким образом, более 95% клубеньков A33.18 содержали ТОМ или его смесь с другими NodX+ штаммами, тогда как у Rondo доля клубеньков с участием ТОМ не превышала 8% (рисунок 6Б).

Одновременно проведена оценка сухой массы растений (рисунок 6В, 6Г). В контрольных условиях статистически значимых различий между Rondo и A33.18 не выявлено. После инокуляции ТОМ сухая масса побегов и корней Rondo увеличивалась, тогда как у A33.18 наблюдалась тенденция к снижению. Между генотипами после инокуляции выявлены статистически значимые различия по сухой массе побегов ($p < 0,001$) и корней ($p < 0,01$). Полученные результаты показали, что наличие *PsLykX^A* обеспечивает не только изменение спектра совместимых ризобий, но и существенное изменение конкурентного заселения клубеньков в пользу совместимого NodX+ штамма. Вместе с тем высокая специфичность сама по себе не гарантирует повышения продуктивности растения, что указывает на необходимость согласованного подбора растительного генотипа и эффективного бактериального штамма.

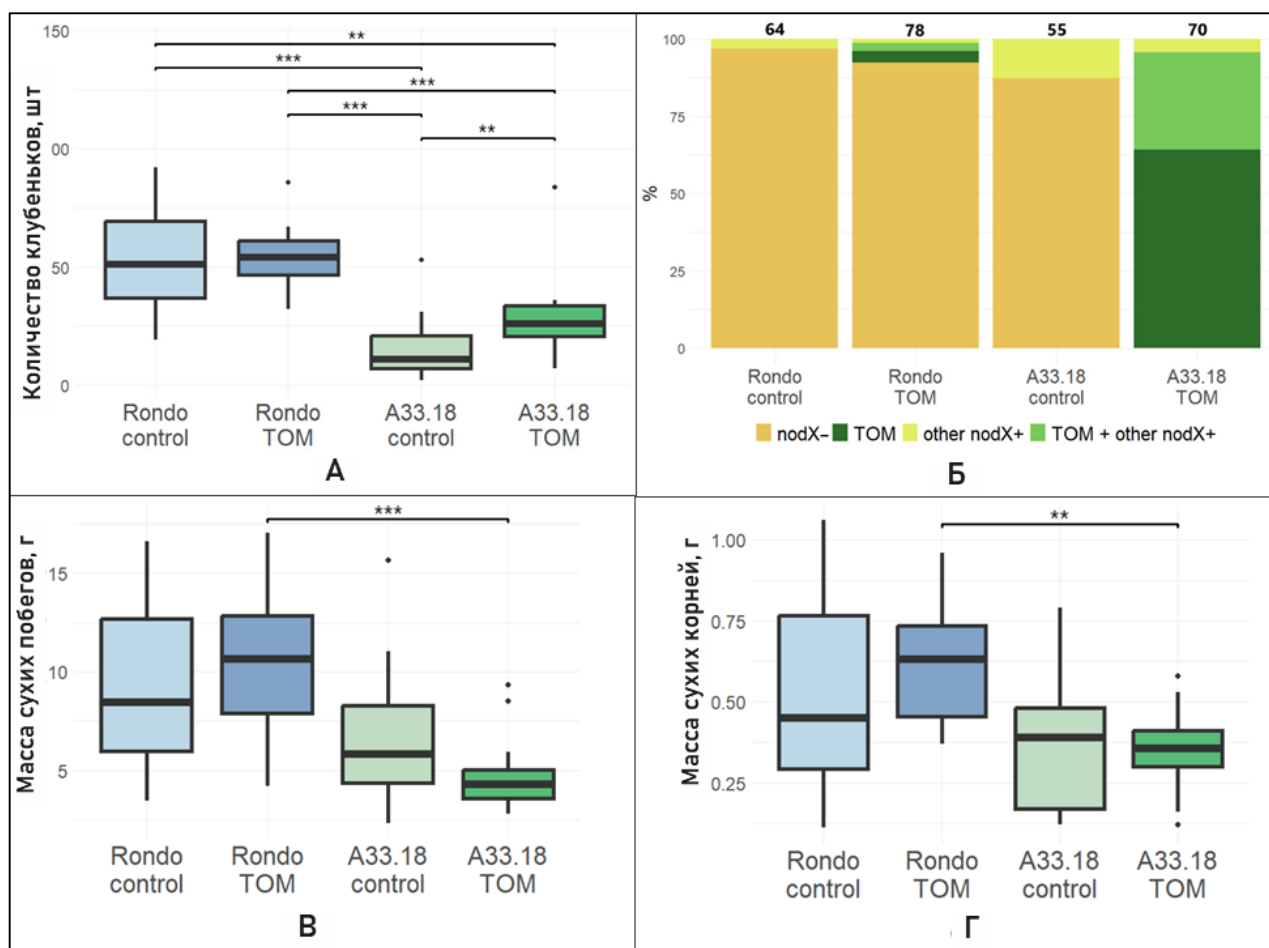


Рисунок 6 – Клубенькообразование, состав ризобий в клубеньках и показатели роста линии A33.18 и сорта Rondo в полевом опыте при инокуляции штаммом TOM. А – число клубеньков ($n \geq 11$); Б – распределение клубеньков по присутствию NodX- штаммов, штамма TOM и других NodX+ ризобий; В, Г – сухая масса побегов и корней растений ($n \geq 11$). ** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001

