


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>


SWEET транспортеры *Medicago lupulina* в арбускулярно-микоризной системе в условиях среднего уровня доступного фосфора

А.А. Крюков¹ , А.О. Горбунова¹, Т.Р. Кудряшова^{1, 2}, О.Б. Иванченко², М.Ф. Шишова³, А.П. Юрков¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

 rainniar@rambler.ru

Аннотация. Грибы арбускулярной микоризы (АМ) помогают растениям усваивать из почвы минеральные вещества, особенно фосфор, в то время как получают от растений продукты фотосинтеза – сахара. Выявление генов, контролирующих симбиотическую эффективность АМ, может иметь практическое применение при создании высокопродуктивных растительно-микробных систем. Поэтому целью работы была оценка уровней экспрессии генов семейства транспортеров сахаров SWEET – единственного семейства, где могут быть обнаружены специфические для АМ-симбиоза транспортеры сахаров. Нами разработана уникальная высокочувствительная к уровню фосфора и микоризации модельная система «растение-хозяин–АМ-гриб», включающая высокоотзывчивую на инокуляцию АМ-грибами экологически облигатно микотрофную линию MIS-1 люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) и штамм АМ-гриба RCAM00320 *Rhizophagus irregularis*, обладающий высокой эффективностью на множестве видов растений. С использованием этой модельной системы в корнях растения оценены изменения в уровне экспрессии 11 генов, кодирующих транспортеры семейства SWEET, при развитии либо при отсутствии симбиоза *M. lupulina* с *R. irregularis* в различные фазы развития растения-хозяина в условиях среднего уровня доступного для питания растений фосфора в субстрате. У микоризованных растений обнаружены более высокие уровни экспрессии в большинстве фаз развития растения-хозяина для *MISWEET1b*, *MISWEET3c*, *MISWEET12*, *MISWEET13* по сравнению с контролем без АМ. Повышенная относительно контроля экспрессия при микоризации наблюдалась также и для *MISWEET11* в фазу развития 2-го и 3-го листьев, для *MISWEET15c* – в фазу стеблевания, для *MISWEET1a* – в фазу 2-го листа, стеблевания и бокового ветвления. Ген *MISWEET1b* с уверенностью можно считать хорошим маркером со специфической экспрессией для эффективного развития АМ-симбиоза *M. lupulina* с *R. irregularis* в условиях среднего уровня доступного для растений фосфора в субстрате. Ключевые слова: арбускулярная микориза; *Medicago lupulina*; *Rhizophagus irregularis*; SWEET; оценка экспрессии генов; гены транспортеров сахаров.

Для цитирования: Крюков А.А., Горбунова А.О., Кудряшова Т.Р., Иванченко О.Б., Шишова М.Ф., Юрков А.П. SWEET транспортеры *Medicago lupulina* в арбускулярно-микоризной системе в условиях среднего уровня доступного фосфора. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(3):189-196. DOI 10.18699/VJGB-23-25


SWEET transporters of *Medicago lupulina* in the arbuscular-mycorrhizal system in the presence of medium level of available phosphorus

А.А. Kryukov¹ , А.О. Gorbunova¹, Т.Р. Kudriashova^{1, 2}, О.Б. Ivanchenko², М.Ф. Shishova³, А.П. Yurkov¹

¹ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

 rainniar@rambler.ru

Abstract. Arbuscular mycorrhiza (AM) fungi receive photosynthetic products and sugars from plants in exchange for contributing to the uptake of minerals, especially phosphorus, from the soil. The identification of genes controlling AM symbiotic efficiency may have practical application in the creation of highly productive plant-microbe systems. The aim of our work was to evaluate the expression levels of SWEET sugar transporter genes, the only family in which sugar transporters specific to AM symbiosis can be detected. We have selected a unique “host plant–AM fungus” model system with high response to mycorrhization under medium phosphorus level. This includes a plant line which is highly responsive to inoculation by AM fungi, an ecologically obligate mycotrophic line MIS-1 from black medick (*Medicago lupulina*) and the AM fungus *Rhizophagus irregularis* strain RCAM00320, which has a high efficiency in a number of plant species. Using the selected model system, differences in the expression levels of 11 genes encoding SWEET transporters

in the roots of the host plant were evaluated during the development of or in the absence of symbiosis of *M. lupulina* with *R. irregularis* at various stages of the host plant development in the presence of medium level of phosphorus available for plant nutrition in the substrate. At most stages of host plant development, mycorrhizal plants had higher expression levels of *MISWEET1b*, *MISWEET3c*, *MISWEET12* and *MISWEET13* compared to AM-less controls. Also, increased expression relative to control during mycorrhization was observed for *MISWEET11* at 2nd and 3rd leaf development stages, for *MISWEET15c* at stemming (stooling) stage, for *MISWEET1a* at 2nd leaf development, stemming and lateral branching stages. The *MISWEET1b* gene can be confidently considered a good marker with specific expression for effective development of AM symbiosis between *M. lupulina* and *R. irregularis* in the presence of medium level of phosphorus available to plants in the substrate.

