СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 56, № 3, с. 465-474

Симбиотические взаимодействия

УДК 635.64:573.6.086.83:577.21]:58 doi: 10.15389/agrobiology.2021.3.465rus

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ КОМПОЗИТНЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА *Solanum lycopersicum* L., ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕНАМИ РЕЦЕПТОРОВ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ РИЗОБИЙ У ГОРОХА*

Е.С. РУДАЯ, Е.А. ДОЛГИХ ✉

В основе развития бобово-ризобиального симбиоза лежит сигнальный обмен между партнерами, что обеспечивает их взаимное узнавание, активацию инфекционного процесса и программы органогенеза клубеньков. Интерес представляет изучение возможности приобретения небобовыми растениями способности к рецепции сигнальных молекул ризобий — липохитоолигосахаридных сигналов Nod-факторов и дальнейшей трансдукции сигнала. У гороха ранее были выявлены две рецепторные киназы — SYM10 и K1, которые необходимы для узнавания Nod-факторов при инициации симбиоза с ризобиями. При рецепции Nod-факторов формируется комплекс между этими двумя рецепторными киназами, что приводит к сигнальной трансдукции. В настоящей работе был осуществлен перенос двух генов, кодирующих LysM-РПК SYM10 и K1 у гороха *Pisum sativum* L., в растения томата *Solanum lycopersicum* L. с помощью агробактериальной трансформации. У композитных растений, трансформированных генами *PsSym10* или *PsK1*, впервые выявлена возможность активации экспрессии перенесенных генов рецепторов под влиянием инокуляции типовым штаммом ризобий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026. Также показано, что под влиянием рецепторов в генетически трансформированных корнях композитных растений увеличивается экспрессия генов, которые могут регулироваться компонентами «общего» сигнального пути. Целью работы было изучение возможности приобретения растениями *S. lycopersicum* способности к узнаванию сигнальных молекул ризобий за счет переноса генов, кодирующих рецепторы Nod-факторов у бобового растения *P. sativum*. Для проведения экспериментов были получены и использованы два вида конструкций в векторе pKm43GW, в которых гены рецепторов *PsSym10* или *PsK1* были клонированы под промотором гена экстенсина томата pSlEXT1 — pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S и pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S. Молодые проростки томата *S. lycopersicum* сорта Carmello были трансформированы штаммом *Agrobacterium rhizogenes* Arqua 1. Трансформированные проростки помещали на агаризованную среду Мурасиге-Скуга (МС) без сахарозы в чашках Петри и культивировали в вертикальном положении в фитотроне до появления каллуса. После этого растения переносили на среду МС с 3 % сахарозы, содержащую 0,3 мг/мл антибиотика цефотаксима, и инкубировали до появления трансгенных корней. Композитные растения переносили в вермикулит, политый 0,5× средой Fahreus и инкубировали в условиях повышенной влажности в течение 2-3 сут. После этого растения были инокулированы штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026, содержащим ген глюкуронидазы *uidA* (*GUS*). Для анализа использовали трансформированные корни композитных растений томата без инокуляции ризобиями (контроль, 7 сут), а также трансформированные корни через 7 и 21 сут после инокуляции. Количественный анализ экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). При использовании промотора pSlEXT1 наблюдали экспрессию обоих генов *PsSym10* и *PsK1* в генетически трансформированных корнях растений томата, при этом экспрессия усиливалась под влиянием инокуляции ризобиями. Было показано существенное (примерно в 2,0-2,5 раза) повышение экспрессии гена *PsSym10* в ответ на инокуляцию ризобиями как на 7-е, так и на 21-е сут. Уровень экспрессия *PsK1* оказался самым высоким через 7 сут после инокуляции в трансформированных корнях композитных растений томата по сравнению с контролем. Чтобы определить, будут ли активироваться компоненты «общего» сигнального пути под влиянием перенесенных рецепторов в композитных растениях томата, были оценены изменения в экспрессии генов *S. lycopersicum SlD27*, *SlNSP2*, *SlRAM1* и *SlMAPK6*. Эти гены кодируют каротиноид-изомеразу (DWARF27), регулирующую синтез гормонов стриголактонов, транскрипционные факторы NSP2 и RAM1, а также митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK6). Активация экспрессии двух генов *SlNSP2* и *SlMAPK6* в ответ на инокуляцию может свидетельствовать о влиянии перенесенного гена *K1* гороха на восприимчивость растений томата к инокуляции ризобиями.

Ключевые слова: бобово-ризобиальный симбиоз, рецептор-подобные киназы, Nod-факторы, композитные растения томата, экспрессия генов.

Способность формировать симбиозы с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями порядка *Rhizobiales*, обобщенно называемыми ризобиями, — важное эволюционное приобретение растений, обеспечивающее преимущество в условиях недостатка азота в почве. Однако только

* Исследования были поддержаны грантом РНФ 16-16-10043.

представители порядка *Fabales* и отдельные представители порядка *Rosales* (некоторые виды *Parasponia*, сем. *Cannabaceae*) формируют симбиозы с ризобиями (1). Исследования, направленные на расширение круга растений, вступающих в симбиоз с ризобиями, открывают новые перспективы в развитии эффективного земледелия и минимизации использования азотных удобрений. Их важный этап — оценка возможности приобретения небобовыми растениями способности к рецепции сигнальных молекул ризобий и дальнейшей передаче сигнала, что лежит в основе узнавания партнеров.

