

Развитие эффективного арбускулярного микоризного симбиоза: особенности подбора растения и гриба

А.П. Юрков*, А.А. Крюков, Т.Р. Кудряшова, А.И. Горенкова, А.И. Ковальчук, А.И. Беляева

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

* ap.yurkov@arriam.ru

Цель: Разработка высокоэффективной растительно-микробной системы на основе отзывчивого на инокуляцию растения-хозяина и гриба арбускулярной микоризы. Задачи: 1) оценка влияния микоризации на метаболитом и транскриптом растения-хозяина, выявление основных путей развития эффективной арбускулярной микоризы; 2) создание коллекции штаммов грибов арбускулярной микоризы для формирования эффективных растительно-микробных систем, их идентификация и оценка симбиотической активности и эффективности.

Материалы и методы: Объектами исследования являются высокоотзывчивая на микоризацию линия MIS-1 *Medicago lupulina*, характеризующаяся высокой симбиотической эффективностью арбускулярной микоризы (АМ), и эффективный тестовый штамм RCAM00320 *Rhizophagus irregularis* (выделен в лаборатории № 4 ФГБНУ ВНИИСХМ). Проведен вегетационный эксперимент в условиях дефицита и оптимального уровня доступного для питания растений фосфора. Оценивали влияние микоризации на метаболитом и транскриптом растения-хозяина в ключевые фазы развития. Метаболитные профили получены с использованием масс-селективного детектора Agilent 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Анализ ГХ-МС данных был проведен с использованием программного обеспечения PARADISE. Метаболиты идентифицированы с использованием базы KEGG. Для анализа транскриптома использован метод MACE (Massive Analysis of cDNA Ends, массовый анализ концов кДНК). Прочтения сопоставлены с эталонным геномом. Дифференциальный анализ экспрессии генов проводился с использованием пакета DESeq2 в среде R (версия 4.1.1), только гены со скорректированным значением $p < 0.01$ считались экспрессирующимися с существенной разницей. Для присвоения функциональных категорий генам использовался онлайн-инструмент MapMan4. Группы генной онтологии (GO) получены с помощью программы eggNOG-mapper. Анализ обогащения GO проведен с использованием теста Колмогорова–Смирнова.

Проведен сбор изолятов грибов АМ в регионах РФ, выделение штаммов, идентификация грибов по регионам баркодирования ITS1 и ITS2 с применением Illumina MiSeq, оценка симбиотической эффективности (способ оценки запатентован автором, патент № 2776652 от 22.07.2022) и активности микоризации в растворе трипанового синего стандартными методами световой микроскопии и с применением разработанной авторами компьютерной программы для оценки индексов микоризации (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2016612112 от 18.02.2016).

Результаты: Анализ метаболитных профилей *M. lupulina* 327 первичных метаболитов показал, что ключевые АМ-индуцированные метаболитные перестройки происходят в фазу начала бокового ветвления. АМ позитивно регулирует биосинтез белка, углеводов, липидов. Влияние АМ на энергетический обмен имеет разнонаправленные тренды. В результате исследования среди метаболитов корней *M. lupulina* можно выделить следующие 14 маркеров развития эффективного АМ-симбиоза, характеризующихся апрегуляцией при дефиците и достаточном уровне Рд: гексоза RI = 1881, сложный сахар RI = 3273, трегалоза, глицерин, глицерин-3-фосфат, этаноламинфосфат, кампестерол, стеролы RI = 3260, RI = 3362, миоинозитол-2-фосфат, метилфосфат и фосфорная кислота. Существенная позитивная регуляция содержания фосфатов свидетельствует о том, что инокуляция АМ-грибом достоверно нивелировала влияние дефицита фосфора на растения. Негативными регуляторами развития эффективного АМ-симбиоза при обоих уровнях фосфора выступили янтарная и лимонная кислоты. В результате исследования экспрессии 44465 генов выявлено значительное число дифференциально экспрессируемых при микоризации генов, которое составило 3852 гена. Проведена их функциональная аннотация. Наибольшим числом генов с позитивной регуляцией при АМ обладали группы: 1) метаболизм аминокислот; 2) метаболизм углеводов; 3) метаболизм липидов; 4) биосинтез, гомеостаз, модификация белков; 5) окислительно-восстановительный гомеостаз; 6) биосинтез и процессинг РНК; 7) транспорт растворенных веществ. Самым отзывчивым вариантом с самым высоким уровнем позитивной регуляции был вариант при микоризации в фазу цветения при дефиците Рд в субстрате. Суммируя результаты исследований, отобраны ключевые гены, играющие роль в развитии эффективного АМ-симбиоза. С применением Illumina MiSeq проведена идентификация, оценка эффективности и активности вновь выделенных штаммов грибов АМ. Планируется сравнительный анализ влияния микоризации эффективным и неэффективным штаммом гриба АМ на метаболитом и транскриптом растения-хозяина.

Выводы: Проведен подбор сильно отзывчивого растения-хозяина и штаммов АМ-грибов разной эффективности для исследования механизмов развития эффективной АМ. Выявлены основные группы генов и метаболитов, принимающих участие в развитии эффективного АМ-симбиоза.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ 22-16-00064-П.