

МАТЕРИАЛЫ

школы-конференции молодых ученых «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно- микробных взаимодействий»

Санкт-Петербург - Пушкин,

Российская Федерация

1 - 3 декабря 2017 года

**Школа-конференция молодых ученых
«Молекулярно-генетические и клеточные аспекты
растительно-микробных взаимодействий»**

проводится ФГБНУ ВНИИСХМ
при содействии Биологического факультета СПбГУ и
Вавиловского общества генетиков и селекционеров

при финансовой поддержке Российского научного фонда
(грант РНФ № 17-76-30016 «Научные основы создания
эффективной технологии стабилизации роста и развития
растений в многокомпонентной растительно-микробной
системе»)

по адресу ш. Подбельского 3, Санкт-Петербург - Пушкин,
Россия (ФГБНУ ВНИИСХМ)
1-3 декабря 2017 года

Организационный комитет Школы-конференции:

акад. РАН, д.б.н., проф. Тихонович И.А., декан биологического
факультета СПбГУ, научный руководитель ФГБНУ ВНИИСХМ
(председатель)

к.б.н. Жуков В.А., зав. лаб., ФГБНУ ВНИИСХМ
(зам. председателя)

к.б.н. Ахтемова Г.А., с.н.с., ФГБНУ ВНИИСХМ (секретарь)

Члены Организационного комитета:

д.б.н. Долгих Е.А., к.б.н. Цыганов В.Е., к.б.н. Штарк О.Ю.,
к.б.н. Кулаева О.А., Жернаков А.И., Сулима А.С., Афонин А.М.,
Иванова К.А., Серова Т.А., Филиппова Т.В., Колесник И.А.

Компьютерная верстка: Жуков В.А. Тираж 50 экз.

Приветственное слово председателя Организационного комитета школы- конференции И.А. Тихоновича

Уважаемые участники, гости и организаторы школы-конференции молодых ученых “Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий”!

Приветствую вас и поздравляю с началом работы. Перед участниками школы-конференции стоит важная задача по представлению современного состояния интересной и необычной области биологической науки, изучающей явление взаимовыгодного симбиоза растений и микроорганизмов. Школа-конференция, собравшая специалистов по генетике, микробиологии, биологии растений, молекулярной биологии, биоинформатике, системной биологии, является значимым событием для института, поскольку представляет собой мероприятие по обмену знаниями, опытом и идеями, а также по установлению творческих и деловых контактов между различными поколениями ученых: состоявшихся специалистов и студентов, аспирантов и молодых ученых, находящихся в начале своего творческого пути.

Убежден, что проведение школы-конференции по тематике молекулярно-генетических и клеточных аспектов растительно-микробных взаимодействий станет ежегодной традицией, что будет способствовать дальнейшему развитию научных направлений, связей, а также привлечения к науке молодых талантливых специалистов.

Дорогие друзья! Желаю все участникам продуктивной работы, успешного представления своих исследований, а также организации новых полезных совместных работ.

Академик РАН,
научный руководитель
ФГБНУ ВНИИСХМ,
д.б.н., проф.



..... И.А. Тихонович

Программа конференции:

1 декабря (пятница)

- 15:00 - 18:00 Регистрация участников
- 16:00 - 16:10 Открытие конференции.
Приветственное слово
Председателя Оргкомитета
- 16:10 - 17:00 Пленарная лекция 1.
д.б.н., проф. **И.А. Тихонович**
(ФГБНУ ВНИИСХМ / СПбГУ, Санкт-Петербург)
«Интеграция генетических систем растений и
бактерий»
- 17:00 - 17:20 Кофе-брейк
- 17:20 - 18:10 Пленарная лекция 2.
д.б.н. **Топунов А.Ф.** (Институт
биохимии им. А.Н.Баха, Москва)
«Кислородные условия в клубеньке и
взаимодействие симбионтов в
азотфиксирующей системе бобового
растения»
- 18:10 - 18:30 Обсуждение

2 декабря (суббота)

- 11:00 - 11:50 Пленарная лекция 3.
д.б.н. **Вишнякова М.А.** (ВИР, Санкт-Петербург) «Генетическое разнообразие зернобобовых в коллекции ВИР как исходный материал для симбиотической селекции»
- 11:50 - 12:40 Пленарная лекция 4.
д.б.н. **Матвеева Т.В.** (СПбГУ, Санкт-Петербург) «Горизонтальный перенос генов от агробактерий к растениям»
- 12:40 - 13:10 Кофе-брейк
- 13:10 - 14:00 Пленарная лекция 5.
к.б.н. **Фёдорова Е.Э.** (ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, Москва) «Механизмы поддержания внутриклеточной популяции микроорганизмов в симбиозе: мембраны и везикулярный транспорт»
- 14:00 - 15:00 ОБЕД
- 15:00 - 17:00 Доклады молодых ученых
- 17:00 - 17:30 Кофе-брейк
- 17:30 - 18:20 Пленарная лекция 6.
д.б.н. **Хлёсткина Е.К.** (ИЦиГ, Новосибирск) «Значение флавоноидных соединений растений и генетическая регуляция их биосинтеза»

18:20 - 18:30 Подведение итогов 1 дня
конференции

3 декабря (воскресенье)

- 11:00 - 11:50 Пленарная лекция 7.
к.б.н. **Лapidус А.Л.** (СПбГУ, Санкт-Петербург) «Биоинформатика микробиоты»
- 11:50 - 12:40 Пленарная лекция 8.
к.б.н. **Нижников А.А.** (ФГБНУ ВНИИСХМ / СПбГУ, Санкт-Петербург) «Амилоиды и прионы: патогены или функциональные белковые фибриллы?»
- 12:40 - 13:10 Кофе-брейк
- 13:10 - 14:00 Пленарная лекция 9.
к.б.н. **Дорошков А.В.** (ИЦиГ, Новосибирск) «Методы системной биологии и биоинформатики для решения задач генетики растений»
- 14:00 - 15:00 ОБЕД
- 15:00 - 17:00 Доклады молодых ученых
- 17:00 - 17:30 Кофе-брейк
- 17:30 - 18:20 Пленарная лекция 10.
д.б.н., проф. **Л.А. Лутова** (СПбГУ, Санкт-Петербург) «Роль гормонов в растительно-микробных взаимодействиях»
- 18:20 - 18:30 Закрытие конференции

Доклады молодых ученых:

2 декабря (суббота)

1. **Кулаева О.А.**, Жернаков А.И., Афонин А.М., Сулима А.С., Тихонович И.А., Жуков В.А.

Постгеномные технологии в генетическом анализе сельскохозяйственно-ценных признаков гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

2. **Творогова В.Е.**, Федорова Ю.А., Лутова Л.А.