Липохитоолигосахаридные сигнальные молекулы — Nod-факторы, выделяемые ризобиями, служат ключевыми медиаторами симбиоза у бобовых растений. Именно от узнавания этих молекул растительным партнером зависит органогенез клубеньков и бактериальная колонизация (2). Соединения очень схожей структуры — липохитоолигосахариды Myc-факторы, выделяемые грибами арбускулярной микоризы (AM) (3), выполняют роль сигнальных молекул, необходимых для развития другого типа симбиоза с грибами AM, который формируют более 80 % наземных растений. Возможность активации ответных реакций при узнавании Nod-факторов может быть связана с наличием у небобовых растений компонентов сигнального пути, общих для передачи сигнала при развитии бобово-ризобиального симбиоза и симбиоза растений с грибами AM (4, 5). Различия заключаются главным образом в узнавании Nod- и Myc-факторов разными рецепторами и активации специфичных для каждого пути транскрипционных факторов, которые стимулируют свои гены-мишени (6, 7).

В рецепцию Nod- и Myc-факторов вовлечены представители семейства LysM-рецептор-подобных киназ (LysM-РПК), имеющие специфичные LysM-мотивы во внеклеточных доменах. Среди LysM-РПК принято выделять белки класса LYK (LysM-receptor-like kinases) с активным киназным доменом и LYR (LYK related), у которых киназный домен неактивен. Присутствие LysM-мотивов определяет способность таких рецепторов связывать соединения, содержащие остатки N-ацетилглюкозамина (Nod- и Myc-факторы состоят в среднем из 4-5 остатков N-ацетилглюкозамина и содержат специфичную жирную кислоту на не восстанавливающем конце молекулы) (8-10). Некоторые представители семейства LysM-РПК узнают структурно сходные молекулы, имеющие в своем составе остатки N-ацетилглюкозамина, такие как хитин, пептидогликан муреин и их низкомолекулярные производные (11, 12). Оказалось, что при рецепции как Nod-, так и Myc-факторов у растений должен формироваться комплекс между LYR и LYK белками, что приводит к сигнальной трансдукции (13, 14).

Способность формировать симбиоз с азотфиксирующими ризобиями выявлена и у ряда представителей небобовых растений, таких как *Parasponia andersonii* Planch. (сем. *Cannabaceae*). У *Parasponia* была найдена LysM-РПК PanNFP (класс LYR), которая может узнавать сигналы как ризобий, так и грибов AM (15). При этом предполагается, что PanNFP формирует комплексы с разными ко-рецепторами (LYK) при узнавании Nod- и Myc-факторов.

У других небобовых растений, например у томата *Solanum lycopersicum* L., недавно выявлена LysM-РПК SlLYK10 (LYR), которая имеет высокую степень гомологии с рецептором Nod-факторов бобовых растений — MtNFP люцерны слабоусеченной *Medicago truncatula* Gaertn. (16). SlLYK10 в комплексе с ко-рецептором LysM-РПК SlLYK12 (LYK) связывает Myc-факторы. Более того, введение гена *SlLYK10* под сильным промотором в мутанты растений *M. truncatula* по гену *nfp*, дефектные по гену рецептора

Nod-факторов, приводило к восстановлению клубенькообразования и формированию функциональных клубеньков (17, 18). Выявленная способность указанного рецептора томата восстанавливать процесс узнавания Nod-факторов у бобовых растений позволила объяснить результаты более ранних исследований, в которых была показана отзывчивость клеток растений томата на добавление Nod-факторов в среду и развитие наиболее ранних ответных реакций на эти сигналы (подщелачивание ростовой среды, деполяризация мембраны) (19). Можно предположить, что способность узнавать Nod-факторы растениями томата связана с активацией комплекса рецепторов Myc-факторов SlLYK10/SlLYK12 из-за сходства структуры сигнальных молекул. Действительно, недавно при изучении LysM-РПК SlLYK10 была показана способность этого рецептора с высокой аффинностью связывать не только Myc-факторы, но и Nod-факторы (18). Такая восприимчивость небобовых растений к сигнальным молекулам ризобий предполагает возможность активации ими компонентов «общего» сигнального пути (ОСП). В связи с этим представляет интерес изучение возможности переноса в небобовые растения генов, кодирующих рецепторы Nod-факторов ризобий с более высокой аффинностью и специфичностью к указанным молекулам, а также оценка отзывчивости растений на эти сигналы. Необходимо выяснить, задействованы ли в передаче сигнала компоненты ОСП и какие транскрипционные факторы, а также гены-мишени при этом активируются.

У гороха *Pisum sativum* L. были выявлены две LysM-РПК — SYM10 и K1 (LYR и LYK), которые необходимы для узнавания Nod-факторов при инициации симбиоза с ризобиями (20, 21). При этом у мутантов гороха по генам *sym10* и *k1* практически полностью отсутствуют ответные реакции на инокуляцию ризобиями и добавление Nod-факторов, что свидетельствует о важности этих рецепторов для развития симбиоза (20, 21).

