УДК 635.656:581.557:577.21:575.116

doi: 10.15389/agrobiology.2016.5.593rus

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ У ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*Pisum sativum* L.)\* (обзор)

### В.А. ЖУКОВ<sup>1</sup>, О.Ю. ШТАРК<sup>1</sup>, Т.А. НЕМАНКИН<sup>1, 2</sup>, А.А. КРЮКОВ<sup>1</sup>, А.Ю. БОРИСОВ<sup>1</sup>, И.А. ТИХОНОВИЧ<sup>1, 3</sup>

Статья обобщает современные данные по методам, результатам и проблемам генетического картирования генов гороха посевного (Pisum sativum L.), участвующих в развитии и регуляции арбускулярно-микоризного и бобово-ризобиального симбиозов. С помощью мутационного анализа у модельных и сельскохозяйственно ценных бобовых выявлено множество регуляторных симбиотических генов (Sym-генов), в частности у гороха — более 40 Sym-генов. Некоторые из них клонированы и секвенированы, для различных видов бобовых показано структурное и функциональное сходство ортологичных Sym-генов. Их функции разнообразны и включают контроль рецепции сигнальных молекул микросимбионта, активации сигнального каскада, общего для бобово-ризобиального и арбускулярно-микоризного симбиозов, и последующих транскрипционных изменений в коре корня. Для идентификации последовательностей генов гороха, затронутых мутациями, применяют подход, основанный на сравнительном генетическом картировании и поиске генов-кандидатов в геноме близкородственного бобового растения люцерны слабоусеченной (Medicago truncatula Gaertn.). На сайте http://www.phytozome.net (D.M. Goodstein с соавт., 2012) представлено текущее состояние работы по секвенированию генома люцерны в формате современного геномного браузера, что облегчает поиск гомологичных генов и анализ последовательностей генов-кандидатов. Высокое сходство геномов гороха и люцерны позволяет создавать геноспецифичные молекулярные маркеры на основе последовательностей генов люцерны, сопоставлять полученные генетические карты гороха с геномом люцерны и (в случае нахождения мутаций со сходным фенотипическим проявлением) клонировать гены гороха. На настоящий момент большинство известных Sym-генов гороха картированы в геноме, что позволило идентифицировать у гороха последовательности 14 симбиотических генов. В частности, авторам настоящего обзора удалось секвенировать гены гороха Sym35 (гомолог NIN лядвенца японского Lotus japonicus (Regel.) К. Larsen) (А.Ү. Borisov с соавт., 2003), Sym37 (гомолог NFR1 лядвенца) (V.A. Zhukov с соавт., 2008), Sym33 (гомолог IPD3 люцерны слабоусеченной) (Е. Ovchinnikova с соавт., 2011), Cochleata (гомолог NOOT люцерны слабоусеченной) (Ј.М. Соигідои с соавт., 2012). В последние годы, с развитием современных технологий секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing — NGS) и массового генотипирования, прослеживается лавинообразное накопление данных по картированию геноспецифичных маркеров у гороха. Насыщение генетической карты маркерами, несомненно, упростит работу по картированию симбиотических генов и выявлению их последовательностей, что поможет расширить понимание того, как функционирует система генов гороха, контролирующих взаимодействие с полезными почвенными микроорганизмами.

Ключевые слова: бобовые, бобово-ризобиальный симбиоз, арбускулярная микориза, симбиотические гены растений, генетическое картирование, синтения, геноспецифичные молекулярные маркеры.

Взаимовыгодные (мутуалистические) взаимодействия с микроорганизмами обусловили эволюционно успешную стратегию наземного образа жизни растений (1, 2). Преимущества, приобретаемые растениями в результате вступления в симбиоз, заключаются в облегчении минерального питания и усилении защиты от патогенов и абиотических стрессов (3, 4). Самый распространенный эндосимбиоз, характерный для 80-90 % наземных растений, — арбускулярная микориза (АМ), или симбиоз с грибами отдела *Glomeromycota*. АМ обеспечивает ассимиляцию питательных (в основном фосфор- и азотсодержащих) веществ из почвы (4). Среди азотфиксирующих растительно-микробных симбиозов наиболее известен симбиоз между растениями семейства Бобовые (*Fabaceae*) и клубеньковыми бактериями, или ризобиями (альфа-, бета- и гаммапротеобактериями). При формировании бобово-ризобиального симбиоза (БРС) на корнях рас-

<sup>\*</sup> Работа финансово поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00135).