Участники соматического эмбриогенеза у *Medicago truncatula*

3. **Китаева А.Б.**, Демченко К.Н., Цыганов В.Е.

Организация актинового цитоскелета в клетках клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) и люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.)

4. **Владимиров И.А.**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А.

Агробактериальная трансформация растений *Linaria maroccana* геном *rolC* агробактериального происхождения

5. **Пухальский Я.В.**, Белимов А.А., Шапошников А.И.,

Азарова Т.С., Лоскутов С.И. Воздействие ионов кадмия и кобальта на растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) при моно и полиметаллическом загрязнении

6. **Зорин Е.А.**, Афонин А.М., Жуков В.А.

Альтернативный сплайсинг в азотфиксирующих клубеньках гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

3 декабря (воскресенье)

1. **Ткаченко А.А.**, Предеус А.А., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Исследования агробактериальных опухолей редиса (*Raphanus sativus* L.) методом РНК-секвенирования

2. **Васильева Е.Н.**, Афонин А.М., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Разнообразие культивируемых эндофитных бактерий гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

3. **Белозерова М.Ю.**, Ткаченко А.А., Додуева И.Е., Жуков В.А. Анализ полиморфизма генов, кодирующих СLE-пептиды и их рецепторы, у гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

4. **Сулима А.С.**, Афонин А.А., Жуков В.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Генетические основы специфичности азотфиксирующего симбиоза примитивных "афганских" форм гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

5. **Черкасова М.Е.**, Мунтян В.С., Румянцева М.Л. Геномы *Sinorhizobium meliloti*, контрастно различающиеся по наличию геномных островов: встречаемость в географически отдаленных популяциях

6. **Афонин А.М.**, Масликова Т.И., Сулима А.С., Жуков В.А. Штаммоспецифичность формирования азотфиксирующего симбиоза у Fix⁻мутанта гороха посевного (*Pisum sativum* L.) P61 (sym25)

Тезисы докладов

Штаммоспецифичность формирования азотфиксирующего симбиоза у Fix⁻мутанта гороха посевного (*Pisum sativum* L.) P61 (*sym25*)

Афонин А.М.¹, Масликова Т.И.², Сулима А.С.¹, Жуков В.А.¹

¹ ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская наб. 7-9, 199034, Санкт-Петербург, Россия

AAfonin@ARRIAM.ru

Растения семейства Бобовые обладают способностью формировать симбиотические взаимоотношения с бактериями группы ризобий. Специфичность взаимодействия при формировании симбиозов может зависеть от генотипа как растения-хозяина, так и бактерии. Феномен штаммоспецифичности на данный момент описан для многих модельных и немодельных бобовых растений. У гороха посевного (*Pisum sativum* L.) такая специфичность может проявляться как на этапе распознавания микросимбионта (генотипы гороха, несущие “афганскую” аллель гена *sym2*, демонстрируют повышенную избирательность к структуре сигнальных молекул бактерий), так и на более поздних этапах, при уже сформированных клубеньках. Такой поздней специфичностью отличается мутантная по гену *sym25* линия P61: при взаимодействии со штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 растения образуют преждевременно стареющие клубеньки, однако взаимодействие растений линии P61 со штаммом *Rhizobium leguminosarum* RCAM1026 приводит к образованию эффективных клубеньков. Поскольку на данный момент функция гена *sym25* неизвестна, большой интерес

представляет изучение данного фенотипа для определения круга потенциальных генов-кандидатов.

Задачами данного исследования были: 1) сравнить геном штамма RCAM1026 с геномом штамма 3841, для выделения детерминант, потенциально влияющих на эффективность образующегося симбиоза, 2) провести сравнение транскриптомных профилей микросимбионтов в условиях свободноживущей культуры, в клубеньках растений “дикого типа” и в клубеньках растений мутантной линии P61 (*sym25*), 3) провести сравнение транскриптомных профилей гороха обеих линий при взаимодействии со бактериальными штаммами, 4) провести выделение из природных образцов почв штаммов, способных к супрессии мутации гена *sym25* (т.е. к образованию эффективных клубеньков на корнях растений линии P61 (*sym25*)).

Сравнение геномов показало значительные различия между изученными штаммами. Геном штамма RCAM1026 содержит в своем составе уникальный участок, имеющий высокую степень сходства с последовательностями генов *Sinorhizobium meliloti*, которые потенциально способны принимать участие в симбиозе. Изучение транскриптомных профилей микросимбионтов показало как наличие групп генов, экспрессирующихся сходным образом, так и групп генов, отличных по паттерну экспрессии. Профили экспрессии генов штамма 3841 в неэффективных клубеньках мутанта и эффективных клубеньках “дикого типа” отличались весьма незначительно. Штамм RCAM1026 в мутантных клубеньках по сравнению с клубеньками “дикого типа” продемонстрировал увеличение уровня экспрессии генов, связанных с метаболизмом углеводов, что может указывать на изменения в метаболизме сахаров в клетках клубенька растения-хозяина даже при образовании внешне нормальных клубеньков. Из природных образцов был выделен ряд изолятов, способных к супрессии мутантного фенотипа у линии P61 (*sym25*), в настоящее время проводится их изучение.

Работа поддержана грантом РФ (17-76-30016).

Анализ полиморфизма генов, кодирующих CLE-пептиды и их рецепторы, у гороха посевного

(*Pisum sativum* L.)

**Белозерова М.Ю.¹, Ткаченко А.А.¹, Додуева И.Е.¹,
Жуков В.А.²**

¹ Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская набережная 7–9, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского 3, Санкт-Петербург - Пушкин, Россия

m-kitty@mail.ru

Известно, что эффективность бобово-ризобияльного симбиоза регулируется на разных этапах образования клубеньков, а также зависит от большого числа генов обоих партнеров. Важным моментом является регуляция количества закладываемых клубеньков в зависимости от условий, которая обеспечивается системой авторегуляции клубенькообразования (Autoregulation Of Nodulation, AON). В ее основе лежит механизм подобный системе CLAVATA (CLV), действующей в апикальных меристемах побега и корня, а также в латеральных меристемах. Тем не менее, в работе системы AON многое остается неизученным: так, например, практически ничего неизвестно про «корневую» систему AON, неясно, какие рецепторы и CLE-пептиды в ней задействованы.

