

РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СТРУКТУР ПРИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОМ СИМБИОЗЕ С УЧАСТИЕМ LYSM-РЕЦЕПТОРА K1

А.Н. Кириенко, Е.А. Долгих

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия, *kirienkoann@yandex.ru*, *dolzhelen@yahoo.com*

Аннотация. У гороха LysM-содержащая рецептор подобная киназа K1 контролирует выход бактерий из инфекционных нитей при симбиозе с ризобиями. K1 управляет этим процессом через регуляторы везикулярного транспорта семейства VAMP721. Кроме того, K1 может регулировать развитие защитных реакций при эндоцитозе бактерий. Нарушение функции K1 снижает устойчивость растений к патогенам. K1 может играть ключевую роль в формировании симбиотических структур при симбиозе и регулировать восприимчивость к заражению.

Ключевые слова: бобово-ризобийный симбиоз, LysM-содержащие рецепторы, инфекционный процесс, устойчивость к заражению

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-406-409

Высшие растения находятся под влиянием различных абиотических и биотических факторов. Существенную роль в регуляции развития растений при постоянно меняющихся условиях внешней среды играет способность воспринимать поступающие извне сигналы. Одной из наиболее важных является способность растений различать сигналы, поступающие от потенциально полезных и вредных микроорганизмов. Бобовые растения способны вступать во взаимодействие как с полезными микроорганизмами – ризобийными бактериями и грибами арбускулярной микоризы, а также эффективно различать патогенные микроорганизмы. При этом начальные этапы взаимодействия бобовых растений с симбиотическими и патогенными микроорганизмами имеют много общего. Так, и при патогенезе, и при развитии симбиоза происходит активация защитных систем растений. Однако при симбиозе эта активация носит кратковременный характер, что позволяет бактериям проникать в клетки растений. Существенную роль в развитии взаимодействий с растениями играют сигнальные молекулы микроорганизмов, которые содержат в своем составе N-ацетилглюкозамин. В частности, муреин, хитин и их низкомолекулярные производные обладают иммуногенной активностью, а липохитоолигосахариды Nod-факторы и Muc-факторы (от англ. *nodulation* – клубенькообразование; *mycorrhization* - микоризация) индуцируют развитие симбиозов. У растений в узнавание таких, схожих по структуре молекул, вовлечены белки - рецептор-подобные киназы, содержащие LysM домен во внеклеточном участке (LysM-ППК).

У объекта наших исследований – гороха посевного (*Pisum sativum* L.), несколько LysM-ППК *PsSym10*, *PsSym37*, *PsK1* контролируют процесс узнавания растением сигнальных молекул Nod-факторов [Madsen et al., 2003; Zhukov et al., 2008; Kirienko et al., 2018]. На начальных этапах развития симбиоза может активироваться комплекс, представленный двумя LysM-ППК - SYM10 и K1, тогда как развитие инфекционных нитей контролирует другой рецепторный комплекс, представленный LysM-ППК SYM10 и SYM37. Вместе с тем, анализ мутантов по гену *k1* показал, что этот рецептор может работать не только на начальных этапах развития симбиоза, но и контролирует выход бактерий из инфекционных нитей. Анализ линии *k1-2* показал, что у данного мутанта формируются sac-подобные (от англ. sac – сумка) инфекционные нити, из которых не происходит выход бактерий [Kirienko et al., 2018]. Однако, как именно K1

контролирует выход бактерий из инфекционных нитей оставалось неясным.

Для модельного бобового *M. truncatula* была показана важная роль регуляторов везикулярного транспорта из семейства VAMP721 белков, а также компонентов сигнального пути, активируемого Nod-факторами (рецепторной киназы SymRK, кальций, кальмодулин-зависимой киназы и транскрипционных факторов ERN1) в контроле выхода бактерий и формировании симбиосом [Caroen et al., 2005; Limpens et al., 2005; Yano et al., 2008]. В связи с этим в нашей работе был проведен анализ экспрессии генов, кодирующих *VAMP721* и *ERN1* у мутанта по гену *kl*. Уровень экспрессии ERN1 оставался одинаковым как у растений дикого типа, так и у мутантной линии по гену *kl*. Однако, в отличие от растений дикого типа, у мутанта по гену *kl* не увеличивалась в ответ на инокуляцию экспрессия гена *VAMP721e*, кодирующего мембранный белок, ассоциированный с мембранами везикул. Полученные результаты свидетельствуют об участии рецептора K1 в активации пути, регулирующего формирование симбиотических структур при выходе бактерий из инфекционных нитей.

