

Поиск и изучение роли микроРНК в подавлении иммунного ответа у бобовых растений при развитии эффективного внутриклеточного симбиоза *Pisum sativum* L.

Н.В. Смирнова*, А.В. Долгих, Е.С. Канцурова, Е.А. Долгих

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

* nv.smirnova@arriam.ru

Цель: Способность к развитию внутриклеточных симбиозов у растений в значительной степени обусловлена способностью микросимбионтов подавлять защитные системы хозяина и преодолевать их устойчивость к развитию внутриклеточной инфекции. Однако механизмы регуляции иммунного ответа растений микросимбионтами остаются малоизученными. Исследование данной проблемы является актуальным и имеет непосредственное отношение к регуляции эффективности и специфичности внутриклеточных симбиозов (прежде всего, бобово-ризобияльного симбиоза). Известно, что в подавлении иммунного ответа со стороны растений могут участвовать эффекторы микроорганизмов, которые непосредственно доставляются в клетки хозяина и могут узнаваться NLR-рецепторами. Действие эффекторов преимущественно исследовано у патогенов, но остается малоисследованным у симбиотических микроорганизмов. Представляло интерес выяснить, могут ли ризобии выделять эффекторы, которые избегают активации NLR-рецепторов, или происходит снижение уровня этих рецепторов у хозяина. Поскольку накапливаются данные о том, что молекулы микроРНК могут контролировать содержание NLR-рецепторов, мы предположили, что ризобии могут влиять на изменение уровня микроРНК и тем самым контролировать содержание NLR-рецепторов и восприимчивость растений к ризобияльной инфекции. Однако, как осуществляется такая регуляция с помощью микроРНК, остается неизвестным. Анализ литературных данных показывает, что растительные микроРНК (miRNA) играют важную роль в реакциях на биотический и абиотический стресс. Они могут регулировать устойчивость растений к патогенам, но активируются и при симбиозах. Показано, что три типа растительных miRNA (miR2118, miR1507, miR2109) могут воздействовать на гены *NLR* у *Medicago truncatula* и регулировать восприимчивость к заражению. Однако какие типы микроРНК могут работать у других бобовых, в частности у гороха, остается малоисследованным.

Материалы и методы: С использованием биоинформатических подходов в геноме гороха нами был выявлен ген miR1507, которая потенциально может влиять на уровень экспрессии генов цитоплазматических NLR-рецепторов. Мы получили генетические конструкции для сверхэкспрессии этой микроРНК под конститутивным промотором с целью дальнейшей оценки ее влияния на модуляцию иммунного ответа и установление симбиоза у гороха. Также нами были получены генетические конструкции для сверхэкспрессии гена miR1507 гороха в ризобиях в векторе pHC60 под высокоэффективным *lac* промотором для оценки влияния экзогенной микроРНК на развитие симбиоза с горохом.

Результаты: Нами проведен эксперимент по инокуляции гороха посевного эффективными (RCAM 1026, 1064 3841) и неэффективными (Vst36-3, A56) штаммами *Rhizobium leguminosarum* на ранних стадиях – 24 ч после инокуляции для оценки динамики изменения экспрессии ряда генов *NLR*, а также в сформированных клубеньках. Установлено, что при эффективном симбиозе уровень экспрессии двух генов *NLR* (*RG43-1* и *RG43-2*) существенно снижается. Биоинформатический анализ показал, что два гена *RG43-1* и *RG43-2* являются потенциальными мишенями микроРНК1507. Для оценки влияния новой микроРНК на симбиоз нами проведена трансформация ризобий RCAM 1026 генетической конструкцией для повышенной экспрессии гена miR1507 гороха в ризобиях в векторе pHC60 под высокоэффективным *lac* промотором. Было показано, что инокуляция растений гороха таким штаммом приводила к существенному увеличению таких показателей, как количество клубеньков, масса растения и масса корня по сравнению с контрольными растениями, инокулированными штаммом RCAM 1026 mCherry без конструкции с miR1507. Это указывает на важную роль микроРНК1507 в регуляции эффективности симбиоза и открывает новые возможности для ее увеличения с помощью биотехнологических подходов.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФ № 24-16-00180.