Цель нашей работы заключалась в изучении изменчивости растений гороха посевного по генам, кодирующим CLE-пептиды и их рецепторы, которые предположительно участвуют в AON. На первом этапе был проведен биоинформатический поиск последовательностей, которые кодируют CLE-пептиды и их рецепторы у гороха, специфичные для клубеньков. По данным Medicago truncatula Gene Expression Atlas (<https://mtgea.noble.org/v3/>) для некоторых генов люцерны, которые кодируют компоненты систем CLV (3 гена, кодирующих рецепторы, и 10 генов, кодирующих CLE-пептиды), характерен высокий уровень экспрессии в клубеньках. Мы выявили гомологи этих генов у объекта наших исследований – гороха *Pisum*

sativum. Анализ экспрессии этих генов у гороха был проведен с помощью ПЦР в реальном времени; для анализа были использованы интактные корни гороха, а клубеньки разных стадий развития (7, 14, 21 и 28 после инокуляции ризобиями). Для всех проанализированных генов было продемонстрировано многократное повышение уровней экспрессии в клубеньках по сравнению с интактными корнями, что позволяет предположить участие этих генов в контроле развития клубеньков.

В работу по анализу полиморфизма были взяты 2 гена гороха, кодирующих CLE-пептиды (*PsNIC1-like* и *PsCLE12*) и 2 гена, кодирующих рецепторы CLE-пептидов (*PsBAM3* и *PsACR4*). По литературным данным, пептид CLE12 участвует в «побеговой» системе AON у люцерны, пептид NIC1 предположительно участвует в «корневой» у сои. Рецептор *ACR4* у *A. thaliana* и других видов растений является центральным регулятором развития апикальной меристемы корня; предполагаемая функция рецептора *BAM3* в корне арабидопсиса связана с регуляцией развития флоэмы. Мы провели секвенирование генов *PsNIC1-like*, *PsCLE12*, *PsBAM3* и *PsACR4* у 100 линий генетической коллекции гороха, каждый из генов был секвенирован не менее чем у 60 линий; в дальнейшем был проведен сравнительный анализ их последовательностей у разных форм. Интересно, что гены *PsNIC1-like* и *PsCLE12*, кодирующие CLE-пептиды, характеризовались практически идентичными последовательностями у разных линий гороха, тогда как для генов *PsBAM3* и *PsACR4* был выявлен высокий уровень полиморфизма. Так, в кодирующей части гена *PsBAM3* обнаружено 43 переменные позиции; анализ предполагаемого аминокислотного состава полиморфных сайтов показал, что в 25 случаях замена одного основания приводит к замене аминокислоты в лиганд-связывающем или киназном домене белка. Разные варианты изменчивости последовательности *PsBAM3* могут по-разному влиять на функцию пептида; для поиска наиболее значимых для функции участков этого гена мы провели анализ наличия давления отбора на разные варианты последовательности *PsBAM3*.

В дальнейшем мы планируем проанализировать корреляции выявленных аминокислотных замен в рецепторах *PsBAM3* и *PsACR4* с симбиотической эффективностью различных линий гороха.

Работа была поддержана грантом РФФИ 15-29-02737.

Разнообразие культивируемых эндофитных бактерий гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

**Васильева Е.Н.^{1,2}, Афонин А.М.¹, Ахтемова Г.А.¹,
Жуков В.А.¹, Борисов А.Ю.¹, Тихонович И.А.^{1,2}**

¹ ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская наб. 7-9, 199034, Санкт-Петербург, Россия

grayman616@gmail.com

Растения семейства Бобовые (*Fabaceae*) взаимодействуют с разнообразными группами полезных микроорганизмов, образуя три типа мутуалистических симбиозов: 1) азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями, 2) симбиоз с грибами арбускулярной микоризы, и 3) широкий спектр ассоциативных симбиозов с различными бактериями из группы PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*). Современные технологии генетики и микробиологии позволяют исследовать организмы (грибы, бактерии, водоросли), населяющие межклеточное пространство растений и не вызывающие негативных последствий для них, выступая, таким образом, в роли эндосимбионтов. Особый интерес представляют так называемые эндофитные бактерии, которые способны положительно влиять на рост и развитие растительного организма за счет улучшения его снабжения необходимыми питательными веществами (в т.ч. витаминами) и модулирования уровня гормонов, повышая иммунитет растения и резистентность к патогенам. В настоящее время всего несколько видов растений достаточно полно изучены в отношении содержания в них бактерий-эндофитов.

Цель данной работы: изучить состав и разнообразие бактериальных эндофитов различных генотипов гороха посевного (*Pisum sativum* L.).

Для эксперимента были выбраны три генотипа гороха посевного: К-8274 – высокоэффективный, К-3358 – низкоэффективный при взаимодействии с полезной почвенной микрофлорой, а также коммерческий селекционный сорт

«Триумф», созданный на базе ФГБНУ ВНИИЗБК и являющийся потомком К-8274, унаследовавшим признак «высокой эффективности». Растения были выращены в вегетационных условиях, на сроке 4 недели из них выделили эндофиты, а с поверхности тканей - эпифитные бактерии. Затем проводили трехступенчатую поверхностную стерилизацию спиртом и гипохлоритом натрия и выделяли эндофитные бактерии из стеблей и листьев растений гороха. Бактерии выделяли на твердых питательных средах: TSA, 1/20 TSA (триптон- соевый агар) и № 79 (селективная среда для выделения симбиотических бактерий из семейства *Rhizobiaceae*). Таксономическую принадлежность выделенных штаммов определяли с помощью секвенирования диагностического фрагмента V3-V12 гена 16S рРНК. Выделение бактериальной ДНК проводилось по модифицированному фенол-хлороформному протоколу.

Всего было выделено 236 морфологически различных культивируемых штаммов бактерий (121 штамм эндофитов и 115 штаммов эпифитов). Обнаружено, что во всех генотипах гороха присутствуют бактерии из рода *Bacillus*. В листьях растений гороха генотипа К-8274 выявлены бактерии из родов *Serratia*, *Rahnella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus* (причем доминируют бактерии из рода *Serratia* и *Bacillus*), в стеблях - *Bacillus*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum* и *Rahnella*. Эндосфера стеблей генотипа К-3358 населена бактериями из родов *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Luteibacter* и *Enterobacter* с доминированием вида *Rahnella aquatilis*. Из листьев выделены бактерии из родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*. Стебли гороха сорта «Триумф» населяют эндофитные бактерии из родов *Serratia*, *Staphylococcus*, *Rahnella*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, а листья - эндофиты родов *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Rahnella*, *Pseudomonas* и *Bacillus*.

В результате работы описаны культивируемые бактерии, входящие в состав микробного сообщества (микробиома) растений гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Наблюдаемые различия в составе бактериального эндофитного сообщества у исследованных генотипов гороха могут отражать влияние генетического фона растения, в том числе проявление признака высокой симбиотической эффективности.

Работа поддержана РФФИ 16-04-01859_а, РФФИ 16-16-00118 и Советом по грантам Президента РФ НШ-6759.2016.4.