В пункте 3.4 разработанный подход применен для поиска аборигенных клубеньковых бактерий, совместимых с горохом афганского симбиотического типа. Линию NGB2150 использовали в качестве растения-ловушки при анализе образцов почв из Рязанской обл. (п.г.т. Пронск), Пушкинского р-на г. Санкт-Петербурга (с опытного поля ФГБНУ ВНИИСХМ) и Краснодарского края (п.г.т. Красная Поляна). Из образцов почвы готовились вытяжки, используемые для инокуляции линии NGB2150. После формирования клубеньков проводили их морфологическую оценку и выделение бактериальных изолятов из клубеньков. Были получены клубеньки различной окраски: желтые, красные, розовые, коричневые и белые.

Симбиотическую эффективность выделенных изолятов оценивали в стерильных условиях после инокуляции растений NGB2150 по параметрам: числа клубеньков, сухой массы корневой системы и сухой массы надземной части. Наибольшее число клубеньков формировали отдельные изоляты из желтых клубеньков образца «Пронск 1» и коричневых клубеньков почвы ВНИИСХМ. Однако максимальная интенсивность клубенькообразования не всегда соответствовала высокой эффективности симбиоза. Наиболее интенсивное развитие корневой системы обеспечивали штаммы из розовых клубеньков образцов «Красная Поляна (поле)» и «Пронск 3». Максимальная сухая масса побегов отмечена при инокуляции штаммом «Пронск 3.2», выделенным из розового клубенька образца «Пронск 3»; показатель практически соответствовал растениям контрольного варианта с доступным минеральным азотом (рисунок 7). Для наиболее перспективного штамма и других изолятов из образца «Пронск 3» дополнительно проведена ПЦР-идентификация гена *nodX*.

