The role of homeodomain-containing transcription factors in the control of organogenesis of nitrogen fixing nodules

Dolgikh A.V.^{1,2}, Dolgikh E.A.¹

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), Saint Petersburg, Russia; ²Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

E-mail: sqshadol@gmail.com

Key message. Interconnection between key transcription factors of symbiosis regulation and the homeodomain-containing transcription factors KNOXs and BELLS in the development of nodules in pea was investigated.

Keywords: legume-rhizobial symbiosis, organogenesis, homeodomain-containing transcription factors.

The development of legume-rhizobial symbiosis results in formation of specific organs on the roots of plants which are called "nitrogen fixing nodules". This process is strictly controlled by specific transcription factors and is closely linked to the phytohormonal regulation. IPD3/CYCLOPS and NIN transcription factors play the most important role in the process of nodule development. It was previously shown that *Pisum sativum* mutants in the *ipd3/cyclops* gene form Fix⁻ nodules, while mutants in the *nin* gene were absolutely unable to form nodules (Nod⁻ phenotype). Nevertheless, the mechanism of interconnection between IPD3/CYCLOPS, NIN and other components of signalling pathway as well as phytohormones, which are involved in nodules organogenesis regulation has remained unclear.

Our previous experiments showed that cytokinin level was dramatically reduced in *ipd3/cyclops* mutants and expression level of genes encoding KNOX and BEL-like (BELL) transcription factors involved in cytokinin biosynthesis regulation were also significantly decreased. In the promoter of *KNOX3* gene we have found sequence which is similar to so-called "cyc-box" - specific site for recognition by IPD3/CECLOPS transcription factor. In current work we have examined possibility of IPD3/CYCLOPS interaction with *pKNOX3::GUS* promoter by means of temporal co-expression of these constructs in leaves of *Nicotiana benthamiana*. The opportunity of direct interaction between recombinant protein IPD3/CYCLOPS and regulatory sequences in promotor have also been studied using method of surface plasmon resonance with biosensor Proteon XPR36. We have also found significantly reduced expression level of *BELL1* and *BELL3* genes in *nin* mutants and moreover expression level of gene encoding OVATE transcription factor which may potentially interact with KNOXs and BELLS was also decreased. Based on these data, possible scheme of transcription factors and phytohormones interaction during nodule organogenesis was proposed.

This work was supported by a grant of the Russian Science Foundation 16-16-10043.

Участие гомеодомен-содержащих транскрипционных факторов в контроле органогенеза азотфиксирующих клубеньков бобовых растений

Долгих А.В.^{1,2}, Долгих Е.А.¹

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Исследовано взаимодействие между основными транскрипционными факторами регуляции симбиоза и гомеодомен-содержащими KNOX и BELL транскрипционными факторами в контроле органогенеза клубенька.

Ключевые слова: бобово-ризобийный симбиоз, органогенез, гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы.

Развитие симбиоза бобовых растений с бактериями пор. *Rhizobiales* приводит к формированию на корнях растения специального органа — азотфиксирующего клубенька. Этот процесс контролируется специфическими транскрипционными факторами и тесно связан с действием фитогормонов. Важнейшую роль в процессах развития клубенька у бобовых играют транскрипционные факторы IPD3/CYCLOPS и NIN. Ранее было показано, что мутанты по гену *ipd3/cyclops* у гороха *Pisum sativum* L. формируют клубеньки, не способные к азотфиксации (Fix⁻), а мутанты по гену *nin* полностью теряют способность к формированию клубеньков (Nod⁻ фенотип). Тем не менее, до сих пор остается неясным, каким образом осуществляется взаимодействие между IPD3/CYCLOPS, NIN и другими компонентами сигнального пути, а также фитогормонами, вовлеченными в регуляцию программы органогенеза клубенька.

Выполненные нами ранее исследования показали, что у мутантов по гену *ipd3/cyclops* гороха значительно снижено количество цитокининов в клубеньках, а также существенно подавлен уровень экспрессии генов, кодирующих гомеодомен - содержащие транскрипционные факторы KNOX и BEL-like (BELL), которые необходимы для регуляции биосинтеза цитокининов. В промоторе гена *KNOX3* нами был найден участок, схожий с последовательностью «cyc-box» - специфичным сайтом посадки транскрипционного фактора IPD3/CYCLOPS. В настоящей работе нами была исследована возможность связывания IPD3/CYCLOPS с промотором *pKNOX3::GUS* при временной ко-экспрессии генетических конструкций в листьях табака *Nicotiana benthamiana*, а также исследовано непосредственное взаимодействие рекомбинантного белка IPD3/CYCLOPS с регуляторными последовательностями промотора с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса на биосенсоре Proteon XPR36. Нами было показано значительное снижение экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы BELL1 и BELL3, у мутантов гороха по гену *nin*, а также снижение в уровне экспрессии гена, кодирующего транскрипционный фактор OVATE, для гомологов которого показана возможность взаимодействия с KNOX и BELL транскрипционными факторами. На основании полученных данных предлагается возможная схема взаимодействия транскрипционных факторов и фитогормонов при клубенькообразовании.

Работа поддержана грантом РФФ 16-16-10043П.