Агробактериальная трансформация растений *Linaria maroccana* геном *roIC* агробактериального происхождения

Владимиров И.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А

Лаборатория генной и клеточной инженерии растений, СПбГУ. Санкт-Петербург, Россия.

ivanpentod@gmail.com

Растения рода *Linaria* представляют научный интерес благодаря наличию природно-трансгенных форм, содержащих в геноме набор генов агробактериального происхождения (т.н. клТ-ДНК). В то же время, часть видов, в том числе и *Linaria maroccana*, не содержат клТ-ДНК, что позволяет использовать их как модельные объекты для изучения действия отдельных генов, полученных растениями от агробактерий, путем трансформации *L.maroccana* генами клТ-ДНК из других видов льнянок. Такие эксперименты могут быть использованы для изучения текущего состояния и функции агробактериальных генов в растительных геномах, а также их возможной эволюционной роли. Очевидно, что важнейшую роль в решении данной задачи должны играть генно-инженерные методы. Многие аспекты функционирования агробактериальных генов в растении невозможно оценить *in vitro*, что приводит к необходимости разработать помимо метода трансформации ещё и метод адаптации трансформированных растений к нестерильным условиям и метод их высадки в почву.

Основной проблемой генно-инженерной работы с марокканской льнянкой является практически полное отсутствие каких-либо протоколов не только по трансформации, но и по культивированию *in vitro*. Описаны для *L.maroccana* методики, основанные на трансформации с помощью *Agrobacterium rhizogenes* и изолированном выращивании получаемого при этом «бородатого корня». К сожалению, они абсолютно неприменимы для изучения генов Т-ДНК, так как при этом в геном растения помимо изучаемого гена Т-ДНК переносится цельная интактная Т-ДНК трансформирующего штамма. Ближайший родственник *L.maroccana*, для которого в литературе описаны методы агробактериальной трансформации – львиный зев *Antirrhinum*

majus, Описанные методы сложны, трудоемки, их применимость для *L.maroccana* не гарантируется.

Таким образом, в задачи нашего исследования входила разработка метода получения трансгенных растений *L.maroccana*, и их адаптации к нестерильным условиям и высадке в почву.

Работу начали с введения растений *L.maroccana* в культуру *in vitro* и оптимизации состава питательной среды, которая потребовалась из-за наличия неприемлемых морфологических отклонений (обводнение, аномальный рост корней) у растений, выращиваемых на стандартной среде Мурасиге-Скуга (MS). Испытали пять вариантов сред, отличающихся содержанием агара, питательных компонентов, наличием или отсутствием сахарозы. Выяснили, что наибольшее влияние на нормальность морфологии оказывает плотность среды, регулируемая концентрацией агара (оптимум – 16 г/л). Даже двукратные изменения концентрации остальных компонентов среды не оказывают на морфологию растений существенного влияния. Для *L.maroccana* критично наличие сахарозы в среде – на средах без сахарозы растения демонстрируют почти полностью подавленный рост или погибают.

С целью подбора рабочей концентрации глюкосината аммония (НПК «БЛОК-1») растения дикого типа высаживали в чашки Петри на среду с добавлением данного селективного агента в разных концентрациях от 0,5 до 10 мг/л (по 20 растений на каждую испытанную концентрацию). Оказалось, что процент выживших растений начинает падать с концентрации 2,5 мг/л, и при 3 мг/л уже равен нулю, однако одиночные выжившие растения периодически попадались вплоть до 8 мг/л. Ввиду неизбежной химерности получаемых при трансформации побегов (наличия нетрансгенных тканей) приняли решение использовать концентрацию 4 мг/л.

Трансформацию растений выполняли с помощью штамма *A.tumefaciens* ЕНА105, несущего плазмиду рВ7WG2D со встроенным геном *rolC* из *L.vulgaris* под промотором р35S. Трансформировали верхушечные и пазушные почки методом прищипывания почек пинцетом, смоченным в суспензии агробактерий. Через месяц побеги, развивающиеся из почек, высаживали на селективную среду с рабочей концентрацией глюкосината аммония. Агробактериальной трансформации подвергли 600 эксплантов, с которых получили 1470 побегов. На

этапе селекции на среде с глюфосинатом (4 мг/л) выжило и укоренилось 12 побегов, однако у восьми растений все полученные от них черенки погибли при первой пересадке на свежую среду с глюфосинатом. У четырех растений, которые выживали при пересадке на свежую среду, отобрали фрагменты и выделили из них ДНК.

Проверку выживших на селективной среде побегов производили с помощью ПЦР-РВ. с тест-системой на ген *bar* (ген устойчивости к глюфосинату из плазмиды pB7WG2D), Проверку отсутствия в тканях растений выживших агробактерий (для исключения ложноположительного срабатывания основной тест-системы на ген *bar* в составе бактериального, а не растительного генома) производили с помощью тест-системы на ген *virD2*. Тест-система *virD2* не сработала на ДНК всех четырех растений, что говорит об отсутствии живых агробактерий или их плазмидной ДНК в тканях растений (работоспособность самой тест-системы подтверждена положительным результатом при постановке ПЦР на ДНК из штамма *A.tumefaciens* ЕНА105). Проверка растительной ДНК тест-системой на ген *bar* показала наличие данного гена, и, соответственно, наличие вставки трансгена, у двух из них. В отрицательном контроле (без ДНК) также наблюдали отрицательный результат.

Для адаптации растений к нестерильным условиям использовали контейнеры из минерального стекла размером 150x150x200 мм. Внутрь насыпали почвогрунт, в нем формировали углубление, заполненное песком, в которое высаживали растение. Каждый день проводили адаптацию к пониженной влажности путем снятия крышки с контейнеров. Постепенно время проветривания увеличивали. Всего высажено 29 трансформантов (прижилось 4 растения), и 21 растение дикого типа (прижилось 14 растений).

С целью изучения фертильности растений проводили их высадку в открытый грунт. Все шесть высаженных в открытый грунт растений зацвели и дали всхожие семена.

Таким образом, разработан метод агробактериальной трансформации растений *L.maroccana*, что позволяет проводить работы по генной инженерии данного объекта.

Альтернативный сплайсинг в азотфиксирующих клубеньках гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

Зорин Е.А., Афонин А.М., Жуков В.А.

ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

kjokkjok8@gmail.com

Альтернативный сплайсинг позволяет отдельному гену повышать его кодирующую способность посредством выработки нескольких структурно различающихся изоформ. Хотя функциональная важность альтернативного сплайсинга была продемонстрирована в ходе различных исследований процессов развития, дифференциации и заболеваний на многоклеточных системах, о его функции у высших растений известно по-прежнему мало [Baek et al., 2008]. Ещё меньше известно об альтернативном сплайсинге у немодельных организмов. Однако проводимые исследования демонстрируют важность событий альтернативного сплайсинга для растений, в частности, для функционирования симбиотических клубеньков бобовых.