тений развиваются специализированные структуры — клубеньки, заселенные бактериями, фиксирующими атмосферный азот (3). АМ и БРС имеют немало общих черт, указывающих на их эволюционное родство (5, 6). Для обоих типов симбиозов характерна высокая степень генетической и метаболической интеграции партнеров. Развитие АМ и БРС включает ряд четко взаимосвязанных молекулярных и клеточных процессов у партнеров с постоянным обменом сигналами и метаболитами (6, 7).

Для изучения механизмов, лежащих в основе формирования и функционирования мутуалистических растительно-микробных симбиозов, широко применяют экспериментальный мутагенез. В частности, получены обширные коллекции мутантов бобовых, позволившие идентифицировать несколько десятков регуляторных симбиотических генов (8-11), или так называемых *Sym*-генов (от англ. symbiosis — симбиоз) (12). Многие из них клонированы и секвенированы, и для различных видов бобовых показано структурное и функциональное сходство ортологичных *Sym*-генов. Функции этих генов разнообразны и включают контроль рецепции сигнальных молекул микросимбионта, активацию общего (для БРС и АМ) сигнального каскада (ОСК) и последующих транскрипционных изменений в коре корня (6, 7, 13).

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) относится к важнейшим бобовым сельскохозяйственным культурам в России и в мире (14). У гороха получено более 100 независимых мутантов, несущих мутации в 44 *Sym*-генах, приводящие к нарушению развития БРС (реже AM) (1, 8, 9, 15-21). Одним из перспективных способов установления последовательности таких генов считается их точная локализация на генетической карте и последующее клонирование на основании поиска генов-кандидатов в геноме модельных бобовых растений люцерны слабоусеченной *Medicago truncatula* Gaertn. и лядвенца японского *Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen (8, 22-24).

Цель настоящей статьи — представить обзор современных данных по генетическому картированию *Sym*-генов гороха, включая результаты, полученные во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиоло-гии (ВНИИСХМ).

Методология генетического картирования. Генетическое картирование базируется на методах классической генетики определении групп сцепления и частот рекомбинации. Единицей измерения расстояний между генами служат проценты рекомбинации, или сантиморганы (сМ) (25). Построение генетических карт проводится на основании статистической обработки массива данных, соответствующих расщеплению по аллельным состояниям маркеров в определенном поколении после проведения скрещивания. Для этого разработано не менее десятка программных средств, например, MAPMAKER 3.0, MapL98, JoinMap 4.1 и многие другие (26-30).

Для генетического картирования генов гороха используются морфологические и молекулярные маркеры (белковые и ДНК-маркеры). Создание масштабных генетических карт с высоким разрешением стало возможным лишь с вовлечением в генетический анализ ДНК-маркеров (31). За последние 25 лет с применением молекулярных маркеров были созданы различные варианты генетических карт генома гороха (22, 32-43).

Для работы по картированию генов гороха, идентифицированных с помощью экспериментального мутагенеза, наиболее подходящими представляются геноспецифичные маркеры, основанные на амплификации фрагментов экспрессирующихся последовательностей (так называемые EST-маркеры — от англ. expressed sequence tag). Известная последовательность

EST используется для дизайна праймеров. Если детекция аллельного состояния продукта амплификации осуществляется посредством воздействия эндонуклеазой рестрикции, сайт узнавания которой совпадает с сайтом однонуклеотидного полиморфизма, то маркеры относят к типу CAPS (от англ. cleaved amplified polymorphic sequences). Аллельный полиморфизм таких маркеров проявляется в виде разного числа и размера рестрикционных фрагментов при электрофорезе в агарозном геле (44).

Применение геноспецифичных маркеров для картирования у бобовых растений позволяет эксплуатировать феномен синтении геномов для переноса данных, получаемых для модельных бобовых (лядвенец, люцерна), на экономически значимые сельскохозяйственные культуры, к которым относится и горох посевной (24, 45). Под термином «синтения» понимают одинаковый порядок следования гомологичных генов на хромосомах различных видов. Если этот порядок наблюдается лишь в пределах кластеров из нескольких близко расположенных генов, то имеет место микросинтения, если же такая закономерность характерна для целых хромосом или их протяженных участков, то употребляют термин «макросинтения».

Исследования, направленные непосредственно на создание новых геноспецифичных маркеров и построение генетических карт с их использованием у бобовых, подтвердили наличие как макро-, так и микросинтении их геномов (22, 40). Обнаружение высокой синтении геномов у гороха и люцерны слабоусеченной стало новым стимулом для развития генетики гороха, в особенности после успешного секвенирования генома люцерны. Высокое сходство геномов позволяет использовать знания о генах люцерны для изучения генов гороха, создания геноспецифичных маркеров и клонирования генов в случае нахождения гомологичных мутаций (то есть мутаций со сходным фенотипическим проявлением) (24). На сайте Plant Comparative Genomics portal of the Department of Energy's Joint Genome Institute (США, http://www.phytozome.net) (46) представлено текущее состояние работы по секвенированию генома люцерны в формате современного геномного браузера, что облегчает поиск гомологичных генов и анализ генов-кандидатов.