Key words: arbuscular mycorrhiza; *Medicago lupulina*; *Rhizophagus irregularis*; SWEET; gene expression assessment; sugar transporter genes.

For citation: Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Ivanchenko O.B., Shishova M.F., Yurkov A.P. SWEET transporters of *Medicago lupulina* in the arbuscular-mycorrhizal system in the presence of medium level of available phosphorus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):189-196. DOI 10.18699/VJGB-23-25

Введение

Растительные транспортеры сахаров относятся к трем ключевым семействам – Sucrose Transporters SUT (SUC), Monosaccharide Transporters – MST (включая подсемейства STP, TMT, PMT, VGT, pGlcT/SGB1, ESL, INT) и Sugars Will Eventually be Exported Transporters – SWEET. SUT транспортеры участвуют в загрузке флоэмы сахарозой и ее дальнем транспорте из листьев в другие части растения, где сахара расщепляются на моносахариды и транспортируются в клетки уже MST белками.

Наименее изученная группа – семейство транспортеров SWEET, которые являются энергонезависимыми и двунаправленными трансмембранными переносчиками различных сахаров во всех органах и тканях растений. В этом семействе транспортеров, впервые описанном в 2010 г. L.Q. Chen с коллегами, согласно современным представлениям, могут быть выявлены белки, специфичные для развития AM-симбиоза, в то время как среди представителей двух других семейств транспортеров сахаров специфичные для AM-симбиоза белки не найдены (Chen et al., 2010; Doidy et al., 2019). В настоящее время известно, что транспортеры SWEET встречаются у всех живых организмов (Feng et al., 2015). В то же время отмечается, что число изоформ этих транспортеров отличается даже у близких видов. Нумерация новых белков SWEET и их изоформ у других организмов проводится согласно их ортологии с белками у *Arabidopsis thaliana*.

В результате ранних исследований транспортеров оказалось, что гены *SWEET* растений, несмотря на низкую гомологию, группируются в четыре клады (Chen et al., 2015). Представители каждой из клад наблюдаются почти у всех наземных растений. Считается, что представители четырех клад разделяются не только филогенетически, но и функционально. Так, отмечают, что представители клады I и II этих белков транспортируют гексозы, клады III – в основном участвуют в транспорте сахарозы, и клады IV – преимущественно включены в процессы транспорта фруктозы (Chen et al., 2012; Feng et al., 2015).

Белки SWEET участвуют во множестве процессов. Кроме транспорта сахаров, по-видимому, они могут участвовать в транспорте и других веществ, например гиббереллинов, что было показано для арабидопсиса (Kanno et al., 2016). В литературе имеется много данных о функциях белков SWEET у разных видов растений. Например,

транспортер MtSWEET1b, возможно, снабжает глюкозой грибы AM (An et al., 2019), LjSWEET3 опосредует транспорт сахарозы (Sugiyama et al., 2017) к клубенькам *Lotus japonicus*. Вероятно, транспортеры SWEET клады I участвуют в снабжении сахарами симбиотических систем (Doidy et al., 2019). Патогены ризосферы могут вызывать повышенный синтез белков клады III, что приводит к дополнительному транспорту сахарозы в корни и способствует питанию ризосферных микроорганизмов (Doidy et al., 2019). В работе (Chen et al., 2010) показано, что патогенные бактерии, например, рода *Xanthomonas*, могут попадать в ткани растения-хозяина и индуцировать экспрессию генов *SWEET*, кодирующих транспортеры из клады III (в первую очередь, *SWEET11* и *SWEET14*), для получения сахаров. Подобно симбиотическим AM-грибам, патогенные грибы также способны индуцировать экспрессию генов для получения сахаров.

J. Manck-Gotzenberger и N. Requena (2016) отмечают, что гены многих транспортеров имеют значительный уровень экспрессии в AM-симбиозе, но при этом не являются специфическими для него. В работе (Kafle et al., 2019) продемонстрировано, что ортологи *SWEET1*, *MtSWEET1.2* и *PsSWEET1.2*, могут экспрессироваться как в микорризованных корнях, так и в корневых клубеньках. Поэтому ортологи транспортеров клады I (MtSWEET1-MtSWEET3) и III (MtSWEET9-MtSWEET15) в первую очередь рассматриваются как активные участники симбиотических отношений «растение–гриб AM» (Крюков и др., 2021).

Роль транспортеров SWEET в становлении симбиотических отношений еще не исследована на высокоэффективных растительно-микробных системах (ПМС) целенаправленно. Целью настоящей работы было оценить экспрессию генов *SWEET* в модельной ПМС при микорризации и отсутствии ее на разных этапах развития растения.