Мы поставили перед собой цель идентифицировать и охарактеризовать клубенёк-специфичные сплайс-варианты генов гороха. В качестве транскриптомных сборок для анализа использовались: SGE “Nodules”, SGE “Root tips” [Zhukov et al, 2015], PsUniHighCopy и PsUniLowCopy (транскриптом тканей гороха, не включающий клубеньки) [Alves Carvalho et al., 2016].

Посредством утилиты “Exonerate” было выявлено 2385 специфичных для клубеньков изоформ. Среди них 535 имели как минимум один сохранённый, невырезанный, интрон в своей структуре, в остальных 1850 последовательностях были вырезаны интроны, в отличие от транскриптов, представленных в корнях и прочих тканях растения. 535 изоформ с «intron retention» приходится на 390 генов, из которых 97 были аннотированы посредством базы данных «EggNog». В частности, среди них были обнаружены гены, кодирующие рецепторные серин-треониновые киназы, кальмодулин-связывающие белки, кальциевые мембранные АТФ-азы,

кальций-кальмодулин-зависимые протеин-киназы, а также защитные белки.

В рамках дальнейшей работы планируется продолжить *in silico* анализ альтернативного сплайсинга в симбиотических клубеньках гороха посевного с последующей проверкой экспрессии обнаруженных изоформ методом ПЦР в реальном времени.

Работа поддержана грантом РФФИ (17-76-30016).

1. Alves-Carvalho S., Aubert G., Carrère S., Cruaud C., Brochot A.L., et al. Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species // *Plant J.*, 2015, V. 84, N. 1. P. 1-19.

2. Baek J.M., Han P., Iandolo A., Cook D.R. Characterization and comparison of intron structure and alternative splicing between *Medicago truncatula*, *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis* and rice // *Plant Mol. Biol.*, 2008, V. 67, N. 5. P. 499-510.

3. Zhukov V.A., Zhernakov A.I., Kulaeva O.A., Ershov N.I., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. *De Novo* Assembly of the Pea (*Pisum sativum* L.) Nodule Transcriptome // *Int. J. Genomics.*, 2015, V. 2015, article 695947.

Организация актинового цитоскелета в клетках клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) и люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.)

**Кутаева А.Б.¹, Кусакин П.Г.¹, Демченко К.Н.^{1,2},
Цыганов В.Е.¹**

¹ ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

² ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, 197376, ул. проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, Россия

anykitaeva@gmail.ru

Цитоскелет играет важную роль в функционировании клетки. Тем не менее, существует ограниченное количество данных об изменениях в организации актинового и тубулинового цитоскелета в процессе дифференцировки клеток симбиотического клубенька. Так, ранее нами было показано, что тубулиновый цитоскелет участвует в росте инфекционной нити, формировании инфекционной капли, выходе бактерий в цитоплазму растительной клетки, а также ориентации бактериоидов при развитии клубеньков двух бобовых растений: важной сельскохозяйственной культуры – гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и модельного растения – люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.).

В данном исследовании с использованием методов иммулокализации и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии нами была изучена организация актинового цитоскелета в симбиотических клубеньках дикого типа и мутантов, формирующих неэффективные клубеньки, у гороха и люцерны слабоусеченной. Были использованы линии дикого типа люцерны A17 и гороха SGE и, полученные на их основе линии с мутациями в ортологичных генах: TR3 (*ipd3*) и SGEFix⁻² (*sym33*), характеризующиеся отсутствием выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки, *efd-1* и SGEFix⁻¹ (*sym40*), формирующие гипертрофированные инфекционные капли.

В ходе проведенного анализа не было выявлено различий в организации актинового цитоскелета у изученных видов бобовых растений. Также было показано, что проанализированные мутации не влияли на организацию актинового цитоскелета. Тем не менее, их использование позволило изучить взаимное расположение актиновых микрофиламентов и симбиотических структур более детально, поскольку данные мутанты характеризуются гипертрофированным развитием инфекционных нитей и капель. Показано, что плотная сеть утолщенных актиновых микрофиламентов окружает ядро во всех типах клеток клубеньков гороха и люцерны, при этом она соединяет ядро с периферией клетки. Сходной сетью микрофиламентов окружена вакуоль. Утолщенные кортикальные актиновые микрофиламенты формируют густую сеть в неинфицированных и колонизированных (содержащих инфекционные структуры – инфекционные нити и капли) клетках клубенька. Утолщенные эндоплазматические филаменты проходят вдоль инфекционных нитей и окружают инфекционные капли. В инфицированных клетках после выхода бактерий в цитоплазму происходит реорганизация актинового цитоскелета. Развивается сеть тонких и коротких эндоплазматических микрофиламентов между бактериоидами. Утолщенные кортикальные микрофиламенты заменяются на тонкие. Таким образом, показано, что дифференцировка клеток симбиотического клубенька сопровождается реорганизацией актинового цитоскелета.

Работа поддержана РФ 16-16-10035.

Постгеномные технологии в генетическом анализе сельскохозяйственно-ценных признаков гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

**Кулаева О.А.¹, Жернаков А.И.¹, Афонин А.М.¹,
Сулима А.С.¹, Тихонович И.А.^{1,2}, Жуков В.А.¹**

¹ ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская наб. 7-9, 199034, Санкт-Петербург, Россия

OKulaeva@ARRIAM.ru

Активно развивающиеся в настоящее время технологии секвенирования следующего поколения повсеместно применяются как для молекулярно-генетических, так и для сельскохозяйственных и экологических исследований. Разработанные алгоритмы анализа чаще всего адаптированы для объектов, геном которых расшифрован. Тем не менее, в отношении немодельных объектов (секвенирование генома, которых часто затруднено), имеющих большую значимость для сельского хозяйства или медицины, возможно применение постгеномных технологий, а именно транскриптомики, протеомики, метаболомики и др. Одним из представителей немодельных бобовых растений является горох посевной (*Pisum sativum* L.), используемый в качестве ценной сельскохозяйственной культуры во многих странах мира, включая Российскую Федерацию. К настоящему моменту с использованием анализа транскриптомов гороха посевного проведен ряд исследований, касающихся дифференциальной экспрессии генов, картирования генов и локусов количественных признаков, анализа внутривидового полиморфизма и пр.

В течение последних пяти лет с использованием технологий секвенирования следующего поколения было разработано и нанесено на генетическую карту большое количество молекулярных маркеров гороха. Однако использование полного набора разработанных маркеров

затруднено, так как соотнесение данных, полученных различными исследователями, является трудоемкой процедурой. С целью объединения информации о маркерах гороха в удобный для использования «инструмент» была создана база данных PMD (Pea Marker Database, www.peamarker.arriam.ru), содержащая информацию о 15944 маркерах, в том числе о локализации маркеров в группах сцепления, последовательности транскриптов, а также информация о гомологичных последовательностях *M. truncatula*, профилях экспрессии соответствующих транскриптов, представленных в экспрессионных атласах *M. truncatula* и *P. sativum*.