Генетическое картирование как инструмент для идентификации последовательностей симбиотических генов гороха. За последние 10 лет во ВНИИСХМ был создан набор из более чем 100 геноспецифичных молекулярных маркеров для картирования *Sym*-генов, локализованных во всех группах сцепления у гороха. Для создания молекулярных маркеров использовали EST, позиция которых в геноме известна из данных литературы (так называемые якорные маркеры — от англ. anchor markers).

На основании полученных из базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) нуклеотидных последовательностей выбранных EST были созданы олигонуклеотидные праймеры для проведения ПЦР и амплификации целевых фрагментов ДНК у различных генетических линий гороха. С использованием созданного набора маркеров была впервые определена или уточнена локализация десяти симбиотических генов (20, 47, 48). На рисунке представлена обобщенная схема, суммирующая все данные по картированию симбиотических генов гороха, включая полученные во ВНИИСХМ (9, 20, 47, 48, 49).

Результаты генетического картирования мутантных генов с использованием геноспецифичных маркеров позволили идентифицировать последовательности 13 *Sym*-генов гороха. Многие из них были определены одновременно с последовательностями ортологичных генов других бобовых,



**Позиции симбиотических (Sym) генов гороха (***P. sativum* **L.) на генетической карте: I-VII** — номер группы сцепления гороха. В скобках указана позиция гена *Sym17*, требующая дополнительного подтверждения (50). Черным цветом обозначены гены, положение которых определено или подтверждено во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии (г. Санкт-Петербург), серым — гены, локализованные другими исследователями. Взаимное расположение следующих генов не определено: *Coch—Sym38, Sym16—Sym27, Sym14—Sym22, Sym11—Sym13, Sym15—Sym29.* 

включая модельные виды (20, 48, 51-57). Обобщенная схема определения последовательности гена гороха включала четыре этапы: локализацию гена на генетической карте гороха; поиск известных генов в синтенном регионе генома модельного бобового (*Medicago truncatula* или *Lotus japonicus*); отбор генов-кандидатов на роль гомологов искомого гена гороха на основании сравнения фенотипа мутантов гороха и модельного бобового; амплификацию и секвенирование последовательности гена-кандидата модельно-го бобового (8).

Последовательности семи генов гороха идентифицированы во ВНИИСХМ, в том числе в сотрудничестве с ведущими лабораториями мира. В частности, ген Sym33 был секвенирован на основании гомологии с геном люцерны слабоусеченной IPD3 (56), ген Sym35 — на основе гомологии с геном лядвенца японского NIN (52), ген Sym37 — гомологии с геном NFR1 (54). Эти гены кодируют соответственно белок, взаимодействующий с кальций/кальмодулин-зависимой киназой (центральный компонент ОСК); специфичный для БРС транскрипционный фактор, зависимый от ОСК; рецептор бактериального сигнала (Nod-фактора) (6). Было установлено, что ген гороха Sym40 — гомолог ранее известного гена, кодирующего транскрипционный фактор из группы факторов этиленового ответа *EFD* у люцерны (48), а мутация, соответствующая гену *Sym41*, представляет собой слабое аллельное состояние другого симбиотического гена гороха — Sym19, кодирующего рецепторную киназу (компонент ОСК) (20). Также недавно показано, что ортологичные гены Cochleata и NOOT, управляющие активностью клубеньковой меристемы, — это гомологи генов ВОР1 и BOP2 Arabidopsis thaliana (L.) Heyhn., вовлеченных в морфогенез листьев и цветков (57). Все шесть перечисленных генов гороха были секвенированы на основании результатов генетического картирования. Исключение составляет ген Sym34 с неизвестной локализацией, который секвенирован на основании гомологии с геном люцерны слабоусеченной *NSP1* (ген общего для БРС и АМ транскрипционного фактора, зависимого от ОСК), предположенной лишь на основании фенотипа мутанта гороха (21).

Таким образом, у гороха на настоящий момент известны нуклеотидные последовательности 14 *Sym*-генов, что составляет лишь треть от идентифицированных с помощью мутационного анализа, то есть многие гены еще предстоит картировать и секвенировать.