В настоящей работе был осуществлен перенос двух генов, кодирующих LysM-РПК SYM10 и K1 у гороха *Pisum sativum* L., в растения томата *S. lycopersicum* с помощью агробактериальной трансформации. У композитных растений, трансформированных генами *PsSym10* или *PsK1*, впервые выявлена возможность активации экспрессии перенесенных генов рецепторов под влиянием инокуляции типовым штаммом ризобий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026. Также показано, что под влиянием рецепторов в генетически трансформированных корнях композитных растений увеличивается экспрессия генов, которые могут регулироваться компонентами ОСП.

Целью работы было изучение возможности приобретения растениями *Solanum lycopersicum* L. способности к узнаванию сигнальных молекул ризобий за счет переноса генов, кодирующих рецепторы Nod-факторов бобового растения *Pisum sativum* L.

Методика. Семена томата сорта Carmello стерилизовали 15 % гипохлоритом натрия NaOCl (0,1 M) в течение 5 мин, далее промывали 6 раз дистиллированной стерильной водой и выдерживали в 10 % H_2O_2 в течение 2 мин. После этого промывали семена 3 раза большими объемами стерильной воды. Стерилизованные семена помещали в чашки Петри на агаризованную среду Мурасиге-Скуга (МС) без сахарозы (22) и выдерживали в темноте в течение 1 сут при 4 °C. Далее чашки переносили в условия комнатной температуры и проращивали в темноте в течение 5-7 сут. Молодые проростки переносили в стерильные сосуды (объем 400 мл) для выращивания растений со средой МС, содержащей 3 % сахарозу, и культивировали в условиях фитотрона MLR-352H («Panasonic», Япония) при 21 °C, 60 % влажности и фотопериоде 16 ч свет/8 ч темнота.

Штамм *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* CIAM1026 культивировали при 28 °C на агаризованной среде TY (tryptone yeast) с добавлением 0,5 мг/мл стрептомицина. Для стандартных процедур клонирования использовали штаммы *Escherichia coli* XLBlue MRF' и TOP10 («Thermo Fisher Scientific», США). Для получения композитных растений использовали штамм *Agrobacterium rhizogenes* Arqua 1, содержащий необходимую конструкцию. *A. rhizogenes* Arqua 1 культивировали при 28 °C на агаризованной среде TY.

Для трансформации растений были получены две конструкции — pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S и pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S. Кодирующую полноразмерную последовательность гена *PsSym10* без стоп-кодона амплифицировали с использованием в качестве матрицы кДНК (суммарную РНК выделяли из клубеньков гороха сорта Finale, собранных на 21-е сут после инокуляции) (20). Амплификацию проводили с использованием высокоточной Phusion полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США) (20). Последовательность гена *PsSym10* была слита с последовательностью, кодирующей 3xFLAG, и далее перенесена в вектор pDONR221 («Thermo Fisher Scientific», США). Для работы также использовали ранее полученную конструкцию в векторе pDONR221, которая содержала полноразмерную кодирующую последовательность гена *PsK1* (без стоп-кодона), слитую с последовательностью, кодирующей флуоресцентный белок RFP (20).

Вектор pDONR L4-pEXT1-R1r, содержащий промотор гена экстенсина томата pEXT1 (1121 п.н.), был предоставлен доктором S. Bensmihen (Institut National de la Recherche Agronomique, г. Тулуза, Франция). Вектор с промотором pDONR L4-pEXT1-R1r использовали для мультилокусной гомологичной рекомбинации. Для рекомбинации также применяли векторы pDONR221, содержащие кодирующую последовательность гена *PsK1* либо гена *PsSym10*, и вектор pENTRY R2-T35S-L3 с терминатором T35S (Ghent University, Бельгия). Необходимые конструкции вводили в вектор доставки pKm43GW (pDEST4-3) с использованием LR-клоназы II («Thermo Fisher Scientific», США). pKm43GW использовали в качестве конечного вектора для клонирования на основе гомологичной рекомбинации. Полученные конструкции в векторе pKm43GW (pKm43GW-pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S и pKm43GW-pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S) вводили в штамм *A. rhizogenes* Arqua1 методом электропорации.

Молодые проростки томата обрезали в области гипокотиля и трансформированы штаммом *A. rhizogenes* Arqua 1 посредством нанесения бактериальной массы на место поранения. Трансформированные проростки (4-5 шт.) помещали на агаризованную среду MC без сахарозы (22) в чашку Петри между двумя листами фильтровальной бумаги, смоченной в стерильной дистиллированной воде. Область корней на чашках закрывали фольгой. Чашки помещали в фитотрон и культивировали в вертикальном положении при температуре 21 °C, 60 % влажности и с фотопериодом 16 ч свет/8 ч темнота в течение 10-14 сут до появления каллуса. После этого растения переносили на среду MC с сахарозой (3 %), содержащую 0,3 мг/мл антибиотика цефотаксима и дополнительно инкубировали в тех же условиях в течение 5-10 сут до появления трансгенных корней. Композитные растения переносили в вермикулит, политый 0,5× средой Fahreus (0,132 г/л $CaCl_2$, 0,12 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 г/л KH_2PO_4, 0,075 г/л $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 5 мг/л Fe-цитрат, 0,07 мг/л $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnCl_2$, H_3BO_3 и $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; pH 7,5), и инкубировали в условиях повышенной влажности (прикрывали прозрачными полиэтиленовыми пакетами) в течение 2-3 сут (21 °C, 16 ч свет/8 ч темнота). Затем растения инокулировали штаммом

R. leguminosarum bv. *viciae* CIAM1026, содержащим ген глюкуронидазы *uidA* (*GUS*), с оптической плотностью суспензии OD_{600} = 0,5 (по 2 мл на растение). После культивирования с ризобиями в течение 7 и 21 сут из трансформированных корней растений томата, несущих конструкцию pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S или pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S, выделяли суммарную РНК и синтезировали кДНК. В качестве контроля использовали трансгенные корни растений без инокуляции ризобиями.