Работа была поддержана РФФИ (грант 16-34-60132_мол_а_дк).

Воздействие ионов кадмия и кобальта на растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) при моно- и полиметаллическом загрязнении

**Пухальский Я.В., Шапошников А.И., Азарова Т.С.,
Лоскутов С.И., Белимов А.А.**

ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

jankiss88@gmail.com

Во многих случаях, загрязнение поверхностного слоя с/х земель тяжелыми металлами (ТМ) отличается полиметаллическим характером. Особенности поведения ТМ в почвах и их миграция в растительные организмы является важным показателем прогнозирования химико-токсикологической обстановки в системе защитных мероприятий для получения экологически чистой продукции. Поведение ТМ зависит от физико-химических свойств исследуемой почвы, биологических особенностей выращиваемых на ней растений и подвижности самих токсичных элементов.

Для ряда ТМ в почве установлены предельно допустимые концентрации (ПДК), при превышении которых происходит нарушение жизнедеятельности или гибель растительного организма. Показатели ПДК также зависят от экологических факторов внешней среды. В настоящее время, сведения о связи сорбции ТМ разными типами почв в зависимости от содержания в них органоминеральной части, аккумуляции ТМ в органах растений и смене микробиологических сукцессий в динамике онтогенеза весьма противоречивы. Для изучения этих процессов при загрязнении необходимо учитывать и форму анионов, влияющих на адсорбцию металлов и описанных уравнениями Ленгмюра, Фрейндлиха или Генри. Например, высокая концентрация хлоридов увеличивает биодоступность кадмия и цинка в почвенно-поглощающем комплексе. Зернобобовые культуры благодаря своим биологическим особенностям в симбиозе с клубеньковыми бактериями улучшают плодородие

с/х земель и представляют интересный объект для изучения их возделывания в севооборотах.

В летний период нами были проведены тепличные опыты на залежной дерново-подзолистой почве. В качестве растительного объекта была выбрана лабораторная линия гороха посевного (*Pisum sativum* L.) SGE и полученный на её основе мутант SGEcdt, характеризующийся повышенной устойчивостью к кадмию и кобальту, однако чувствительный к ртути. Металлы вносили в виде растворов солей в концентрациях: 15 мг $\text{CdCl}_2/\text{кг}$ и/или 50 мг $\text{CoSO}_4/\text{кг}$. Контролем служили сосуды с растениями без металлов. При совместном внесении металлов аддитивного негативного эффекта на рост растений не наблюдалось. Содержание кадмия в растениях обоих генотипов повышалось в присутствии токсичной концентрации кобальта. Напротив, содержание кобальта в растениях снижалось при внесении кадмия в почву. Похожий результат наблюдался и при интродукции микроорганизмов в почву. Это указывало на взаимодействие металлов в ризосфере по типу антагонизма, при конкуренции их друг с другом за ионообменные центры.

Проведения дальнейших опытов при моно- и полиэлементном загрязнении ТМ разных типов почв, в широком диапазоне их токсичных концентраций и в условиях разной региональной зональности, позволит создать модель, описывающую влияние физиологической и биогеохимической составляющих в биогеоценозе растений на аккумуляцию ТМ в растительных тканях на этапах онтогенеза и лучше понять поведение металлов в сорбционных и ионообменных процессах.

Работа проводилась в рамках проекта Минобрнауки (ГК № 16.512.11.2162) а также при содействии гранта РНФ 14-16-00137.

Генетические основы специфичности азотфиксирующего симбиоза примитивных "афганских" форм гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

Сулима А.С.¹, Афонин А.А.¹, Жуков В.А.¹,
Борисов А.Ю.¹, Тихонович И.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская наб. 7-9, 199034, Санкт-Петербург, Россия

sulan555@mail.ru

Установление симбиоза между бобовыми растениями (Fabaceae) и почвенными азотфиксирующими бактериями (ризобиями) представляет собой сложный последовательный процесс. На первом этапе происходит взаимное распознавание симбиотических партнёров в ходе т.н. «молекулярного диалога» – бактерия выделяет сигнальную молекулу (Nod-фактор) особой структуры, которая воспринимается растительными рецептороподобными Lys-M киназами (LysM-RLK). У люцерны слабоусечённой (*Medicago truncatula* Gaertn.), модельного бобового растения, описаны две основные симбиотические LysM-RLK, одна из которых (NFP) воспринимает Nod-фактор в низких концентрациях, а вторая (LYK3) различает нюансы его структуры, позволяя растению узнавать наиболее подходящих симбионтов. В то же время у гороха посевного (*Pisum sativum* L.) система распознавания ризобий может быть сложнее, чем у люцерны; в частности, на данный момент у гороха описано два ортолога гена LYK3, вовлечённых в симбиоз: *Sym37* и *K1*. Кроме того, с 30-х годов прошлого столетия известны т.н. «афганские» формы гороха, произрастающие в Передней Азии. Эти формы характеризуются повышенной избирательностью к ризобиям, которая проявляется в неспособности взаимодействовать с большинством штаммов, выделенных из почв Европы. Заражать «афганский» горох могут только ризобии с двойным

ацетилированием Nod-фактора, обусловленным наличием у них гена *nodX*. За проявление данного признака отвечает растительный ген *Sym2*, который предположительно кодирует симбиотическую LysM-RLK, но до настоящего времени остаётся практически неизученным.

Данная работа посвящена неизвестному ранее гену LysM-RLK гороха, названному авторами *LykX*. Анализ последовательности *LykX* на большой выборке генотипов гороха позволил установить высокую полиморфность данного гена, а также выявить аллельные состояния, чётко коррелирующие с проявлением “афганской” специфичности симбиоза (Sulima et al., 2017). В дальнейшем анализ мутантов по гену *LykX* подтвердил его участие в симбиозе. Таким образом, согласно имеющимся данным, ген *LykX* является наиболее вероятным кандидатом на роль гена *Sym2*, определяющего уникальную специфичность симбиоза у примитивных “афганских” форм гороха.

Работа поддержана РНФ 16-16-00118.