Технологии «следующего поколения» и перспективы. В последние годы с развитием технологий секвенирования следующего поколения и массового генотипирования происходит лавинообразное накопление данных по картированию геноспецифичных маркеров у гороха. Так называемые технологии секвенирования «следующего поколения» (next generation sequencing — NGS) позволяют с высокой скоростью прочитывать огромное число фрагментов, что делает возможным анализ полиморфизма тысяч последовательностей, рассматриваемых в качестве потенциальных маркеров. Массовое генотипирование, осуществляемое, например, с помощью микрочипов GoldenGate («Illumina», США), делает возможным единовременный анализ до нескольких тысяч создаваемых маркеров. С использованием этих подходов в последние два года на генетическую карту гороха были нанесены несколько тысяч геноспецифичных маркеров (43).

Безусловно, работа по генетическому картированию симбиотических генов гороха будет значительно облегчена после секвенирования генома *P. sativum*. Пока, однако, горох, как и многие другие бобовые культуры, ожидает своего шанса пополнить список видов с секвенированным геномом (58), и секвенирование ограничивается его транскриптомом (59-62).

Итак, использование геноспецифичных маркеров для картирования у бобовых растений позволяет использовать феномен синтении геномов для переноса данных, получаемых для модельных бобовых (лядвенец, люцерна), на экономически значимые сельскохозяйственные культуры, к которым относится и горох посевной. Создание новых, «межвидовых» маркеров (то есть полученных на основе пар ортологичных генов у различных бобовых растений) и насыщение генетической карты гороха, очевидно, способны значительно помочь при осуществлении сборки полного генома гороха на основании результатов секвенирования следующего поколения (NGS). В свою очередь, картирование симбиотических генов и выявление их последовательностей поможет расширить понимание того, как функционирует система генов гороха, контролирующих взаимодействие с полезными почвенными микроорганизмами.

Авторы выражают благодарность Е.С. Овчинниковой (Университет Сиднея, Австралия) за помощь в совместной работе с молекулярными маркерами гороха.

<sup>1</sup>ΦГБНУ Всероссийский НИИ
 сельскохозяйственной микробиологии,
 196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3, е-mail: zhukoff01@yahoo.com;
 <sup>2</sup>ЗАО «Био-Кад»,
 198515 Россия, г. Санкт-Петербург, Петродворцовый р-н,
 пос. Стрельна, ул. Связи, 34, литер А;
 <sup>3</sup>ΦГБОУ ВПО Санкт-Петербургский
 государственный университет,
 199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Поступила в редакцию 14 декабря 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 5, pp. 593-601

GENETIC MAPPING OF PEA (*Pisum sativum* L.) GENES INVOLVED IN SYMBIOSIS

# (review)

## V.A. Zhukov<sup>1</sup>, O.Yu. Shtark<sup>1</sup>, T.A. Nemankin<sup>1, 2</sup>, A.A. Kryukov<sup>1</sup>, A.Yu. Borisov<sup>1</sup>, I.A. Tikhonovich<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail zhukoff01@yahoo.com;

<sup>2</sup>BioCad Joint Stock Co., 34-A, ul. Svyazi, pos. Strelna, St. Petersburg, 198515 Russia;

<sup>3</sup>Saint Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034 Russia

(ORCID: Zhukov V.A. orcid.org/0000-0002-2411-9191, Borisov A.Y. orcid.org/0000-0001-9834-7368, Tikhonovich I.A. orcid.org/0000-0001-8968-854X)

Acknowledgements:

Authors wish to thank Dr. E.S. Ovchinnikova (University of Sydney, Australia) for assistance in experiments with pea molecular markers.

Supported by Russian Science Foundation, grant № 14-24-00135 Received December 14, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2016.5.593eng

### Abstract

This article presents a review of current data on genetic mapping of pea (*Pisum sativum* L.) genes participating in development and regulation of arbuscular-mycorrhizal and legume-Rhizobial symbioses. By means of mutational analysis several regulatory symbiotic genes (Sym-genes) were identified in model and crop legumes, particularly, among them more than 40 pea Sym-genes. Some of them are already cloned and sequenced, and structural and functional similarity was demonstrated for orthologous Sym-genes in different legume species. The functions of these genes are diverse and include the control of perception of the microsymbiont's signal molecules, activation of the signal cascade (which is common for both legume-rhizobial and arbuscular-mycorrhizal symbioses), and consequent transcriptional changes in root cortex. To identify the sequence of mutated pea genes, an approach is used that is based on comparative genetic mapping and search for candidate gene in the genome of closely related legume plant barrel medic (Medicago truncatula Gaertn.). The web site www.phytozome.net (D.M. Goodstein et al., 2012) presents the current state of the barrel medic's genome sequencing in the form of genome browser, which facilitates the search for homologous genes and the sequence analysis of candidate genes. Significant similarity of pea and barrel medic genomes allows development of gene-based molecular markers, comparison of obtained pea genetic map with M. truncatula genome, and pea gene cloning after finding mutations with similar phenotypic manifestation. Currently, most of pea Sym-genes are mapped in genome; that resulted in identification of the sequences of 14 symbiotic genes. In particular, authors of the present review were able to sequence the pea genes Sym35 - the homologue of NIN of Lotus japonicus (Regel.) K. Larsen (A.Y. Borisov et al., 2003), Sym37 – the homologue of NFR1 of L. japonicus (V.A. Zhukov et al., 2008), Sym33 – the homologue of IPD3 of barrel medic (E. Ovchinnikova et al., 2011), Coch*leata* – the homologue of *NOOT* of barrel medic (J.M. Couzigou et al., 2012). In recent years, considering the development of modern technologies of Next Generation Sequencing and massive genotyping, an avalanche of data on mapping pea gene-based data is being accumulated. Saturation of pea genetic map with markers, undoubtedly, will facilitate mapping of symbiotic genes and identification of their sequences; this will help to broaden the understanding of how the system of genes, which control interactions with beneficial soil microorganisms, functions in pea.