Материалы и методы

Растительный и грибной материал. Люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L. subsp. *vulgaris* Koch) – широко распространенный вид рода *Medicago*, самоопыляемый диплоид. В настоящем исследовании использована селекционированная авторами сильно отзывчивая на микорризацию линия MIS-1 из сортопопуляции ВИК32 люцерны хмелевидной (Yurkov et al., 2015). Растения этой линии проявляют признаки карликовости без инокуляции

АМ-грибом и при низком уровне доступного фосфора в почве (Рд) (Yurkov et al., 2015, 2020). Для инокуляции использовали эффективный штамм RCAM00320 АМ-гриба *Rhizophagus irregularis* (ранее известного как *Glomus intraradices* Shenck & Smith; штам CIAM8 из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии). Уточненная идентификация штамма проведена А.А. Крюковым и А.П. Юрковым (Крюков, Юрков, 2018). Поскольку АМ-грибы являются облигатными симбионтами, штамм поддерживается на накопительной культуре плектрантуса (*Plectranthus* sp., видовая идентификация растения в настоящее время уточняется авторами) при стандартных условиях в лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных микроорганизмов ВНИИСХМ (Юрков и др., 2010).

Вегетационный метод. Протокол метода описан в работе А.П. Юркова с коллегами (Yurkov et al., 2015). Оптимальные условия для развития АМ предотвращали спонтанное заражение клубеньковыми бактериями и другими микроорганизмами. Смесь почвы и песка в соотношении 2:1 дважды автоклавируют при 134 °С, 2 атм в течение 1 часа с повторным автоклавированием через двое суток; токсичность после такой обработки не возникала. Растения высаживали по два проростка на один сосуд, наполненный почвенно-песчаной смесью (210 г). Агротехническая характеристика почвы представлена в работе (Yurkov et al., 2015). Содержание P₂O₅ (по Кирсанову) в почве составляло 23 мг/кг почвы, до постановки опыта было добавлено 0.5 дозы фосфора в форме СаН₂РO₄*2Н₂O (86 мг/кг почвы) согласно прописи Д.Н. Прянишникова (Клечковский, Петербургский, 1967). Конечное содержание фосфора в почвенно-песчаной смеси составило 109 мг/кг и соответствовало среднему уровню Рд, т.е. обеспеченности почвы подвижными фосфатами по содержанию в выгужке Кирсанова, согласно (Соколов, 1975); рН_{KCl} – 6.44. Первый учет растений проводили на 21-е сутки от посадки и инокуляции с последующими учетами в ключевые стадии онтогенеза люцерны. Общее количество учетов – 7 (Приложение 1)¹.

Проанализированы растения, инокулированные и неинокулированные корнями плектрантуса, микоризованными штаммами RCAM00320 *R. irregularis*. При сборе материал замораживали в жидком азоте и хранили до 6 мес. при –80 °С.

Выделение РНК и оценка экспрессии генов интереса. Подбор генов интереса проведен на основе результатов анализа транскриптома *M. truncatula* (*MtSWEET1a* = Medtr1g029380, *MtSWEET1b* = Medtr3g089125, *MtSWEET2a* = Medtr8g042490, *MtSWEET2b* = Medtr2g073190, *MtSWEET2c* = Medtr6g034600, *MtSWEET3a* = Medtr3g090940, *MtSWEET3b* = Medtr3g090950, *MtSWEET3c* = Medtr1g028460, *MtSWEET4* = Medtr4g106990, *MtSWEET5a* = Medtr6g007610, *MtSWEET5b* = Medtr6g007637, *MtSWEET5c* = Medtr6g007623, *MtSWEET5d* = Medtr6g007633, *MtSWEET6* = Medtr3g080990, *MtSWEET7* = Medtr8g099730, *MtSWEET9a* = Medtr5g092600, *MtSWEET9b* = Medtr7g007490,

MtSWEET11 = Medtr3g098930, *MtSWEET12* = Medtr8g096320, *MtSWEET13* = Medtr3g098910, *MtSWEET14* = Medtr8g096310, *MtSWEET15a* = Medtr2g007890, *MtSWEET15b* = Medtr5g067530, *MtSWEET15c* = Medtr7g405730, *MtSWEET15d* = Medtr7g405710, *MtSWEET16* = Medtr2g436310; номера последовательностей – из базы данных <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) с последующим подбором последовательностей праймеров к генам интереса.

Для каждого гена тестировали три пары праймеров. На основании электрофореза и кривых плавления оценивали отсутствие второго продукта. Эффективность праймеров рассчитывали с помощью ПЦР-РВ (количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени) серийных разведений матрицы кДНК. В работу были приняты праймеры с эффективностью, равной или близкой к 100 %. Тест праймеров проводили для нескольких сроков учета (Приложение 2).