Действительно, у мутантов *M. truncatula* и гороха по гену *IPD3* нарушается выход бактерий из инфекционных нитей – бактерии остаются «запертыми» внутри инфекционных нитей, окруженных толстой растительной клеточной стенкой [Voroshilova et al., 2001, 2009; Ovchinnikova et al., 2011]. У данных мутантов наблюдалось увеличение уровня экспрессии генов, участвующих в развитии защитных реакций (кодирующих пероксидазу, маркер гиперчувствительной реакции и белок PR10 [Ivanova et al., 2015]. В связи с этим было выдвинуто предположение, что некоторые мутации ведут к тому, что растение распознает ризобию не как партнера-симбионта, а как патоген, вследствие чего у растений включаются защитные механизмы, препятствующие проникновению ризобий внутрь. Схожий фенотип мутантной линии *kl-2*, характеризующейся развитием гипертрофированных сас-подобных нитей, откуда не происходит выход бактерий, позволяет предположить, что у данного мутанта также происходит развитие защитных реакций при попытке проникновения ризобий. Для изучения влияния рецептор-подобной киназы K1 на развитие защитных реакций при формировании симбиоза мы провели анализ уровня экспрессии генов – *PR1* и *PR10* (от англ. *pathogenesis-related* – связанные с патогенезом) у растений линии *kl-2*. Анализ показал небольшое увеличение уровня экспрессии генов *PR1* и *PR10* в корнях растений дикого типа в ответ на инокуляцию на 1 и 2 сутки. Однако при этом у растений мутантной линии *kl-2* наблюдали существенное увеличение уровня экспрессии этих генов. Это позволяет сделать вывод о том, что из-за мутации в гене *kl* данные растения воспринимают ризобию как патоген, а значит K1 может регулировать активацию защитных реакций при формировании симбиоза.

Кроме того, гистологический анализ мутантных линий со схожим фенотипом у люцерны и гороха мутантов позволил выявить откладывание каллозы и суберина в инфекционных нитях, накопление неэстерифицированного пектина в клеточных стенках инфекционных нитях [Ivanova et al., 2015], что также свидетельствует об активации защитных реакций. В дальнейшем планируется проведение гистологического анализа корней мутантной линии *kl-2* для оценки возможности накопления данных веществ.

Недавно у *M. truncatula* были выявлены два гена, необходимых для подавления защитных реакций в ходе развития инфекционных нитей, выходе бактерий из них и формирования симбиосом – *DNF2* (от англ. *Does Not fix nitrogen* – не фиксирующий азот) и *SymCRK* (от англ. *symbiotic cysteine-rich receptor-like kinase* – симбиотическая цистеин-богатая рецептор-подобная киназа). Эти гены кодируют фосфатидилинозитол специфичную фосфолипазу C и цистеин-богатую рецептор-подобную киназу

соответственно [Bourcy et al., 2013; Berrabah et al., 2014]. Для изучения влияния рецептор-подобной киназы K1 на развитие защитных реакций при формировании симбиоза мы также провели анализ уровня экспрессии генов – *DNF2* и *SymCRK* у растений дикого типа и мутантной линии *κ1-2*. Анализ выявил значительное увеличение экспрессии *DNF2* и *SymCRK* в клубеньках растений дикого типа. Напротив, в корнях растений мутантной линии *κ1-2* изменений в экспрессии *DNF2* и *SymCRK* не наблюдали. Полученные данные по изучению экспрессии двух этих генов у мутантной линии *κ1-2* позволяют предположить, что LysM-ППК K1 в процессе развития симбиоза может активировать сигнальный путь, который подавляет развитие защитных реакций со стороны растений. У мутанта такого блокирования не происходит, вследствие чего растение воспринимает ризобии как патоген, что препятствует их проникновению.

Таким образом, были получены доказательства того, что LysM-ППК K1 гороха контролирует выход бактерий из инфекционных нитей посредством регуляции экспрессии основных компонентов везикулярного транспорта. Кроме того, K1 участвует в регуляции развития защитных реакций при формировании симбиоза.