1. Sulima A.S., Zhukov V.A., Afonin A.M., Zhermakov A.I., Tikhonovich I.A., Lutova L.A. Selection Signatures in the First Exon of Paralogous Receptor Kinase Genes from the *Sym2* Region of the *Pisum sativum* L. Genome // Front. Plant Sci., 2017 [in press]. doi.org/10.3389/fpls.2017.01957

Участники соматического эмбриогенеза у *Medicago truncatula*

Творогова В.Е., Федорова Ю.А., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский Государственный университет, кафедра Генетики и Биотехнологии, Университетская наб. 7-9, 199034, Санкт-Петербург, Россия

krubaza@mail.ru

Соматический эмбриогенез - это развитие эмбрионоподобных структур из соматических тканей растений. Соматический эмбриогенез *in vitro* широко используется в биотехнологии в частности, для агробактериальной трансформации. Тем не менее, остается множество видов растений, для которых получение соматических эмбрионов или их дальнейшая регенерация на сегодняшний день невозможны, что ставит серьезные препятствия на пути их агробактериальной трансформации. В связи с этим, поиск новых стимуляторов соматического эмбриогенеза может быть полезен в биотехнологии. В нашем исследовании мы показали, что ген, кодирующий транскрипционный фактор MtWOX9-1 у модельного объекта *Medicago truncatula*, является участником соматического эмбриогенеза, а его сверхэкспрессия ведет к значительному увеличению эмбриогенности растительных эксплантов и к изменениям уровней экспрессии ряда генов, ассоциированных с соматическим эмбриогенезом.

Известно, что экспрессия генов семейства *WOX* может регулироваться с помощью пептидных гормонов семейства *CLE* с помощью систем положительной или отрицательной обратной связи. В нашей работе мы выявили предполагаемые мишени фактора MtWOX9-1 среди генов семейства *CLE*. Пептиды, кодируемые этими генами, являются кандидатами на роль стимуляторов соматического эмбриогенеза.

Исследование агробактериальных опухолей редиса (*Raphanus sativus* L.) методом РНК-секвенирования

**Ткаченко А.А.¹, Предеус А.В.², Додуева И.Е.¹,
Лутова Л.А.¹**

¹ Лаборатория геномной и клеточной инженерии растений, Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия

² Институт биоинформатики, Кантемировская улица. 2а, Санкт-Петербург, Россия

castorfiber@list.ru

Редис (*Raphanus sativus* L.) является культурным растением, обладающим большим экономическим значением и выращиваемым по всему миру. Будучи эволюционно близким видом к модельному растению, *Arabidopsis thaliana*, редис представляет собой интересную модель для изучения процессов развития растений, таких как формирование меристем. Настоящее исследование направлено на изучение ранних процессов в развитии агробактериальных опухолей и, в особенности, процессов формирования новых меристем.

В качестве источника растительного материала мы использовали коллекцию инбредных линий редиса, созданную на кафедре Генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета. Для изучения процессов, происходящих в агробактериальных опухолях на ранних этапах, растения были инокулированы штаммом C58 *Agrobacterium tumefaciens*. РНК из образцов зараженных растительных тканей и незараженного контроля секвенировали с использованием технологии Illumina. Всего было получено 146.3 миллионов 2x100п.н. прочтений. Данные секвенирования использовали для сборки транскриптомов при помощи различных программных пакетов (Trinity, Stringtie). Полученные наборы транскриптов оценивали при помощи программ BUSCO и Transrate. С использованием наилучшей сборки транскриптома был

проведен анализ дифференциальной экспрессии генов между зараженными и незараженными образцами тканей редиса при помощи программ kallisto и sleuth. Всего было обнаружено 760 генов, экспрессия которых повышается в агробактериальных опухолях через 6 дней после заражения, и 908 генов, чья экспрессия понижается. Среди генов, которые активнее экспрессируются в тканях, подвергнутых воздействию агробактерий, мы обнаружили гены, участвующие в сигналинге цитокинина, WOX-CLV системах, регуляции образования меристем такие, как *CLE25*, *KNAT4*, *RR3*, *APRR2*, *AGL17*, что позволяет сделать вывод о вовлеченности этих сигнальных механизмов в закладку агробактериальной опухоли у редиса.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-16-10011.

Геномы *Sinorhizobium meliloti*, контрастно различающиеся по наличию геномных островов: встречаемость в географически отдаленных популяциях

Черкасова М.Е., Мунтян В.С., Румянцева М.Л.

ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

mariacherkasova@mail.ru

Проведен сравнительный анализ геномов референтных штаммов *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 и СХМ1-105, стрептомицин-устойчивых мутантов производственных штаммов SU47 и 425а, соответственно. Геном Rm1021 содержит геномные острова в структуре хромосомы (далее I тип генома), тогда как геном СХМ1-105, а также 425а не имеет островов (далее II тип генома) [1]. Представляло интерес оценить встречаемость геномов I-го или II-го типов в природных популяциях из географически удаленных центров происхождения культурных растений (генцентров), а также с территории, подверженной экстремальному засолению. Это два района Приаралья: ПАГ-1 и ПАГ-2, расположенные на расстоянии 50 и более 500 км от современного берега Аральского моря, подверженные экстремальному засолению. При этом ПАГ-2 относится к современному центру интрагрессивной гибридизации люцерны, располагающемуся в предгорье Мугоджары на севере Казахстана [2]. Третий район – это южные районы Узбекистана, входящие в состав Среднеазиатского генцентра (САГ), сыгравшего важную роль в формировании и распространении тетраплоидных видов люцерны [3]. Алматинская область Казахстана, примыкающая к этому району, является географическим местом происхождения штамма 425а. Четвёртый район – это территория Северного Кавказа (СКГ), относящаяся к Переднеазиатскому центру происхождения культурных растений (генцентру), который сыграл ведущую роль в формировании культурной диплоидной люцерны. Было изучено распространение островов в геномах 400 природных штаммов клубеньковых бактерий люцерны вида

S. meliloti, с использованием системы детекции островов, основанной на методе ПЦР [4].

Установлено, что природные штаммы *S. meliloti*, выделенные в САГ, имели I тип генома, встречавшийся с частотой 0,72. Штаммы из СКГ, а также из ПАГ-2 преимущественно имели тот же тип генома, частоты встречаемости которого были сходными, но более низкими (0,54), чем в САГ. II тип генома (нет островов), преобладал только у штаммов, выделенных в ПАГ-1 (частота 0,62). Различия между выборками штаммов из САГ, в котором доминировали штаммы, имевшие I-ый тип генома, и из ПАГ-1, где преобладали штаммы с II-ым типом генома, были достоверны согласно критерию χ^2 при $P < 0,05$.

На основе полученных данных предсказано распространение разных типов геномов *S. meliloti* на территориях 3-х изученных генцентров и показано, что штаммы, выделенные с территории Среднеазиатского генцентра, преимущественно имели геномные острова, тогда как на в примыкающих к нему северных территориях, подверженных экстремальному засолению, штаммы достоверно чаще не имели геномных островов. Сделан вывод, что геномы штаммов-микросимбионтов из Среднеазиатского генцентра – первичного центра происхождения бобовых, насыщены акцессорными элементами, которые могут утрачиваться под влиянием абиотических стресс-факторов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 17-16-01095.