Keywords: legumes, legume-rhizobial symbiosis, arbuscular mycorrhiza, symbiotic plant genes, genetic mapping, synteny, gene-based molecular markers.

#### REFERENCES

- 1. Gianinazzi-Pearson V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell*, 1996, 8: 1871-1883 (doi: 10.1105/tpc.8.10.1871).
- 2. Brundrett M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 2002, 154: 275-304 (doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x).
- 3. Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I., Newton W.I. *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Springer Science+Business Media B.V., 2008 (doi: 10.1007/978-1-4020-3548-7).
- 4. Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, NY, USA, 2008.
- 5. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, 6: 763-775 (doi: 10.1038/nrmicro1987).
- Oldroyd G.E. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, 11(4): 252-263 (doi: 10.1038/nrmicro2990).
- 7. Gobbato E. Recent developments in arbuscular mycorrhizal signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2015, 26: 1-7 (doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.006).
- Borisov A.Yu., Shtark O.Yu., Zhukov V.A., Nemankin T.A., Naumkina T.S., Pinaev A.G., Akhtemova G.A., Voroshilova V.A., Ovchinnikova E.S., Rychagova T.S., Tsyganov V.E., Zhernakov A.I., Kuznetsova E.V., Gri-

shina O.A., Sulima A.S., Fedorina Ya.V., Chebotar' V.K., Bisseling T., Lemanso F., Dzhianinazzi-Pirson V., Rate P., Sankhuan Kh., Stougaard I., Berg G., Makfi K., Ellis N., Tikhonovich I.A. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology*], 2011, 3: 41-47. Available http://www.agrobiology.ru/3-2011borisov.html. No date (in Russ.).