В 2022 г. соответствие и качество праймеров были проверены с использованием транскриптомных данных MIS-1 *M. lupulina* (MACE-секвенирование). Тотальная РНК из растительного материала выделена с применением тризольного метода с модификациями (MacRae, 2007). Качество обработки ДНКазой проверяли в ПЦР на РНК с референсным геном – актином – непосредственно перед синтезом кДНК. Синтез кДНК осуществлен с использованием набора реактивов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase в соответствии с протоколом производителя набора (Thermo Scientific, США). Для синтеза кДНК отобрано по ~1 мкг тотальной РНК. Качество кДНК проверено с помощью убиквитинового теста.

Изменения экспрессии генов оценены с применением метода ПЦР-РВ с использованием термоциклера реального времени BioRad CFX-96 (Bio-Rad, США) и набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I. Параметры циклов амплификации следующие: 95 °С, 5 мин, 1 цикл; 95 °С, 15 с, 60 °С, 30 с, 72 °С, 30 с, 40 циклов. Оценку специфичности амплификации проводили с использованием анализа кривых плавления. Изменения уровня экспрессии гена интереса в опыте сравнивали с уровнем экспрессии данного гена в контроле, анализ выполнен с применением 2^{-ΔΔCT} метода. Уровни генной экспрессии нормализованы с помощью выбранного референсного гена – актина, согласно (Yurkov et al., 2020). ПЦР-микс (10 мкл) содержал: 1 мкл 10х буфера В + SYBR Green, 1 мкл 2.5 мМ dNTP, 1 мкл MgCl₂ (25 мМ), 0.3 мкл каждого из пары праймеров (10 мМ для каждого праймера), 0.125 мкл (0.625 ед.) SynTaq ДНК-полимеразы (производитель компонентов микса – «Синтол», Россия), 4.275 мкл ddH₂O, 2 мкл кДНК образца. Проведена оценка относительных значений уровня экспрессии генов по кДНК для каждого образца (опыт – с АМ, контроль – без АМ). Биологическая повторность равна 3, техническая повторность – 4 измерения.

Оценка параметров симбиотической эффективности и активности. Для окрашивания образцов корней трипановым синим использован метод J.M. Phillips и D.S. Nauman (1970). Параметры активности АМ-гриба в корне, индексы микоризации рассчитаны согласно работе (Воробьев и др., 2016): *a* и *b* – обилие арбускул и ве-

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx7.pdf>

зикул в микоризированных частях корней соответственно, M – интенсивность развития АМ в корне, – имеют следующие расчетные формулы:

$$M = \frac{(95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + 1n_1)0\%}{N} \quad (1)$$

где n_5 – число полей зрения с классом плотности микоризы – $M=5$; n_4 – с $M=4$; n_3 – с $M=3$ и т.д.; M оценивается от 1 до 5 баллов: 1 балл: 0–1 % микоризы в корне в поле зрения микроскопа, 2 балла: 2–10 %, 3 балла: 11–50 %, 4 балла: 51–90 %, 5 баллов: 91–100 %.

$$a = \frac{(100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1)0\%}{100} \quad (2)$$

где $mA_i =$

$$= \frac{(95n_5mA_i + 70n_4mA_i + 30n_3mA_i + 5n_2mA_i + 1n_1mA_i)F\%}{M(N-n_0)} \quad (3)$$

где $n_i mA_j$ – число полей зрения с $M=i$; $A=j$; F – встречаемость микоризной инфекции (доля полей зрения с АМ по отношению к общему числу полей зрения в одном образце корней); N – общее число просмотренных полей зрения; n_0 – число полей зрения без АМ; n_i – число полей зрения с классом плотности микоризы от 1 до 5; A_i – класс плотности арбускул от 1 до 3.

$$b = \frac{(100mB_3 + 50mB_2 + 10mB_1)0\%}{100} \quad (4)$$

где $n_i mB_j$ – число полей зрения с $M=i$ и B (класс плотности везикул) = j рассчитываются аналогично расчету для арбускул (3); B_j – класс плотности арбускул от 1 до 3.

Симбиотическая эффективность АМ оценена как разница показателя продуктивности (сырой вес надземных частей) между вариантом с инокуляцией АМ («+АМ») и

контролем без АМ («безМ»), разделенная на значение в варианте «безМ», – стандартный расчет MGR (mycorrhizal growth response) (Kaur et al., 2022). Биологическая повторяемость при оценке параметров эффективности и активности АМ в каждом варианте – 8 растений.

Статистический анализ. Для сравнения различий всех показателей в качестве post-hoc теста использовали ANOVA и HSD-тест Тьюки ($p < 0.05$); также применяли t -критерий Стьюдента ($p < 0.05$) для оценки значимости различий средних значений уровня экспрессии генов между вариантами «+АМ» и «безМ».

Результаты

Результаты оценки симбиотической эффективности и параметров микоризации показали, что изучаемую симбиотическую тест-систему *Medicago lupulina* + *Rhizophagus irregularis* следует считать высокоэффективной (с высоким MGR) и симбиотически активной – с высокой микоризацией корней мицелием, арбускулами и везикулами – в условиях среднего уровня доступного для растений фосфора в субстрате.