В экспериментах суммарную РНК выделяли с использованием реагента PureZol («Bio-Rad Laboratories», США) в соответствии с протоколом производителя. Для удаления геномной ДНК применяли обработку DNAseI («Thermo Fisher Scientific», США). кДНК получали с помощью обратной транскриптазы RevertAid H Minus («Thermo Fisher Scientific», США) с использованием праймера олиго(дТ18) («Sileks», Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Анализ экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), на амплификаторе CFX96 Real-Time System («Bio-Rad Laboratories», США) со смесью iQ SYBR Green Super Mix («Bio-Rad Laboratories», США). Условия проведения ПЦР: 30 с при 95 °C, 30 с при 54 °C, 40 с при 72 °C (40 циклов). Все праймеры были разработаны с использованием программы DNAStar и синтезированы в компании Евроген (http://www.evrogen.com).

Для подсчета усредненных значений относительной экспрессии генов в количественной ОТ-ПЦР и стандартной ошибки среднего (±SEM) использовали встроенные функции программы Microsoft Excel.

Результаты. Для трансформации растений томата сорта Carmello (рис. 1) генами *PsSym10* и *PsK1,* кодирующими рецепторы Nod-факторов гороха, использовали штамм *Agrobacterium rhizogenes* Arqua 1, который содержал два типа конструкций — pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S или pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S).

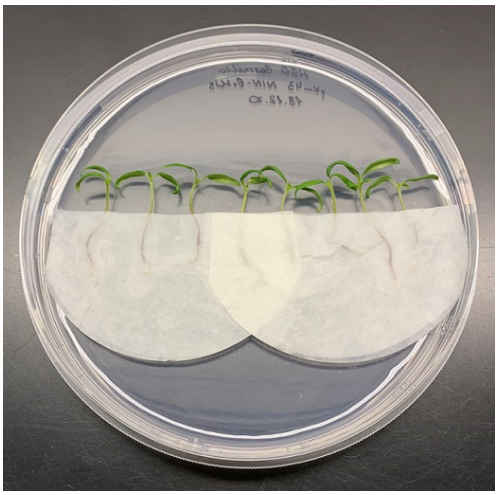

Рис. 1. Агробактериальная трасформация растений томата *Solanum lycopersicum* L. сорта Carmello.

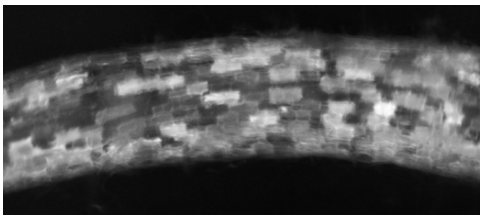

Рис. 2. Корень композитных растений томата *Solanum lycopersicum* L. сорта Carmello, трансформированных конструкцией pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S, под флуоресцентным бинокуляром («Zeiss», Германия)**.** Выявлено свечение флуоресцентного белка RFP в клетках.

В варианте с конструкцией pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S, в которой ген рецептора K1 был слит с последовательностью, кодирующей флуоресцентный белок RFP, нам удалось выявить избирательное свечение генетически трансформированных корней (рис. 2). Это свидетельствовало об экспрессии перенесенного гена в трансформированных корнях томата. Растения были трансформированы генами, кодирующими полноразмерные последовательности белков с N-концевыми сигнальными пептидами. Судя по степени свечения RFP, сигнальные пептиды нормально функционировали

в растениях томата.

На следующем этапе с помощью метода количественной ПЦР, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), провели анализ экспрессии генов *PsSym10* и *PsK1* в корнях композитных растений томата *S. lycopersicum*, культивируемых в течение 7 и 21 сут (последовательности праймеров, использованных для ОТ-ПЦР, приведены в таблице). Были использованы трансформированные корни растений томата, несущих конструкцию pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S или pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S, через 7 и 21 сут после инокуляции ризобиями *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026, а также трансформированные корни композитных растений томата без инокуляции ризобиями (контроль, 7 сут).

