

Роль G-бета-подобного белка в контроле клубенькообразования и развития боковых корней у гороха посевного и люцерны усеченной

А.Д. Бовин, О.А. Павлова, А.М. Дымо, Е.А. Долгих*

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

* dol2helen@yahoo.com

Цель: G-бета-подобные белки, структурно сходные с бета-субъединицей гетеротримерного G-белка, играют важную роль в качестве сигнальных регуляторов у растений при контроле роста и развития. С помощью *in situ* гибридизации было показано, что гены, кодирующие эти белки, могут экспрессироваться в клубеньках бобовых при симбиозе, но их роль при этом оставалась невыясненной. Целью настоящей работы являлось изучение участия G-бета-подобного белка (Gbeta-like, GbL) люцерны и гороха в процессе развития симбиоза с ризобиями и формировании корней.

Материалы и методы: Для изучения локализации активности промотора гена *GbL* была получена конструкция на основе вектора pBGWFS7.0 с репортерным слиянием с геном бета-глюкуронидазы (*GUS*). Для экспериментов по подавлению экспрессии гена *GbL* люцерны и гороха методом РНК-интерференции использовали вектор pK7GWIWG2II с фрагментом кДНК гена *GbL*. Для сверхэкспрессии изучаемого гена получили конструкцию *pCaMV35S::GbL* в векторе pB7WG2D. Композитные растения получали с помощью штамма *Agrobacterium rhizogenes* ARqual, содержащего необходимую конструкцию. Растения выращивали в вермикулите с добавлением среды Fahreus, оценку развития корней и клубеньков производили спустя две недели у люцерны и три недели у гороха.

Результаты: В геноме люцерны усеченной (*Medicago truncatula*) нами был выявлен один ген *MtGbL1* (Medtr8g106790), а у гороха посевного (*Pisum sativum*) два гена *PsGbL1* (Psat7g003840), *PsGbL2* (Psat6g148200), кодирующие G-бета-подобные белки. Анализ протеома корней гороха показал увеличение синтеза *PsGbL1* в ответ на инокуляцию ризобиями (24 ч) (Leppanen et al., 2018). У *Medicago sativa* была показана локализация соответствующих транскриптов в клубеньках (Khan et al., 1997). Это определило наш интерес к изучению роли таких G-бета-подобных белков в регуляции развития симбиоза.

Локализация активности промотора гена *MtGbL1::GUS* (2.4 т.п.о.) *M. truncatula* была связана с развивающимися примордиями клубеньков и боковых корней, а также была выявлена в клубеньках, что соответствовало данным для *M. sativa* (Khan et al., 1997). Для анализа влияния бета-подобного белка на клубенькообразование и развитие корней нами были проведены эксперименты по подавлению экспрессии генов *MtGbL1* и *PsGbL1* помощью РНК-интерференции. В результате у растений люцерны значительно нарушалось образование корней, а редкие образовавшиеся корни не имели клубеньков. У растений гороха в ответ на подавление снижалось число боковых корней и формировались множественные примордии, остановившиеся в развитии. Отдельные клубеньки при этом формировались, что вероятно было связано с присутствием у гороха дополнительного гена *PsGbL2*, что не приводило к столь драматичным нарушениям на фоне РНК-интерференции, как это происходило у люцерны. Эти данные могли свидетельствовать об участии G-бета-подобных белков в контроле развития симбиотических клубеньков и боковых корней у люцерны и гороха. Мы предположили, что подобные нарушения в развитии этих органов у двух видов бобовых растений могут быть связаны с нарушением гормональной регуляции. Нами был проведен анализ экспрессии генов, контролирующих биосинтез ауксина и ответ растений на ауксин. На фоне подавления *PsGbL1* было выявлено существенное снижение экспрессии генов *PsGH3.1*, регулируемого ауксином, а также *PsARF19a*, участвующего в ответе растений на ауксин и гена *PsWOX13b*, контролирующего процессы морфогенеза у растений.

Сверхэкспрессии гена *MtGbL1* в корнях люцерны приводила к формированию клубеньков с разросшейся корой и удлинненным основанием, напоминающее по строению боковой корень, в этих структурах наблюдали снижение экспрессии *WOX13a* и *WOX13b*. Это также указывало на существенную роль G-бета-подобного белка в контроле морфогенеза клубенька и фитогормональной регуляции, прежде всего с участием ауксина.

Выводы: Результаты наших исследований показали, что G-бета-подобные белки могут участвовать в регуляции морфогенеза клубеньков у растений люцерны усеченной и гороха посевного, оказывая влияние на фитогормоны и ключевые регуляторы развития клубенька. Понимание особенностей сигнальной регуляции этих процессов у бобовых растений позволит использовать эти знания для увеличения продуктивности симбиозов между хозяйственно значимыми культурами растений и ризобиями.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта РНФ, проект № 24-16-00108.