Анализ данных по микоризации *M. lupulina* АМ-грибом *R. irregularis* показал, что интенсивность микоризации (М, рис. 1, б), как и обилие везикул (в, см. рис. 1, г) имели существенное снижение в фазу начала бокового ветвления (48 сут) при сохранении высоких параметров обилия арбускул (а, см. рис. 1, в) – основных симбиотических структур АМ и симбиотической эффективности (MGR), рассчитанной по сырому весу надземных частей (см. рис. 1, а).

Полученные данные по микроскопии и оценке MGR свидетельствуют в пользу того, что анализируемая высокоэффективная и активная РМС, обладающая ранним

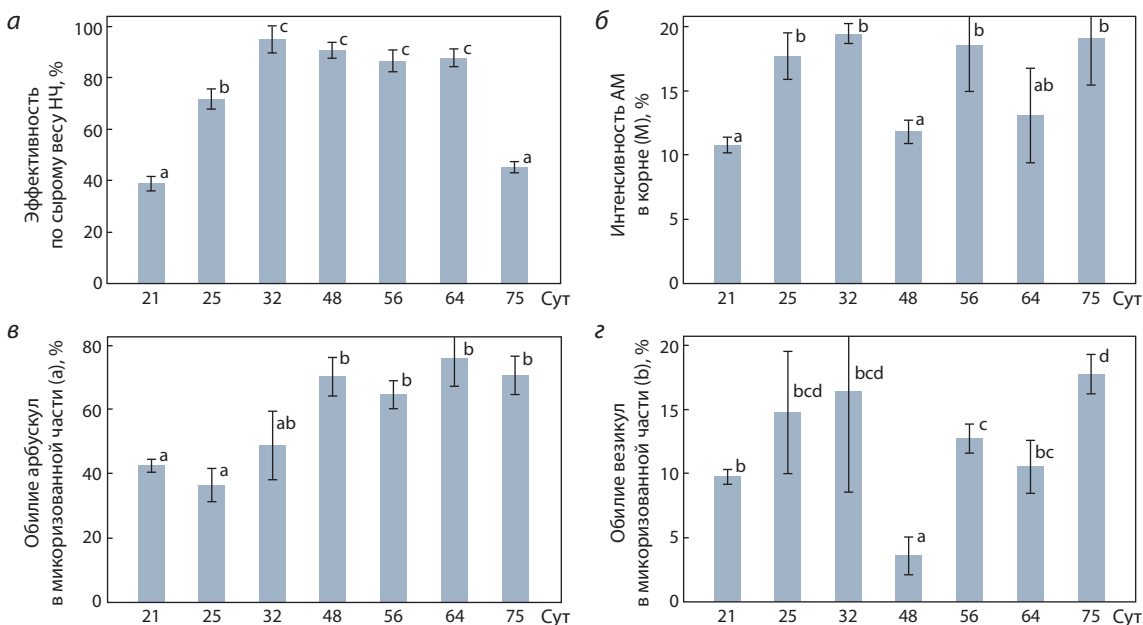


Рис. 1. Симбиотическая эффективность АМ, рассчитанная по сырому весу надземных частей (а); интенсивность микоризации (М, б); обилие арбускул (в) и обилие везикул (г), образуемых *R. irregularis* в корнях *M. lupulina*.

Представлены средние значения с ошибкой среднего; НЧ – надземные части; сут – сутки от посадки и инокуляции. Буквами а, б, с, д отмечены значения, имеющие достоверные ($p < 0.05$) различия. Достоверно не отличающиеся друг от друга значения обозначены одинаковыми буквами или сочетанием букв (ab, bcd, bc).

и пролонгированным откликом, может использоваться в качестве генетической модели для поиска и анализа генов-маркеров развития эффективного АМ-симбиоза с раннего этапа (фазы развития 2-го настоящего листа) до поздней фазы начала плодоношения в условиях среднего уровня Рд в субстрате. С этой целью проведено измерение экспрессии 11 генов семейства SWEET. Оценивали относительный уровень транскриптов (нормализованное значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$) в корнях *M. lupulina* с нормализацией к контролю без АМ (рис. 2).

Следует отметить, что у части генов не было выраженной разницы в вариантах с микоризой и без нее. Тем не менее результаты показали наличие генов, которые имели достоверно более высокую экспрессию при АМ в большинстве фаз развития растения-хозяина: *MISWEET3c*, *MISWEET1b*, *MISWEET12*, *MISWEET13*. Повышенная относительно контроля экспрессия при микоризации наблюдалась и для *MISWEET11* на 1-й и 2-й сроки анализа (в фазу развития 2-го и 3-го листа), для *MISWEET15c* – на 3-й срок в фазу стеблевания. Значительно более высокой экспрессией при микоризации обладали гены: *MISWEET1a* – на 1, 3 и 5-й сроки (в фазу 2-го листа, стеблевания и бокового ветвления соответственно) и *MISWEET1b* – на все 7 сроков учета, причем его экспрессия на 1, 2 и 7-й сроки (в фазу 2-го и 3-го листа и фазу начала плодоношения соответственно) была микоризоспецифической.

