

Изучение влияния митоген активируемой протеинкиназы 6 (МАРК6) на эффективность развития симбиоза у гороха посевного для повышения его продуктивности

П.А. Кулеш^{1,2*}, Е.С. Канцурова², А.Д. Бовин², Н.В. Козлов², Е.А. Долгих²

¹ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

* polinapolliolog@gmail.com

Цель: Митоген-активируемые протеинкиназы (МАР-киназы) играют важную роль во многих сигнальных путях. Недавно было установлено, что МАР-киназы участвуют во внутриклеточной передаче сигнала при узнавании бобовыми растениями сигнальных молекул Nod-факторов, выделяемых клубеньковыми бактериями (ризобиями). Ранее было показано, что у лядвенца японского (*Lotus japonicus*) в передачу сигнала вовлечены МАРКК (LjSIP2) и ее субстрат LjМАРК6, а у люцерны усеченной (*Medicago truncatula*) – их гомологи MtМАРКК4 и MtМАРК6. Однако у гороха посевного (*Pisum sativum* L.), имеющего важное сельскохозяйственное значение, состав и функциональная роль МАР-киназ в контроле симбиоза оставались малоизученными. Основной целью нашей работы являлись поиск и изучение влияния PsМАРКК4 и PsМАРК6 на развитие симбиоза у гороха посевного (*P. sativum* L.), а также разработка методических подходов для стимуляции активности этого регулятора с помощью сверхэкспрессии кодирующего гена и получения мутаций, имитирующих фосфорилирование PsМАРК6 в активном центре.

Материалы и методы: Был проведен анализ генома *Pisum sativum* v1a гороха для поиска последовательностей генов *PsМАРКК4* и *PsМАРК6*, а также потенциальных сайтов-мишеней для геномного редактирования гена *PsМАРК6*. Получены композитные растения *P. sativum* L. сорта Cameor со сверхэкспрессией гена *PsМАРК6*, а также с модификацией его первичной последовательности с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9.

Результаты: В данной работе мы провели поиск в геноме гороха с использованием известных последовательностей *M. truncatula* MtМАРКК4 и MtМАРК6 для идентификации соответствующих гомологов. В результате сверхэкспрессии гена *PsМАРК6* у композитных растений наблюдалось увеличение количества клубеньков и биомассы растений, что свидетельствует о вовлеченности этой МАР-киназы в регуляцию симбиоза (Bovin et al., Genetically Modified Legume Plants as a Basis for Studying the Signal Regulation of Symbiosis with Nodule Bacteria, Horticulturae, 2024). Мы предположили, что замена треонина (Т) и тирозина (Y) в сайтах фосфорилирования PsМАРК6 на аспарагиновую кислоту (D) может «имитировать» отрицательный заряд фосфатной группы (фосфомимикрия), приводя к появлению конститутивно активного фермента. Был разработан дизайн направляющей РНК и создана генетическая конструкция для первичного редактирования целевого гена с помощью CRISPR/Cas9. Проведен анализ композитных растений на наличие ожидаемых нуклеотидных замен в гене *PsМАРК6*, а также оценена эффективность доставки инструментов редактирования в клетки растений гороха. Кроме того, исследовано влияние сверхэкспрессии гена *PsМАРК6* с модифицированными мотивами фосфорилирования на эффективность бобово-ризобиального симбиоза и продуктивность гороха.

Выводы: Полученные данные расширяют представления о роли МАР-киназ в регуляции бобово-ризобиального симбиоза и открывают перспективы для направленной регуляции симбиотической азотфиксации у сельскохозяйственных культур.

Финансирование: Исследование поддержано ОНТП задание FGEW-2024-0006.