- Borisov A.Y., Danilova T.N., Koroleva T.A., Naumkina T.S., Pavlova Z.B., Pinaev A.G., Shtark O.Y., Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Zhernakov A.I., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Pea (*Pisum sativum* L.) regulatory genes controlling development of nitrogen-fixing nodule and arbuscular mycorrhiza: fundamentals and application. *Biologia*, 2004, 59(Suppl 13): 137-144.
- 10. Sandal N., Petersen T.R., Murray J., Umehara Y., Karas B., Yano K., Kumagai H., Yoshikawa M., Saito K., Hayashi M., Murakami Y., Wang X., Hakoyama T., Imaizumi-Anraku H., Sato S., Kato T., Chen W., Hossa-in M.S., Shibata S., Wang T.L., Yokota K., Larsen K., Kanamori N., Madsen E., Radutoiu S., Madsen L.H., Radu T.G., Krusell L., Ooki Y., Banba M., Betti M., Rispail N., Skøt L., Tuck E., Perry J., Yoshida S., Vickers K., Pike J., Mulder L., Charpentier M., Müller J., Ohtomo R., Kojima T., Ando S., Marquez A.J., Gresshoff P.M., Harada K., Webb J., Hata S., Suganuma N., Kouchi H., Kawaguchi M., Stougaard J. Genetics of symbiosis in *Lotus japonicus:* recombinant inbred lines, comparative genetic maps, and map position of 35 symbiotic loci. *Mol.-Plant Microbe Interact.*, 2006, 19: 80-91 (doi: 10.1094/MPMI-19-0080).
- Pislariu C.I., Murray J.D., Wen J., Cosson V., Muni R.R.D., Wang M., Benedito V.A., Andriankaja A., Cheng X., Torres J.I., Mondy S., Zhang S., Taylor M.E., Tadege M., Ratet P., Mysore K.S., Chen R., Udvardi M.K. A *Medicago truncatula* tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiol.*, 2012, 159(4): 1686-1699 (doi: 10.1104/pp.112.197061).
- 12. Lie T.A. Temperature-dependent root-nodule formation in pea cv. Iran. *Plant and Soil*, 1971, 34: 751-752.
- Oldroyd G.E., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Annu. Rev. Plant Biol., 2008, 59: 519-546 (doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839).
- 14. Graham P.H., Vance C.P. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.*, 2003, 131: 872-877 (doi: 10.1104/pp.017004).
- 15. Guinel F.C., Geil R.D. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Can. J. Bot.*, 2002, 80: 695-720 (doi: 10.1139/b02-066).
- 16. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Priefer U.B., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis. *Ann. Bot.*, 2002, 89: 357-366 (doi: 10.1093/aob/mcf051).
- Jacobi L.M., Petrova O.S., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Effect of mutations in the peagenes *Sym33* and *Sym40*. I. Arbuscular mycorrhiza formation and function. *Mycorrhiza*, 2003, 13: 3-7 (doi: 10.1007/s00572-002-0188-3).
- Jacobi L.M., Zubkova L.A., Barmicheva E.M., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Effect of mutations in the pea genes Sym33 and Sym40. II. Dynamics of arbuscule development and turnover. Mycorrhiza, 2003, 13: 9-16 (doi: 10.1007/s00572-002-0189-2).
- Voroshilova V.A., Demchenko K.N., Brewin N.J., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Initiation of a legume nodule with an indeterminate meristem involves proliferating host cells that harbour infection threads. *New Phytologist*, 2009, 181: 913-923 (doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02723.x).
- 20. Ovchinnikova E. Genetic analysis of symbiosome formation. PhD thesis. Wageningen University, Wageningen, NL, 2012.
- Shtark O.Y., Sulima A.S., Zhernakov A.I., Kliukova M.S., Fedorina J.V., Pinaev A.G., Kryukov A.A., Akhtemova G.A., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Arbuscular mycorrhiza development in pea (*Pisum sativum* L.) mutants impaired in five early nodulation genes including putative orthologs of *NSP1* and *NSP2*. Symbiosis, 2016, 68(1): 129-144 (doi: 10.1007/s13199-016-0382-2).
- 22. Aubert G., Morin J., Jacquin F., Loridon K., Quillet M.C., Petit A., Rameau C., Lejeune-Hénaut I., Huguet T., Burstin J. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula. Theor. Appl. Genet.*, 2006, 112(6): 1024-1041 (doi: 10.1007/s00122-005-0205-y).
- 23. Zhukov V.A., Shtark O.Yu., Borisov A.Yu., Tikhonovich I.A. *Genetika*, 2009, 45(11): 1449-1460 (in Russ.).
- 24. Young N.D., Udvardi M. Translating Medicago truncatula genomics to crop legumes.

Curr. Opin. Plant Biol., 2009, 12(2): 193-201 (doi: 10.1016/j.pbi.2008.11.005).

