Effective arbuscular mycorrhiza development between *Medicago lupulina* and *Rhizophagus irregularis* under conditions of different phosphorus levels in the substrate

Yurkov A.P.¹, Kryukov A.A.¹, Gorbunova A.O.^{1,2}, Mikhaylova Yu.V.³, Dobryakova K.S.³, Afonin A.M.¹, Kurbaniyazov Sh.K.², Rodionov A.V.³, Shishova M.F.²

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia; ²Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; ³Komarov Botanical Institute, Saint-Petersburg, Russia
E-mail: yurkovandrey@yandex.ru

Key message. The expressions of phosphate transport and carbohydrate metabolism genes in *Medicago lupulina* with and without *Rhizophagus irregularis* inoculation were evaluated. Differences in their transcript levels were found under conditions of different phosphorus levels in substrate.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, phosphate transport, carbohydrate metabolism, genetic model, *Medicago lupulina*, *Rhizophagus irregularis*

Detection of the mechanisms controlling the formation and development of efficient arbuscular mycorrhiza (AM) is an urgent task for symbiogenetics. The aim of the present study was to evaluate the expression of 10 genes of carbohydrate metabolism and phosphate transport in highly mycotrophic MLS-1 *M. lupulina* line with and without *R. irregularis* AM fungus inoculation at 6 key stages of host plant development. *M. lupulina* genome is not yet assembled, but preliminary results of the transcriptome analysis by MACE were successfully used to identify in *M. lupulina* the *M. truncatula* homologues of genes of interest. Several pairs of primers were selected for each gene, and effective ones were applied to estimate relative expression using the generally accepted $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. A reference gene was selected: *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *UBI* (ubiquitin), *EF1 α* (elongation factor 1- α) genes showed less stable expression in comparison with *Actin* (β -actin) during *M. lupulina* development, so β -actin was used to normalize the expression of genes of interest. The analysis showed specific expression of *MIATP1* (H^+ -ATPase 1) and *MIPT4* (phosphate transporter) genes in *M. lupulina* root cells with AM fungus under conditions of low and medium phosphorus (P) levels in the substrate. *MISUS2* (sucrose synthase 2) gene was characterized by significantly ($P<0.05$) higher expression in AM plants at the key stages of *M. lupulina* development (shooting stage, beginning of lateral branching and lateral branching) under conditions medium P level. *MISUS2* had lower expression under conditions of low P level. It is possible that *MISUS2* has a special role in the development of effective AM under conditions of medium phosphorus levels in the substrate. The research was supported by RFBR (18-016-00220, and partly 19-29-05275, 20-016-00245). The research was performed using equipment of the Core Center "Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology" in ARRIAM.

Формирование эффективной арбускулярной микоризы *Medicago lupulina* с *Rhizophagus irregularis* при различных уровнях фосфора в субстрате

Юрков А.П.¹, Крюков А.А.¹, Горбунова А.О.^{1,2}, Михайлова Ю.В.³, Добрякова К.С.³, Афонин А.М.¹, Курбаниязов Ш.К.², Родионов А.В.³, Шишова М.Ф.²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; ³Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Проведена оценка экспрессии генов фосфатного транспорта и углеводного метаболизма у *Medicago lupulina* при инокуляции и без инокуляции *Rhizophagus irregularis*. Выявлены различия в их работе при разных уровнях фосфора в субстрате.

Ключевые слова: арбускулярная микориза, транспорт фосфата, углеводный метаболизм, генетическая модель, *Medicago lupulina*, *Rhizophagus irregularis*

Выявление механизмов, контролирующих формирование и развитие эффективной арбускулярной микоризы (АМ), является актуальной задачей симбиогенетики. Целью работы была оценка экспрессии 10 генов углеводного метаболизма и фосфатного транспорта у растений сильно микотрофной линии MIS-1 *M. lupulina* при инокуляции и без инокуляции АМ-грибом *R. irregularis* в 6 ключевых фаз развития растения-хозяина. Геном *M. lupulina* еще не собран, но для работы были успешно использованы предварительные результаты транскриптомного анализа с помощью MACE, что позволило выявить у *M. lupulina* гены интереса гомологичные генам *M. truncatula*. Для каждого гена были подобраны несколько пар праймеров, из которых оставлены эффективные для оценки относительной экспрессии общепринятым методом $2^{-\Delta\Delta CT}$. Проведен подбор референсного гена: гены *GAPDH* (глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа), *UBI* (убиквитин), *EF1 α* (фактор элонгации 1 α) показали менее устойчивую экспрессию в сравнении с *Actin* (β -актин) в течение развития *M. lupulina*, поэтому для нормализации экспрессии генов интереса в работе использовали β -актин. Анализ показал специфическую экспрессию генов *MIATP1* (H^+ -зависимой АТФазы 1) и *MIPT4* (транспортера фосфата) в клетках корней *M. lupulina* с АМ-грибом в условиях низкого и среднего уровня фосфора (P) в субстрате. Ген *MISUS2* (сахарозсинтазы 2) в условиях среднего P характеризовался существенно ($P<0.05$) более высокой экспрессией в растениях с АМ в ключевые фазы развития *M. lupulina*: стеблевание, начало бокового ветвления и боковое ветвление. В условиях низкого уровня P ген *MISUS2* обладал более низкой экспрессией. Возможно, *MISUS2* играет особую роль в развитии эффективной АМ в условиях среднего уровня фосфора в субстрате. Работа была поддержана РФФИ (18-016-00220, и частично 19-29-05275 и 20-016-00245). Часть работы выполнена на оборудовании ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.