Для некоторых рецепторов модельных бобовых растений была показана их необходимость и для контроля устойчивости растений к заражению фитопатогенными микроорганизмами [Rey et al., 2013]. Для изучения роли K1 при патогенезе было проведено заражение растений гороха мутантной линии *κ1-2* фитопатогенным грибом *Fusarium culmorum*. Через 16 дней после заражения у мутантной линии были выявлены более выраженные признаки заражения, происходило угнетение развития растений (более короткие корни и менее развитая надземная часть) по сравнению с диким типом. Таким образом, можно сделать вывод о том, что K1 может участвовать в контроле развития защитных реакций со стороны растений и регулировать процесс проникновения микроорганизмов.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что LysM-ППК K1 может участвовать в контроле развития инфекционного процесса при формировании симбиоза, а также регулирует устойчивость растений к заражению фитопатогенами.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-16-10043.

Литература

Berrabah F., Bourcy M., Eschstruth A. et al. A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis // *New Phytologist*. – 2014. – V. 203. – P. 1305–1314.

Bourcy M., Brocard L., Pislariu C.I. et al. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions // *New Phytologist*. – 2013 – V. 197. – P. 1250–1261.

Capoen W., Den Herder J., Rombauts S. et al. Comparative transcriptome analysis reveals common and specific tags for root hair and crack-entry invasion in *Sesbania rostrata* // *Plant Physiology*. – 2007. – V. 144, № 4. – P. 1878–1889.

Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J. et al. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations *sym40* (*PsEFD*), *sym33* (*PsIPD3/PsCYCLOPS*) and *sym42* // *Protoplasma*. – 2015. – V. 252. – P. 1505–1517.

Kirienko A., Porozov Y., Malkov N., Akhtemova A., Le Signor C., Thompson R., Saffray C., Dalmais M., Bendahmane A., Tikhonovich I., Dolgikh E. Role of a receptor-like kinase K1 in pea *Rhizobium* symbiosis development // *Planta*. – 2018. – в печати.

Limpens E., Mirabella R., Fedorova E. et al. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2* // *PNAS*. – 2005. – V. 102, № 29. P. 10375–10380.

Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S. et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals // *Nature*. – 2003. – V. 425, № 6958 – P. 637–640.

Miyata K., Kozaki T., Kouzai Y. et al. The bifunctional plant receptor, *OsCERK1*, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice // *Plant Cell Physiol.* – 2014. – V.55, № 11. – P. 1864–1872.

Rasmussen S.W., Füchtbauer M. et al. Intraradical colonization by arbuscular mycorrhizal fungi triggers induction of a lipochitooligosaccharide receptor // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – Article number: 29733.

Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y. et al. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Molecular and General Genetics*. – 1998. – V. 256. – P. 491–503.

Voroshilova V.A., Boesten B., Tsyganov V.E. et al. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes (*sym13*, *sym31*, *sym33*, *sym40*) blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Molecular Plant–Microbe Interactions*. – 2001. – V.14. – P. 471–476.

Voroshilova V.A., Demchenko K.N., Brewin N.J. et al. Initiation of legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads // *New Phytologist*. – 2009. – V. 181. – P. 913–923.

Yano K., Yoshida S., Müller J. et al. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation // *PNAS*. – 2008. – V. 105. – P. 20540–20545.

Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J. The Pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2008. – V. 21, № 12. – P. 1600–1608.

REGULATION OF THE INFECTIOUS PROCESS WHEN THE PLANT RECOGNIZES PEA SYMBIONTS AND PATHOGENS WITH THE PARTICIPATION OF THE LYSM RECEPTOR K1

A.N. Kirienko, E.A. Dolgikh

Federal State Budget Scientific Institution All-Russian Research Institute for
Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia, kirienkoann@yandex.ru,
dol2helen@yahoo.com

Abstract. In pea LysM receptor-like kinases K1 kinase controls the release of bacteria from infectious filaments in symbiosis with rhizobia. K1 controls this process through regulators of vesicular transport of the VAMP721 family. In addition, K1 can regulate the development of defense reactions in bacteria endocytosis. Disorder of K1 function reduces the resistance of plants to pathogens. K1 can play a key role in the formation of symbiotic structures in symbiosis and regulate sensitivity to infection.

Keywords: *legume-rhizobial symbiosis, LysM-containing receptors, infectious process, resistance to infection*