1. Румянцева М.Л., Мунтян В.С., Черкасова М.Е., Саксаганская А.С., Андронов Е.Е., Симаров Б.В. Геномные острова *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 – азотфиксирующего симбионта люцерны // Генетика. 2017. [в печати].

2. Иванов А.И. Люцерна. М: Колос, 1980.

3. Румянцева М.Л. Генетические ресурсы клубеньковых бактерий // Генетика. 2009. Т. 45. №9. С: 1157-1172.

4. Мунтян В.С., Черкасова М.Е., Андронов Е.Е., Симаров Б.В., Румянцева М.Л. Встречаемость островов в геномах природных штаммов *Sinorhizobium meliloti* // Генетика. 2016. Т. 52. №10. С: 1126-1133.

ПЛЕНАРНАЯ ЛЕКЦИЯ

Амилоиды и прионы: патогены или функциональные белковые фибриллы?

**Антонец К.С.^{1,2}, Кливер С.Ф.^{1,2}, Косолапова А.О.^{1,2},
Белоусов М.В.^{1,2}, Белоусова М.Е.¹, Штарк О.Ю.²,
Васильева Е.Н.^{1,2}, Нижников А.А.^{1,2}**

¹ ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская наб. 7-9, 199034, Санкт-Петербург, Россия

ant.nizhnikov@gmail.com

УДК: 577.112.7, 577.112.5, 577.322.4

Амилоидами называют белковые фибриллы с особой пространственной структурой, которая придает им уникальные физико-химические характеристики. Прионы – это амилоиды, обладающие инфекционными свойствами. Амилоиды были открыты еще в середине XIX века, но долгое время оставались известны исключительно как патогены, вызывающие десятки неизлечимых болезней человека и животных, число которых в настоящее время превысило 40. В 2000 году были описаны первые функциональные амилоиды, необходимые для нормального существования организмов. Позднее они были выявлены во всех трех доменах живого мира: у архей, бактерий и эукариот, включая человека.

Наибольшего разнообразия функциональные амилоидные белки достигают у бактерий, у которых к настоящему моменту идентифицировано более 10 групп белков, формирующих амилоиды. Значительная часть этих белков ассоциирована с вирулентностью бактерий, то есть их способностью заражать организм-хозяин. Порядок *Rhizobiales* класса альфа-протеобактерии весьма интересен тем, что включает в себя как бактерии-патогены растений и животных, так и симбионты

растений. Мы провели анализ связи функций белков с наличием у них амилоидогенных участков в протеомах приблизительно 90 видов *Rhizobiales*. Полученные нами данные показывают, что амилоидогенные свойства белков этих бактерий на протеомном уровне ассоциированы как с вирулентностью (в случае патогенных видов), так и с функциональными группами белков, вовлеченных в симбиоз. Таким образом, амилоидные белки могут играть важную роль в растительно-микробных взаимодействиях.

Наиболее малоизученной группой организмов в области биологии амилоидов остаются растения, у которых ни для одного белка не были показаны амилоидные свойства *in vivo* и без сверхпродукции [1]. Проведенный нами системный биоинформатический анализ у всех видов растений с аннотированными протеомами, в ходе которого было проанализировано около 3 миллионов белков, показал, что одной из наиболее обогащенных амилоидогенными участками групп белков являются запасные белки семян растений [2], которые представляют собой важнейший элемент питания человека. Экспериментальные данные, полученные нами при помощи недавно разработанных протеомных подходов, подтвердили связь запасных белков семян с амилоидогенезом.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант №17-16-01100.

1. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Amyloids and prions in plants: facts and perspectives // *Prion*, 2017, V.11, P.300-312.

2. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants // *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, V.18, e2155.

ПЛЕНАРНАЯ ЛЕКЦИЯ

Механизмы поддержания внутриклеточной популяции микроорганизмов в симбиозе: мембраны и везикулярный транспорт

Федорова Е.Э.

Институт физиологии растений им.К.А Тимирязева РАН, Москва, Россия

elenafedorova06@mail.ru

Объем и поверхность клетки-хозяина и микросимбионта резко меняются при развитии симбиоза. Ризобии находятся внутри ассиметричных впячиваний цитоплазматической мембраны, таким образом, микросимбионт всегда отделен от цитоплазмы клетки-хозяина. Поверхность интерфазной мембраны между бактерией и клеткой-хозяином многократно превышает поверхность цитоплазматической мембраны. Поскольку цитоплазматическая мембрана обладает низкой упругостью и не способна к растяжению, то увеличение ее поверхности полностью зависит от экзоцитоза. При этом рост симбиотических структур в инфицированных клетках является анизодиаметрическим для инфекционных нитей и изодиаметрическим для симбиосом, что указывает на отсутствие зависимости таргетинга от типа роста симбиотического мембранного образования. Мы показали, что вектором в процессе роста симбиотической мембраны является растяжение/повреждение мембраны вокруг растущих инфекционных нитей и симбиосом, а сигнальным механизмом - локальное изменение содержания Ca^{2+} , что было подтверждено локализацией кальциевого сенсора синаптотагмина (Gavrin et al., 2017). Эти мембранные участки представляют собой функциональные мембранные субкомпарменты, где происходит слияние мембранных везикул, при этом происходит и ретаргетинг белков, отвечающих за слияние мембран в процессе экзоцитоза, таких как малые GTPазы семейства Rab и SNARE-

белки SYP132, VAMP 721 к этим участкам интерфазной мембраны с увеличением ее поверхности (Ivanov et al., 2012, Gavrin et al., 2015).

Популяция симбиосом в процессе пролиферации и развития значительно увеличивается, что в условиях ограниченного объема вызывает изменение архитектуры инфицированной клетки. Одним из явных свидетельств такого изменения является сегментация и уменьшение объема вакуоли. При этом происходит ингибирование экспрессии белков вакуолярного комплекса HOPS, которые участвуют в слиянии поздних эндосом и молодых вакуолей, дефункционализация вакуолей, которые теряют кислый pH, и ретаргетинг функциональных белков, таких как вакуолярный аквапорин TIP1 (Gavrin et al., 2014). В процессе созревания симбиосом на симбиотической мембране появляются белки поздних эндосом и тонопласта: Rab7, VTI11, SYP22, а у симбиосом в терминальной стадии лизиса - белки вакуолярного комплекса HOPS, что позволяет клетке-хозяину превратить их в прото-вакуоли и лизировать (Limpens et al., 2009, Ivanov et al., 2012, Gavrin et al., 2014).

Таким образом, адаптация эндомембранной системы клетки-хозяина к поддержанию популяции внутриклеточных бактерий представляет собой интегральную часть симбиотических отношений и обеспечивает условия для биологической фиксации атмосферного азота.