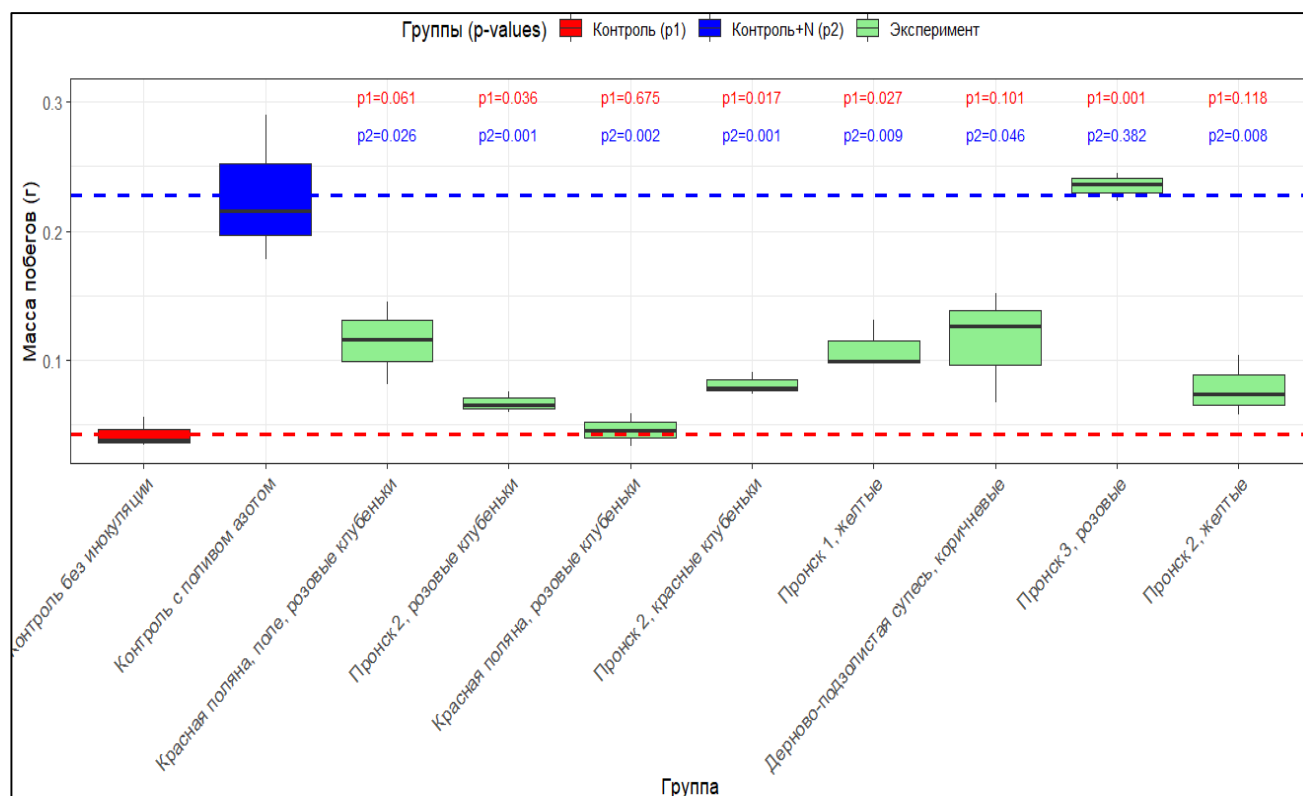


Рисунок 7 – Сухая масса надземной части растений линии NGB2150 после инокуляции выделенными штаммами клубеньковых бактерий

В пункте 3.5 проведено обобщение полученных результатов. Показано, что *PsLykX* может рассматриваться как функциональный компонент рецепторной системы, участвующей в формировании симбиоза, а аллель *PsLykX^A* – как генетический фактор, позволяющий ограничивать взаимодействие гороха с несовместимыми ризобиями и изменять конкурентное заселение клубеньков. Совокупность результатов демонстрирует возможность целенаправленного управления составом симбиотической микробиоты посредством сочетания растительного генотипа с заданной специфичностью и совместимого эффективного бактериального штамма.

В заключении обобщены результаты исследования, показана принципиальная возможность управления специфичностью бобово-ризобияльного симбиоза при использовании аллельного состояния гена *PsLykX^A* и при условии подбора соответствующих NodX⁺ штаммов. Обоснована практическая значимость разработанного CAPS-маркера для селекции и выделенных аборигенных изолятов для создания биопрепаратов нового поколения. Отмечены перспективы дальнейших исследований, включая точное редактирование, направленное на внесение отдельных аминокислотных замен в последовательность белка, кодируемого геном *PsLykX*.

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-ризобияльного 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ 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.
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.
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 PsLycX gene of pea (*Pisum sativum* L.) leads to loss of symbiotic nodules. *Transgenic Research*, 35(1), 14.
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.