Последовательности праймеров, использованных для проведения количественной ОТ-ПЦР

Название гена	Последовательность праймера
PsK1-F	5′-CGCGATGTAAAATCAGCAAACATATTG-3′
PsK1-R	5′-CGTCACCATATTGAGCATATTCTGG-3′
PsSym10-F	5′-GTACTTCATTGGCGGAGACTG-3′
PsSym10-R	5′-CCATAAGTTTCACAAGATTTCCAT-3′
SlNSP2-F	5′-AAGGCCGATAGGAGACGAAGAAGG-3′
SlNSP2-R	5′-CCCCACCCCACTCAACCACTC-3′
SlMAPK6-F	5′-CGCGCTTGCTCATCCTTACCTA-3′
SlMAPK6-R	5′-GTGCTGGTATTCGGGATTAAATG-3′
SlD27-F	5′-GCTACCACAGGATTAAGAAACAAG-3′
SlD27-R	5′-CCAACTAGCCAAGGAAAGAAGAT-3′
SlRAM1-F	5′-GGAAGCGGTCAGGGAAACAGG-3′
SlRAM1-R	5′-CCAGGAACCGACCCAGGAAATAC-3′
SlGADH-F	5′-TGAGAATCAACACACTTCTCCAAGG-3′
SlGADH-R	5′-GCATTAAGAATTTCCCCAGAGGTC-3′

Анализ показал (рис. 3), что ген *PsSym10* экспрессируется только в корнях растений, трансформированных конструкцией pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S. Сходным образом экспрессию гена *PsK1* выявили только в корнях растений, трансформированных конструкцией pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S (см. рис. 3). Следовательно, после агробактериальной трансформации и переноса генов гороха *PsSym10* и *PsK1* в ДНК клеток корней томата происходила стимуляция экспрессии этих генов.

Наблюдалось существенное (примерно в 2,0-2,5 раза) увеличение экспрессии гена *PsSym10* в ответ на инокуляцию ризобиями как на 7-е, так и на 21-е сут после инокуляции. Повышение уровня экспрессии гена *PsK1* оказалось наиболее значительным через 7 сут после инокуляции в корнях у композитных растений томата по сравнению с контрольными. Через 21 сут экспрессия гена *PsK1* снижалась, но оставалась более высокой по сравнению с контрольными корнями без инокуляции. Следовательно, оба гена гороха *PsSym10* и *PsK1* могут активироваться при использовании промотора гена экстенсина pSlEXT1 в композитных растениях томата.

Известно, что промотор гена экстенсина регулируется этиленом (23). Вместе с тем установлено, что при инокуляции бобовых растений ризобиями в корнях может повышаться продукция этилена (24). Относительно высокая экспрессия генов гороха при использовании промотора гена экстенсина может объясняться повышением содержания этилена в корнях растений под влиянием инокуляции ризобиями. Использование подобного промотора может быть удобным для изучения влияния перенесенных генов бобовых на растения томата при инокуляции ризобиями.

Известно, что компоненты «общего» сигнального пути (ОСП) активируются после связывания сигнальных молекул с рецепторами, локализованными в плазматической мембране клеток корней растений (25). Ранее было показано, что корни растений томата способны воспринимать Nod-

факторы. При этом под влиянием сигнальных молекул могут активироваться такие ответные реакции, как изменение потока ионов через мембрану и ее деполяризация (18). Однако оставалось неизвестным, могут ли Nod-факторы активировать компоненты ОСП у небобовых растений.

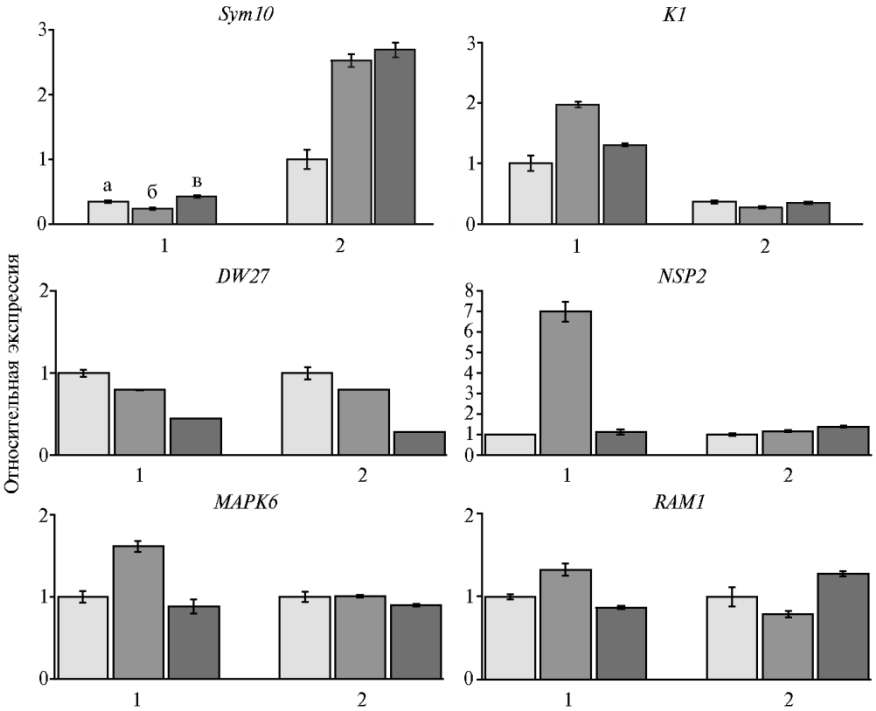

Рис. 3. Относительная экспрессия генов *PsSym10*, *PsK1*, *SlD27*, *SlNSP2*, *SlMAPK6* и *SlRAM1* в корнях композитных растений томата *Solanum lycopersicum* L. сорта Carmello, трансформированных конструкциями pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S (1) **и pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S** (2)**, при инокуляции штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026:** а — контроль (без инокуляции), б — 7-е сут после инокуляции, в — 21-е сут после инокуляции. Уровень транскрипции мРНК изучаемого гена нормализован по отношению к экспрессии гена *GADH* томата, значения представлены в виде относительной экспрессии генов в варианте с инокуляцией к контролю. Бары представляют стандартные ошибки среднего (±SEM) для трех технических повторностей при анализе экспрессии. В каждом варианте РНК выделяли из 3-5 трансгенных корней.