- 25. Inge-Vechtomov S.G. *Genetika s osnovami selektsii* [Genetics and basic breeding]. St. Petersburg, 2010 (in Russ.).
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L. MAPMAKER, an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174-181 (doi: 10.1016/0888-7543(87)90010-3).
- 27. U k a i Y. MAPL: a package of computer programs for construction of DNA polymorphism linkage maps and analysis of QTL. *Breeding Sci.*, 1995, 45: 139-142 (doi: 10.1270/jsbbs1951.45.139).
- 28. Van Ooijen J.W. Multipoint maximum likelihood mapping in a full-sib family of an outbreeding species. *Genet. Res.*, 2011, 93(5): 343-349 (doi: 10.1017/S0016672311000279).
- 29. C h e e m a J., D i c k s J. Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. *Briefing in Bioinformatics*, 2009, 10(6): 595-608 (doi: 10.1093/bib/bbp045).
- 30. Zhernakov A.I. F2Breed. Programma dlya otsenki rekombinatsii mezhdu geneticheskimi lokusami i geneticheskikh markerov v mnogomernom prostranstve pri analize kosegregatsii priznakov v F<sub>2</sub>-populyatsii [Program for evaluating recombination between genetic loci and genetic markers in a multidimensional space to analyze cosegregation of traits in F<sub>2</sub>-population]. State Reg. Cert. Cert. № 2012619482. Registered October 19, 2012 (in Russ.).
- 31. Ezhova T.A., Lebedeva O.V., Ogarkova O.A., Penin A.A., Soldatova O.P., Shestakov S.V. Arabidopsis thaliana – model'nyi ob"ekt genetiki rastenii [Arabidopsis thaliana – a model organisms in plant genetics]. Moscow, 2003 (in Russ.).
- 32. Weeden N.F., Swiecicki W.K., Ambrose M., Timmerman G.M. Linkage groups of pea. *Pisum Genetics*, 1993, 25: 4.
- 33. Weeden N.F., Swiecicki W.K., Timmerman-Vaughan G.M., Ellis T.H.N., Ambrose M. The current pea linkage map. *Pisum Genetics*, 1996, 28: 1-4.
- 34. Hall K.J., Parker J.S., Ellis T.H.N., Turner L., Knox M.R., Hofer J.M.I., Lu J., Ferrandiz C., Hunter P.J., Taylor J.D., Baird K. The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. II. Physical maps of linkage mapping populations. *Genome*, 1997, 40: 755-769 (doi: 10.1139/g97-798).
- 35. Flavell A.J., Knox M.R., Pearce S.R., Ellis T.H. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *The Plant Journal*, 1998, 16(5): 643-650 (doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00334.x).
- 36. Laucou V., Haurogne K., Ellis N., Rameau C. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum. Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 905-915 (doi: 10.1007/s001220050971).
- Weeden N.F., Ellis T.H.N., Timmerman-Vaughan G.M., Swiecicki W.K., Rozov S.M., Berdnikov V.A. A consensus linkage map for *Pisum sativum*. *Pisum Genetics*, 1998, 30: 1-4.
- Irzykowska L., Wolko B., Swiecicki W.K. The genetic linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular, biochemical and morphological markers. *Pisum Genetics*, 2001, 33: 13-18.
- 39. Weeden N.F., Moffet M. Identification of genes affecting root mass and root/shoot ratio in a J11794 x «Slow» RIL population. *Pisum Genetics*, 2002, 34: 28-31.
- Bordat A., Savois V., Nicolas M., Salse J., Chauveau A., Bourgeois M., Potier J., Houtin H., Rond C., Murat F., Marget P., Aubert G., Burstin J. Translational genomics in legumes allowed placing in silico 5460 unigenes on the pea functional map and identified candidate genes in *Pisum sativum* L. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2011, 1(2): 93-103 (doi: 10.1534/g3.111.000349).
- 41. Leonforte A., Sudheesh S., Cogan N.O., Salisbury P.A., Nicolas M.E., Materne M., Forster J.W., Kaur S. SNP marker discovery, linkage map construction and identification of QTLs for enhanced salinity tolerance in field pea (*Pisum sativum L.*). BMC Plant Biol., 2013, 13: 161 (doi: 10.1186/1471-2229-13-161).
- 42. Duarte J., Riviere N., Baranger A., Aubert G., Burstin J., Cornet L., Lavaud C., Lejeune - Henaut I., Martinant J.P., Pichon J.P., Pilet - Nay el M.L., Boutet G. Transcriptome sequencing for high throughput SNP development and genetic mapping in Pea. *Genomics*, 2014, 15: 126 (doi: 10.1186/1471-2164-15-126).
- 43. Sindhu A., Ramsay L., Sanderson L.A., Stonehouse R., Li R., Condie J., Shunmugam A.S.K., Liu Y., Jha A.B., Diapari M., Burstin J., Aubert G., Tar'an B., Bett K.E., Warkentin T.D., Sharpe A.G. Gene-based SNP discovery and genetic mapping in pea. *Theor. Appl. Genet.*, 2014, 127(10): 2225-2241 (doi: 10.1007/s00122-014-2375-y).
- 44. Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 1993, 4: 403-410 (doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.04020403.x).
- 45. Zhukov V.A., Kuznetsova E.V., Ovchinnikova E.S., Rychagova T.S., Titov V.S., Pinaev A.G., Borisov A.Y., Moffet M., Domoney C., Ellis T.H.N., Ratet P., Weeden N.F., Tikhonovich I.A Gene-based markers of pea linkage group V for mapping genes related to symbioses. *Pisum Genetics*, 2007, 39: 19-25.