Обсуждение

Согласно полученным результатам, в корнях микоризованных растений *M. lupulina*, в сравнении с растениями без АМ, наблюдалась более высокая экспрессия генов семейства SWEET (см. рис. 2): в фазу 2-го листа (21-е сут) – у шести генов; в фазу начала стеблевания (25-е сут) – у трех генов; в фазу стеблевания (32-е сут) – у шести генов; в фазу начала бокового ветвления (48-е сут) – у трех генов; в фазу бокового ветвления (56-е сут) – у двух генов; в фазу начала цветения (64-е сут) – у трех генов; в фазу начала плодоношения (75-е сут) – у трех генов. Сниженной экспрессией в корнях растений с АМ характеризовались (см. рис. 2): на 21-е сутки – один ген; на 25-е сутки – пять генов; на 32-е сутки – один ген; на 4-е сутки – четыре гена; на 56-е сутки – восемь генов; на 64-е сутки – четыре гена; на 75-е сутки – два гена.

Исходя из этого, можно предположить, что в фазу стеблевания (32-е сут) становление и поддержание АМ требовало усиленного транспорта сахаров, что привело к повышенной экспрессии наибольшего числа (6) генов семейства SWEET в АМ и к сниженной экспрессии (лишь 1 гена) при микоризации, а фаза начала бокового ветвления (48-е сут) характеризовалась, наоборот, резким снижением экспрессии – наблюдалась повышенная экспрессия только у 3 генов при АМ, а количество генов с пониженной экспрессией возросло до 4. Фаза развития бокового ветвления стебля (56-е сут) сопровождалась еще более слабой экспрессией генов. Следует отметить, что наблюдаемая взаимосвязь с фазой развития растения-хозяина имела место и в наших исследованиях (Yurkov et al., 2021), в которых было показано, что роль фазы развития в формировании метаболизма растения выше, чем влияние собственно инокуляции эффективным грибом АМ в

условиях низкого Рд в субстрате. Это объясняет причину того, что анализ экспрессии генов был проведен с учетом сроков перехода растений в новую фазу развития.

В настоящем исследовании выявлено, что симбиотическая пара «линия MIS-1 *M. lupulina* + штамм RCAM00320 *R. irregularis*» сохраняет высокую эффективность в условиях среднего уровня Рд (см. рис. 1, а), хотя и меньшую, чем в условиях низкого Рд (Yurkov et al., 2020, 2021). Данная модельная РМС также сохраняет высокие параметры микоризации на протяжении всего развития от фазы развития 2-го листа до поздней фазы начала плодоношения, исключая снижение параметров интенсивности микоризации (М) и обилия везикул (b) в фазу начала бокового ветвления (см. рис. 1, б, в) на 48-е сут от момента посадки. Примечательно, что только в эту фазу наблюдалась более низкая относительная экспрессия у 8 из 11 изученных генов в корнях растений с АМ в сравнении с предыдущим сроком: *MISWEET1a*, *MISWEET1b*, *MISWEET3c*, *MISWEET11*, *MISWEET12*, *MISWEET13*, *MISWEET15c*, *MISWEET16* (см. рис. 2).

Исследования на низком уровне Рд в субстрате также показали существенные изменения в фазу начала бокового ветвления, но иного характера: к этому сроку наблюдалось развитие АМ-симбиоза с наибольшей эффективностью и существенными метаболическими перестройками (Yurkov et al., 2021).

В условиях среднего Рд в субстрате среди исследованных генов семейства SWEET, как правило, более высокой экспрессией при микоризации характеризовались лишь гены *MISWEET1b*, *MISWEET3c*, *MISWEET12*, *MISWEET13* (см. рис. 2).

Сведения о локализации и функции белков семейства SWEET в литературе пока недостаточны и противоречивы, но можно предполагать, что некоторые будут идентичными для гомологов между разными видами растений. Так, известно, что VfSWEET1 у *Vernicia fordii* обнаружен в листьях (Cao et al., 2019), SlSWEET1a – у *Solanum lycopersicum* – в молодых листьях и цветках (Ho et al., 2019), TaSWEET1b1-1B – у *Triticum aestivum* в стебле, StSWEET1h и StSWEET1i – в листьях, стеблях, корне, BrSWEET1b – у *Brassica rapa* в корне (Li et al., 2018); MtSWEET1b – у *M. truncatula* в семенах и клубеньках (Hu et al., 2019). Следует заметить, что экспрессия гена *SWEET1b* фиксируется в исследованиях в основном в надземных частях, тогда как в нашем исследовании его специфичность в АМ показана в корнях в условиях роста при среднем уровне фосфора в субстрате.