Мы решили проверить, как будет влиять перенос генов гороха, кодирующих два рецептора к Nod-факторам, на экспрессию маркеров, которые в норме активируются компонентами ОСП, а также выяснить, будут ли активироваться компоненты ОСП под влиянием перенесенных рецепторов в композитных растениях томата при узнавании Nod-факторов ризобий. С этой целью сравнили экспрессию генов, которые считаются маркерами симбиоза растений с грибами АМ (активируются в результате передачи сигнала при формировании симбиоза), в трансформированных корнях томата без инокуляции и при инокуляции ризобиями. Предварительно нами был проведен поиск последовательностей генов у томата, которые могут быть гомологами генов бобовых растений, активируемых при симбиозе с грибами АМ. Прежде всего, это гены β-carotene isomerase DWARF27 (D27), транскрипционного фактора Nodulation Signaling Pathway 2 (NSP2), транскрипционного фактора Required for Arbuscular Mycorrhization (RAM1), а также Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK6) (12). Анализ экспрессии маркерных генов проводили на 7-е и 21-е сут после инокуляции в трансгенных корнях композитных растений томата при инокуляции штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026 (см. рис. 3).

В корнях растений томата с конструкцией pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S не было выявлено существенных изменений в экспрессии генов *SlD27*, *SlNSP2*, *SlRAM1* и *SlMAPK6* (см. рис. 3). У растений, трансформированных конструкцией pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S, экспрессия *SlD27* и *SlRAM1* также значительно не изменялась в ответ на инокуляцию, однако экспрессия *SlNSP2* и *SlMAPK6* заметно увеличивалась (см. рис. 3). Активация этих маркеров может свидетельствовать о влиянии перенесенного гена гороха *PsK1* на восприимчивость растений томата к инокуляции ризобиями. В дальнейшем будет проведен более детальный анализ морфологических изменений у растений, трансформированных конструкцией pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S. Большой интерес может представлять получение и анализ растений, которые будут трансформированы двумя генами *PsSym10* и *PsK1* одновременно (в одной генетической конструкции), поскольку у гороха в связывании Nod-факторов участвуют оба этих рецептора в составе комплекса.

Таким образом, нам удалось получить композитные растения томата сорта Carmello, трансформированные генами гороха *PsSym10* и *PsK1*, которые кодируют рецепторы Nod-факторов. Интеграция генов *Sym10* и *K1* в геном томата была проведена с использованием векторных конструкций pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S и pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S и подтверждена методом ПЦР. Под влиянием инокуляции штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026 в трансгенных корнях композитных растений усиливалась экспрессия как гена *PsSym10*, так и гена *PsK1*. В корнях, трансформированных конструкцией pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S, избирательно увеличивалась экспрессия генов *SlNSP2* и *SlMAPK6*, которые активируются под влиянием компонентов «общего» сигнального пути. Активация экспрессии двух генов — *SlMAPK6* и *SlNSP2* в ответ на инокуляцию может свидетельствовать о влиянии перенесенного гена рецептора гороха на восприимчивость растений томата к инокуляции ризобиями.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: rudaya.s.e@gmail.com, dol2helen@yahoo.com ✉

Поступила в редакцию 30 декабря 2020 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2021, V. 56, № 3, pp. 465-474

PRODUCTION AND ANALYSIS OF COMPOSITE TOMATO PLANTS *Solanum lycopersicum* L. CARRYING PEA GENES ENCODING THE RECEPTORS TO RHIZOBIAL SIGNAL MOLECULES

E.S. Rudaya, E.A. Dolgikh ✉

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail rudaya.s.e@gmail.com, dol2helen@yahoo.com (corresponding author ✉)
ORCID:
Rudaya E.S. orcid.org/0000-0002-3081-9880 Dolgikh E.A. orcid.org/0000-0002-5375-0943
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially by the Russian Science Foundation (grant No. 16-16-10043)
Received December 30, 2020 doi: 10.15389/agrobiology.2021.3.465eng

Abstract

The development of legume-rhizobial symbiosis is based on signal exchange between partners, which ensures their mutual recognition and activation of the infection process and the program of nodule organogenesis. In this regard, it is of great interest to study the possibility of acquisition by non-legume plants of the ability to perceive lipochito-oligosaccharide signal molecules of rhizobia, the Nod factors, and subsequent activation of signal transduction pathway. To study this possibility in our work, we carried out the transfer of the genes encoding receptors to Nod factors of legume plant pea *Pisum sativum* L. into tomato *Solanum lycopersicum* L. (Carmello cultivar) using the transformation

