Study of the garden pea (*Pisum sativum* L.) symbioses in post-genomic era

Zhukov V.A.¹, Afonin A.M.¹, Akhtemova G.A.¹, Bovin A.D.¹, Dolgikh A.V.¹, Gorshkov A.P.¹, Gribchenko E.S.¹, Ivanova K.A.¹, Kirienko A.N.¹, Kitaeva A.B.¹, Kliukova M.S.¹, Kulaeva O.A.¹, Kusakin P.G.¹, Leppyanen I.V.¹, Pavlova O.A.¹, Romanyuk D.A.¹, Serova T.A.¹, Shtark O.Y.¹, Sulima A.S.¹, Tsyganova A.V.¹, Vasileva E.N.¹, Zhernakov A.I.¹, Dolgikh E.A.¹, Tsyganov V.E.¹, Tikhonovich I.A.^{1,2}

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia; ²Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia
E-mail: vzhukov@arriam.ru

Key message. Mutualistic symbioses formed by garden pea have been studied with use of 'omic' technologies in order to gain a new understanding of molecular mechanisms of beneficial effect that microsymbionts have on seed yield and quality.

Keywords: garden pea, transcriptomics, nitrogen fixation, arbuscular mycorrhiza, PGPB

The garden pea (*Pisum sativum* L.) forms mutualistic symbioses with different beneficial microorganisms, namely nodule bacteria, arbuscular-mycorrhizal fungi, and plant growth-promoting bacteria (PGPB). Completion of the pea genome sequencing made possible the successful use of the 'omics' technologies for investigation into the molecular mechanisms of these symbioses.

The aim of the study was to discover the molecular-genetic bases of beneficial effect that microorganisms have on garden pea plants, including the improvement of seed quality and yield.

The plants of cv. Frisson were grown in quartz sand and inoculated with nodule bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026), arbuscular-mycorrhizal fungi (*Rhizophagus irregularis* BEG144), and PGPB (a component of a microbiological preparation 'Myzorin') so that 8 variants of treatment were studied. After 2 and 4 weeks of growth, the total gene expression was assessed in plant roots and in shoots using a modified RNAseq technique named 3'-MACE (as described in Zhernakov et al. (2019) PeerJ 7, e6662). Also, pea *sym28* and *sym29* mutants with impaired autoregulation of nodulation and mycorrhization were used to study the effect of combined inoculation with nodule bacteria and PGPB.

The differential response of pea to several microsymbionts (as single inoculants and in combinations) was assessed by transcriptome sequencing, and transcriptomic markers of successful inoculation were determined. For arbuscular-mycorrhizal inoculation, the most stable up-regulated markers were PS_0021302 (encoding Glutathione S-transferase) and well-known mycorrhiza-specific gene RAM2. For PGPB inoculation, the gene encoding putative LRR protein (PS_0029785) was found as a stable down-regulated marker. The treatment with PGPB differently affected the gene expression in wild type cv. Frisson, *sym28* and *sym29* plants, pointing towards the possible involvement of components of autoregulation in regulation of interaction with multiple symbionts, including PGPB. Together these data form the basis for comprehensive description of the molecular-genetic processes occurring in pea plants under the use of complex inoculants.

The work was supported by the Russian Science Foundation grant # 17-76-30016.

Исследование симбиозов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в постгеномную эру

Жуков В.А.¹, Афонин А.М.¹, Ахтемова Г.А.¹, Бовин А.Д.¹, Васильева Е.Н.¹, Долгих А.В.¹, Горшков А.П.¹, Грибченко Э.С.¹, Жернаков А.И.¹, Иванова К.А.¹, Кириенко А.Н.¹, Китаева А.Б.¹, Ключкова М.С.¹, Кулаева О.А.¹, Кусакин П.Г.¹, Леппянен И.В.¹, Павлова О.А.¹, Романюк Д.А.¹, Серова Т.А.¹, Сулима А.С.¹, Цыганова А.В.¹, Штark О.Ю.¹, Долгих Е.А.¹, Цыганов В.Е.¹, Тихонович И.А.^{1,2}

¹ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Взаимовыгодные симбиозы гороха посевного изучены с использованием «омиксных» технологий с целью понимания молекулярных механизмов полезного воздействия, которое микросимбионты оказывают на урожай и качество семян.

Ключевые слова: горох посевной, транскриптомика, азотфиксация, арбускулярная микориза, PGPB

Горох посевной образует симбиозы с различными полезными микроорганизмами, в том числе клубеньковыми бактериями, грибами арбускулярной микоризы и рост-стимулирующими бактериями (PGPB). Завершение секвенирования генома гороха позволяет успешно применять «омиксные» технологии для исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе данных симбиозов.

Цель исследования – изучение молекулярно-генетических основ положительного влияния микроорганизмов на растения гороха, в том числе на повышение урожайности и качества семян.

Растения сорта Frisson были выращены в песке при инокуляции клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026), грибами арбускулярной микоризы (*Rhizophagus irregularis* BEG144) и PGPB (компонент препарата «Мизорин») в 8 вариантах обработки. После 2 и 4 недель выращивания, была оценена экспрессия генов в корнях и побегах с использованием RNAseq в модификации 3'-MACE (см. Zhernakov et al. (2019) PeerJ 7, e6662). На мутантах гороха по генам *sym28* и *sym29* с нарушениями авторегуляции клубенькообразования и микоризации был изучен эффект совместной инокуляции клубеньковыми бактериями и PGPB.

Влияние микросимбионтов (по отдельности и в комбинациях) было оценено при помощи анализа транскриптома, при этом были выявлены транскриптомные маркеры успешного развития симбиоза. При развитии арбускулярной микоризы повышали экспрессию гены PS_0021302 (кодирует Glutathione S-transferase) и RAM2, специфичный для микоризного симбиоза. При инокуляции PGPB стабильное снижение экспрессии было выявлено для гена, кодирующего LRR-белок (PS_0029785). Воздействие PGPB по-разному влияло на экспрессию генов у Frisson и мутантов *sym28* и *sym29*, что указывает на возможную роль компонентов авторегуляции при взаимодействии с несколькими симбионтами, в том числе PGPB. Полученные данные являются основой описания молекулярно-генетических процессов, имеющих место при комплексной инокуляции растений гороха полезными микроорганизмами. Работа поддержана грантом РФ (17-76-30016).