- 46. Goodstein D.M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucl. Acids Res.*, 2012, 40(Database issue): D1178-D1186 (doi: 10.1093/nar/gkr944).
- 47. Zhukov V.A., Nemankin T.A., Ovchinnikova E.S., Kuznetsova E.V., Zhernakov A.I., Titov V.S., Grishina O.A., Sulima A.S., Borisov Ya.G., Borisov A.Yu., Tikhonovich I.A. Vsbornike: *Faktori eksperimental'noi evolyutsii organizmiv* [In: The factors of experimental evolution. V. 9]. Kiev, 2010. Tom 9: 30-34 (in Russ.).
- 48. N e m a n k i n T.A. Analiz geneticheskoi sistemy gorokha (Pisum sativum L.), kontroliruyushchei razvitie arbuskulyarnoi mikorizy i azotfiksiruyushchego simbioza. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii [Analysis of pea (Pisum sativum L.) genetic system which controls the development of arbuscular mycorrhiza and nitrogen-fixing symbiosis. PhD Thesis]. St. Petersburg, 2011 (in Russ.).
- 49. Titov V.S. Geneticheskoe kartirovanie simbioticheskikh genov gorokha posevnogo (Pisum sativum L.). Kvalifikatsionnaya rabota magistra [Genetic mapping of symbiotic genes in pea (Pisum sativum L.). Master's Thesis]. St. Petersburg, 2012 (in Russ.).
- 50. Kneen B.E., Weeden N.F., LaRue T.A. Non-nodulating mutants of *Pisum sativum* (L.) cv. Sparkle. J. Hered., 1994, 85(2): 129-133.
- 51. Krusell L., Madsen L.H., Sato S., Aubert G., Genua A., Szczyglowski K., Duc G., Kaneko T., Tabata S., de Bruijn F., Pajuelo E., Sandal N., Stougaard J. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptorlike kinase. *Nature*, 2002, 420(6914): 422-426 (doi: 10.1038/nature01207).
- like kinase. Nature, 2002, 420(6914): 422-426 (doi: 10.1038/nature01207).
  52. Borisov A.Y., Madsen L.H., Tsyganov V.E., Umehara Y., Voroshilo-va V.A., Batagov A.O., Sandal N., Mortensen A., Schauser L., Ellis N., Tikhonovich I.A., Stougaard J. The Sym35 gene required for root nodule development in pea is an ortholog of Nin from Lotus japonicus. Plant Physiol., 2003, 131: 1009-1017 (doi: 10.1104/pp.102.016071).
- 53. Lévy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ané J.M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C., Debellé F. A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*, 2004, 303(5662): 1361-1364 (doi: 10.1126/science.1093038).
- 54. Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J. The pea Sym37 receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2008, 21(12): 1600-1608 (doi: 10.1094/MPMI-21-12-1600).
- 55. Krusell L., Sato N., Fukuhara I., Koch B.E., Grossmann C., Okamoto S., Oka-Kira E., Otsubo Y., Aubert G., Nakagawa T., Sato S., Tabata S., Duc G., Parniske M., Wang T.L., Kawaguchi M., Stougaard J. The *Clavata2* genes of pea and *Lotus japonicus* affect autoregulation of nodulation. *The Plant Journal*, 2011, 65(6): 861-871 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04474.x).
- 56. Ovchinnikova E., Journet E.P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., Fedorova E., Liu W., Op den Camp R., Zhukov V., Tikhonovich I., Borisov A., Bisseling T., Limpens E. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2011, 24(11): 1333-1344 (doi: 10.1094/MPMI-01-11-0013).
- Couzigou J.M., Zhukov V., Mondy S., Abu el Heba G., Cosson V., Ellis T.H., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore K.S., Putterill J., Hofer J., Borisov A.Y., Ratet P. NODULE ROOT and COCHLEATA maintain nodule development and are legume orthologs of Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE genes. The Plant Cell, 2012, 24(11): 4498-4510 (doi: 10.1105/tpc.112.103747).
- 58. Varshney R.K., Close T.J., Singh N.K., Hoisington D.A., Cook D.R. Orphan legume crops enter the genomics era! *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2009, 12(2): 202-210 (doi: 10.1016/j.pbi.2008.12.004).
- 59. Zhukov V.A., Kulaeva O.A., Zhernakov A.I., Tikhonovich I.A. «Next Generation Sequencing» for studying transcriptome profiles of tissues and organs of garden pea (*Pisum sativ-um* L.) (review). *Agricultural Biology*, 2015, 50(3): 278-287 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.278eng) (in Engl.).
- Sudheesh S., Sawbridge T.I., Cogan N.O., Kennedy P., Forster J.W., Kaur S. De novo assembly and characterisation of the field pea transcriptome using RNA-Seq. *BMC Genomics*, 2015, 16: 611 (doi: 10.1186/s12864-015-1815-7).
- 61. Alves-Carvalho S., Aubert G., Carrère S., Cruaud C., Brochot A.L., Jacquin F., Klein A., Martin C., Boucherot K., Kreplak J., da Silva C., Moreau S., Gamas P., Wincker P., Gouzy J., Burstin J. 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. *The Plant Journal*, 2015, 84(1): 1-19 (doi: 10.1111/tpj.12967).
- 62. 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. *International Journal of Genomics*, 2015, article 695947 (doi: 10.1155/2015/695947).