with *Agrobacterium rhizogenes*. In pea, two receptor kinases, SYM10 and K1, were previously identified, which are necessary for the recognition of Nod factors during the initiation of symbiosis with rhizobia. Upon reception of Nod factors, a complex is formed between these two receptor kinases, which leads to signal transduction. In the present work, we carried out the transfer of two genes encoding LysM-RLK SYM10 and K1 in pea *P. sativum* into tomato plants *S. lycopersicum* using agrobacterial transformation. In composite plants transformed with *PsSym10* or *PsK1* genes, the possibility of expression activation of introduced receptor genes in response to inoculation with a typical rhizobial strain *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026 was shown. It was also shown that, under the influence of receptors in genetically transformed roots of composite plants, the expression of genes is increased, which can be regulated by components of the "common" signal pathway. The aim of this work was to study the possibility of acquiring the ability of *S. lycopersicum* plants to recognize signal molecules of rhizobia after transfer of the genes encoding receptors for Nod factors in the legume plant *P. sativum*. Two types of constructs in the pKm43GW vector were obtained and used, in which the *PsSym10* or *PsK1* genes encoding receptors were cloned under the pSlEXT1 promotor of tomato extensin gene — pSlEXT1::*PsSym10-3xFLAG*::T35S and pSlEXT1::*PsK1-RFP*::T35S. Young tomato seedlings of *S. lycopersicum* cv. Carmello were transformed with the *Agrobacterium rhizogenes* Arqua 1 strain. The transformed seedlings were placed on Murashige-Skoog (MS) agar medium without sucrose in Petri dishes and cultured in an upright position in a phytotron until callus is appeared. After that, the plants were transferred to MS medium with 3 % sucrose containing 0.3 mg/ml of the antibiotic cefotaxime and incubated until transgenic roots are appeared. Composite plants were transferred into vermiculite poured with 0.5× Fahreus medium and incubated under high humidity conditions for 2-3 days. The plants were then inoculated with *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026 containing the *uidA* glucuronidase gene (*GUS*). For the analysis we used transformed roots of composite tomato plants without rhizobial inoculation (control, 7 days), as well as transformed roots at 7 and 21 days after inoculation. The analysis of gene expression was performed by quantitative PCR combined with reverse transcription (RT-PCR). In genetically transformed roots of tomato plants the expression of both *PsSym10* and *PsK1* genes was observed under the pSlEXT1 promoter, moreover the expression was enhanced under the influence of rhizobial inoculation. A significant (approximately 2.0-2.5-fold) increase in the expression of the *PsSym10* gene was shown in response to inoculation with rhizobia both at 7 and 21 days. The level of *PsK1* expression was found to be the highest 7 days after inoculation in the transformed roots of composite tomato plants as compared to the control. To determine whether the components of the "common" signal pathway will be activated under the influence of transferred receptors in composite tomato plants, the changes in the expression of *S. lycopersicum SlD27*, *SlNSP2*, *SlRAM1*, and *SlMAPK6* genes were assessed. These genes encode carotenoid isomerase (DWARF27) which regulates the synthesis of the hormones strigolactones, transcription factors NSP2 and RAM1, and mitogen-activated protein kinase (MAPK6). Activation of the expression of two genes, the *SlNSP2* and *SlMAPK6* in response to inoculation may indicate the effect of the introduced pea *K1* gene on the susceptibility of tomato plants to rhizobial inoculation.

Keywords: legume-rhizobial symbiosis, receptor-like kinases, Nod factors, composite plants, gene expression.