Продукты ортолога гена *MISWEET3c* локализованы в цветках, черешках листьев, бобах, стеблях, семенах, корнях и клубеньках у *M. truncatula* и переносят глюкозу (Hu et al., 2019), но, например, у *Lotus japonicus* они переносят сахарозу, но не глюкозу, по иным сведениям, – 2-дезоксиглюкозу (Sugiyama et al., 2017). Таким образом, не только локализация, но и функции белков семейства SWEET пока являются предметом дискуссий.

Продукты ортологов генов *MISWEET12* и *MISWEET13* переносят сахарозу у *S. lycopersicum* и *Manihot esculenta* (Cohn et al., 2014; Zhao et al., 2018). У *M. truncatula* MtSWEET13 обнаружен в цветках, листьях, черешках листьев, стеблях и семенах, MtSWEET12 – во всех орга-

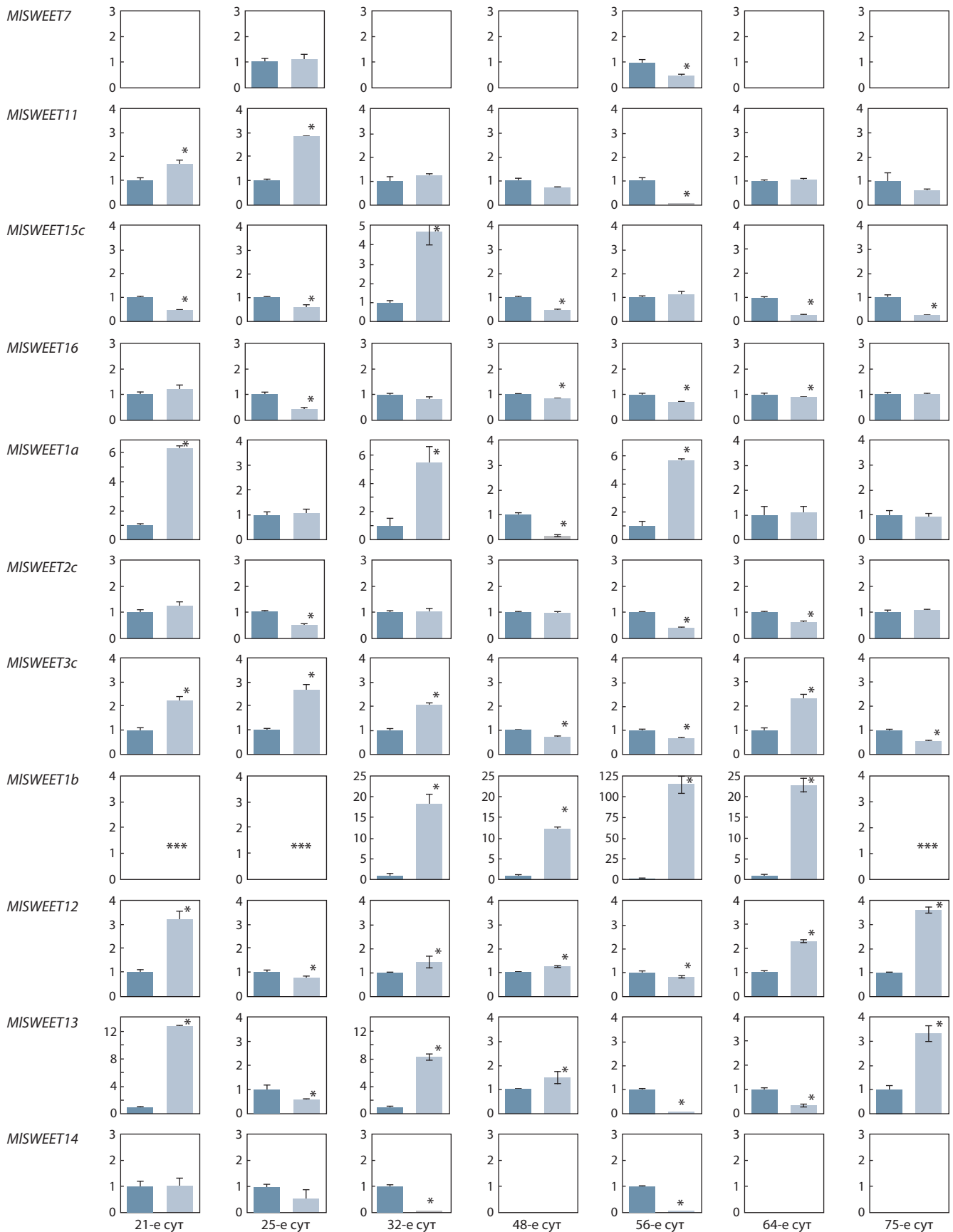


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов (нормализованное значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$) генов семейства SWEET в корнях *M. lupulina*.

