

Метаболическая инженерия растений как основа для регуляции специфичности и эффективности бобово-ризобияльного симбиоза

Е.А. Долгих^{1,2*}, Е.С. Канцурова¹, П.А. Кулеш², А.В. Долгих¹, О.А. Павлова¹, А.Д. Бовин¹, Н.В. Смирнова¹, Е.А. Сальникова¹, Р.Р. Янборисов²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

² Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

* dol2helen@yahoo.com

Цель: В основе развития симбиоза между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями (ризобиями) лежит сигнальный обмен между партнерами. В ответ на инокуляцию и узнавание растением сигнальных молекул ризобий Nod-факторов, активируется набор внутриклеточных регуляторов, которые участвуют в передаче сигнала, что в конечном итоге приводит к появлению новых органов – азотфиксирующих клубеньков. Увеличение эффективности симбиоза представляет собой важную задачу, поскольку от этого зависит продуктивность бобовых растений. Ранее нам удалось показать, что в процессе передачи сигнала от Nod-фактора важную роль играют фосфолипазы С и D, регулирующие образование инозитол-фосфатов и фосфатидной кислоты (ФК), а также митоген-активируемые протеинкиназы. Поскольку ФК является важным вторичным мессенджером, мы проверили гипотезу о том, что повышение уровня синтеза белков, участвующих в связывании ФК, приводит к ее накоплению в растительных тканях, что оказывает положительное влияние на симбиоз. При сверхпродукции митоген-активируемой протеинкиназы 6 (MAPK6) наблюдали значительное увеличение количества клубеньков и биомассы у композитных бобовых растений. Целью данной работы является разработка новой методологии метаболической инженерии для повышения продуктивности растений люцерны усеченной (*Medicago truncatula*) и гороха посевного (*Pisum sativum*), основанных на стимуляции активности регуляторов сигнальных путей, с использованием современных методов редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9.

Материалы и методы: В нашей работе был протестирован метод первичного редактирования гена *MAPK6* для изменения активности кодируемого фермента путем модификации сайтов фосфорилирования в его активном центре (молекулярная фосфомимикрия), что может привести к значительному увеличению эффективности симбиоза. Получены композитные растения *P. sativum* сорта Cameo со сверхэкспрессией гена *PsMAPK6*, а также с модификацией его первичной последовательности с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9.

Результаты: Результаты исследований показали, что сверхэкспрессия гена *MtSPHK1-PA*, кодирующего домен сфингозинкиназы 1 (MtSPHK1), связывающий ФК, стимулировала рост растений и увеличивала число клубеньков у люцерны усеченной. Кроме того, было исследовано влияние MAPK6 на развитие симбиоза. С использованием генноинженерных подходов была осуществлена сверхэкспрессия гена *PsMAPK6* в трансгенных корнях гороха, что привело к значительному увеличению количества клубеньков и биомассы таких растений. В связи с этим MAPK6 также может быть привлекательным объектом для метаболической инженерии. Активация MAPK6 может происходить в результате фосфорилирования остатков треонина и тирозина в активном центре фермента. Мы разработали новые подходы для первичного редактирования (prime editing) гена *PsMAPK6* с использованием технологии CRISPR/Cas9. При анализе полученных растений выявлено существенное увеличение количества клубеньков на трансгенных корнях гороха, как и в случае сверхэкспрессии этого гена.

Выводы: Таким образом, возможность использования методов метаболической инженерии для получения бобовых растений с повышенной эффективностью симбиоза является перспективной для регуляции их продуктивности.

Финансирование: Работа была поддержана РНФ 24-16-00180.