REFERENCES

1. van Velzen R., Holmer R., Bu F., Rutten L., van Zeijl A., Liu W., Santuari L., Cao Q., Sharma T., Shen D., Roswanjaya Y., Wardhani T.A.K., Kalhor M.S., Jansen J., van den Hoogen J., Güngör B., Hartog M., Hontelez J., Verver J., Yang W.C., Schijlen E., Repin R., Schilthuizen M., Schranz M.E., Heidstra R., Miyata K., Fedorova E., Kohlen W., Bisseling T., Smit S., Geurts R. Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(20): E4700-E4709 (doi: 10.1073/pnas.1721395115).
2. Murray J.D. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(6): 631-639 (doi: 10.1094/MPMI-08-10-0181).
3. Cullimore J.V., Ranjeva R., Bono J.-J. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(1): 24-30 (doi: 10.1016/S1360-1385(00)01810-0).
4. Martin F.M., Uroz S., Barker D.G. Ancestral alliances: plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science*, 2017, 356(6340): eaad4501 (doi: 10.1126/science.aad4501).
5. de Bruijn F.J. The common symbiotic signaling pathway (CSSP or SYM). In: *The model legume Medicago truncatula*. F.J. de Bruijn (ed.). John Wiley & Sons, New Jersey, 2020 (doi: 10.1002/9781119409144.part8).
6. Diédhiou I., Diouf D. Transcription factors network in root endosymbiosis establishment and development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(3): 37 (doi: 10.1007/s11274-018-2418-7).
7. Xue L., Klinnawee L., Zhou Y., Saridis G., Vijayakumar V., Brands M., Dцrmann P., Gigolashvili T., Turck F., Bucher M. AP2 transcription factor CBX1 with a specific function in symbiotic exchange of nutrients in mycorrhizal *Lotus japonicus*. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences, 2018, 115(39): E9239-E9246 (doi: 10.1073/pnas.1812275115).
8. Broghammer A., Krusell L., Blaise M., Sauer J., Sullivan J.T., Maolanon N., Vinther M., Lorentzen A., Madsen E.B., Jensen K.J., Roepstorff P., Thirup S., Ronson C.W., Thygesen M.B., Stougaard J. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(34): 13859-13864 (doi: 10.1073/pnas.1205171109).
9. Fliegmann J., Canova S., Lachaud C., Uhlenbroich S., Gasciolli V., Pichereaux C., Rossignol M., Rosenberg C., Cumener M., Pitorre D., Lefebvre B., Gough C., Samain E., Fort S., Driguez H., Vauzeilles B., Beau J.M., Nurisso A., Imberty A., Cullimore J., Bono J.J. Lipo-chitooligosaccharidic symbiotic signals are recognized by LysM receptor-like kinase LYR3 in the legume *Medicago truncatula*. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(9): 1900-1906 (doi: 10.1021/cb400369u).
10. Bozsoki Z., Gysel K., Hansen S.B., Lironi D., Krцnauer C., Feng F., de Jong N., Vinther M., Kamble M., Thygesen M.B., Engholm E., Kofoed C., Fort S., Sullivan J.T., Ronson C.W., Jensen K.J., Blaise M., Oldroyd G., Stougaard J., Andersen K.R., Radutoiu S. Ligand-recognizing motifs in plant LysM receptors are major determinants of specificity. *Science*, 2020, 369(6504): 663-670 (doi: 10.1126/science.abb3377).
11. Bozsoki Z., Cheng J., Feng F., Gysel K., Vinther M., Andersen K.R., Oldroyd G., Blaise M., Radutoiu S., Stougaard J. Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(38): E8118-E8127 (doi: 10.1073/pnas.1706795114).
12. Leppyanen I.V., Shakhnazarova V.Y., Shtark O.Y., Vishnevskaya N.A., Tikhonovich I.A., Dolgikh E.A. Receptor-like kinase LYK9 in *Pisum sativum* L. is the CERK1-like receptor that controls both plant immunity and AM symbiosis development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 19(1): 8 (doi: 10.3390/ijms19010008).
13. Bisseling T., Geurts R. Specificity in legume nodule symbiosis. *Science*, 2020, 369(6504): 620-621 (doi: 10.1126/science.abd3857).
14. He J., Zhang C., Dai H., Liu H., Zhang X., Yang J., Chen X., Zhu Y., Wang D., Qi X., Li W., Wang Z., An G., Yu N., He Z., Wang Y.-F., Xiao Y., Zhang P., Wang E. A LysM receptor heteromer mediates perception of arbuscular mycorrhizal symbiotic signal in rice. *Molecular Plant*, 2019, 12(12): 1561-1576 (doi: 10.1016/j.molp.2019.10.015).
15. Den Camp R.O., Streng A., De Mita S., Cao Q., Polone E., Liu W., Ammiraju J.S.S., Kudrna D., Wing R., Untergasser A., Bisseling T., Geurts R. LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science*, 2011, 331(6019): 909-912 (doi: 10.1126/science.1198181).
16. Buendia L., Wang T., Girardin A., Lefebvre B. The LysM receptor-like kinase SlLYK10 regulates the arbuscular mycorrhizal symbiosis in tomato. *New Phytologist*, 2016, 210(1): 184-195 (doi: 10.1111/nph.13753).
17. Liao D., Sun X., Wang N., Song F., Liang Y. Tomato LysM receptor-like kinase SlLYK12 is involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1004 (doi: 10.3389/fpls.2018.01004).
18. Girardin A., Wang T., Ding Y., Keller J., Buendia L., Gaston M., Ribeyre C., Gasciolli V., Auriac M.C., Vernié T., Bendahmane A., Ried M.K., Parniske M., Morel P., Vandenbussche M., Schorderet M., Reinhardt D., Delaux P.M., Bono J.J., Lefebvre B. LCO receptors involved in arbuscular mycorrhiza are functional for rhizobia perception in legumes. *Current Biology*, 2019, 29(24): 4249-4259.e5 (doi: 10.1016/j.cub.2019.11.038).
19. Staehelin C., Granado J., Müller J., Wiemken A., Mellor R.B., Felix G., Regenass M., Broughton W.J., Boller T. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(6): 2196-2200 (doi: 10.1073/pnas.91.6.2196).
20. Kirienko A.N., Porozov Y.B., Malkov N. V., Akhtemova G.A., Le Signor C., Thompson R., Saffray C., Dalmais M., Bendahmane A., Tikhonovich I.A., Dolgikh E.A. Role of a receptor-like kinase K1 in pea *Rhizobium* symbiosis development. *Planta*, 2018, 248(5): 1101-1120 (doi: 10.1007/s00425-018-2944-4).
21. Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 2003, 425(6958): 637-640 (doi: 10.1038/nature02045).
22. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473-497 (doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).
23. Rival P., de Billy F., Bono J.J., Gough C., Rosenberg C., Bensmihen S. Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. *Development*, 2012, 139(18): 3383-3391 (doi: 10.1242/dev.081620).
24. Ligero F., Lluch C., Olivares J. Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. *Journal of Plant Physiology*, 1986, 125(3-4): 361-365 (doi: 10.1016/S0176-1617(86)80158-4).
25. Chiu C.H., Paszkowski U. Receptor-like kinases sustain symbiotic scrutiny. *Plant Physiology*, 2020, 182(4): 1597-1612 (doi: 10.1104/PP.19.01341).