Представлены средние значения с ошибкой среднего. * Наличие достоверных ($p < 0.05$) различий между вариантом «безМ» (темный столбик) и вариантом «+AM» с инокуляцией *R. irregularis* (светлый столбик); пустые диаграммы – отсутствие экспрессии генов в вариантах; сут – сутки от посадки. *** Специфическая экспрессия гена в варианте «+AM».

нах (Hu et al., 2019). Таким образом, мы наблюдаем, что транспортеры MISWEET12 и MISWEET13 – полифункциональны. Функции продуктов ортологов *MISWEET12* – отток сахарозы из листьев для загрузки флоэмы (Chen et al., 2012, 2015) и устойчивости к патогенам (Cohn et al., 2014; Zhao et al., 2018; Gautam et al., 2019). А функции продуктов ортологов *MISWEET13* – развитие пыльцы (Sun et al., 2013), устойчивость к патогенам (Cohn et al., 2014; Zhao et al., 2018), возможны отложение примексина, загрузка флоэмы (Chen et al., 2012; Gautam et al., 2019), а также транспорт гиббереллина (Kanno et al., 2016; Jeena et al., 2019).

В нашей работе на всех сроках учета *MISWEET1b* показал высокую экспрессию при микоризации (см. рис. 2). Этот ген с уверенностью можно считать хорошим маркером эффективного развития АМ-симбиоза *M. lupulina* с *R. irregularis* в условиях среднего уровня Рд в субстрате. Следует заметить, что *MISWEET1b* обладал специфической экспрессией в корнях при АМ на 1, 2 и 7-й сроки учета (в фазы развития 2-го и 3-го листьев и плодоношения) (см. рис. 2). Возможно, в начальные этапы (1–2-й срок) этот ген специфически экспрессировался для формирования эффективного АМ-симбиоза (для перераспределения сахаров в пользу микосимбионта), а на позднем этапе экспрессировался в связи с падением симбиотической эффективности при переходе к плодоношению, когда растение-хозяин опять нуждается в поддержании эффективного АМ-симбиоза для обеспечения созревания семян.

Таким образом, выявлена взаимосвязь между фазой развития растения-хозяина *M. lupulina* и фазой развития АМ-симбиоза с *R. irregularis* с экспрессией специфического гена *MISWEET1b* у растений с АМ. Наши данные согласуются с результатами исследований на других видах растений. Так, в последних работах (начиная с 2016 г.) ортологи гена *MISWEET1b* также упоминаются как симбиотические с АМ у *S. tuberosum* и *M. truncatula* (Manck-Götzenberger, Requena, 2016; An et al., 2019; Doidy et al., 2019; Kaffle et al., 2019; Cope et al., 2022). Также это отмечено для генов ортологов *MISWEET3c* у *Lotus japonicus* и *M. truncatula* (Sugiyama et al., 2017; Cope et al., 2022), ортологов *MISWEET12* у *S. tuberosum* и *M. truncatula* (Manck-Götzenberger, Requena, 2016; Hennion et al., 2019; Cope et al., 2022).

Исходя из результатов работы и анализа литературных данных, можно предполагать, что при различных биотических и абиотических условиях (например, при разном химическом составе субстрата, обеспечении влагой, светом и пр.) экспрессия и функции генов *SWEET* могут существенно различаться.

Заключение

Экспрессия генов семейства *SWEET* практически не изучалась при переходе растений от начала одной фазы развития к другой, как это сделано в настоящем исследовании. Анализ экспрессии этих генов в корнях высокоотзывчивой на микоризацию линии *M. lupulina* в условиях среднего уровня Рд в субстрате выполнен впервые. Результаты показали, что экспрессия гена *MISWEET1b* специфически возрастала при снижении симбиотической эффективности, рассчитанной по весу сырых надземных частей.

Вероятно, высокая экспрессия в АМ-растениях в ранние сроки развития связана с активным перераспределением сахаров при формировании эффективной АМ, а в фазу плодоношения – с потребностями сахаров для созревания семян. Более половины изученных генов, среди которых следует выделить *MISWEET3c* и *MISWEET12*, также показали повышение экспрессии. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что специфические для АМ гены семейства *SWEET* могут быть найдены среди генов клад I и III.

Учитывая разнообразие ортологов у других видов растений, есть основания считать, что пока идентифицированы не все гены семейства *SWEET* как у исследуемого нами растения, *M. lupulina*, так и у других видов рода *Medicago*. Следует полагать, что в дальнейшем будут расширены и представления о функциях данных транспортеров у этого рода.

Список литературы / References

- Воробьев Н.И., Юрков А.П., Проворов Н.А. Программа для расчета индексов микоризации корней растений. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2010612112. Зарегистр. 12.02.2016. М.: ФИПС, 2016.
[Vorob'ev N.I., Yurkov A.P., Provorov N.A. Program for calculating the mycorrhization indices of plant roots. Certificate No. 2010612112 of state registration of a computer program. December 2, 2016. Moscow, 2016. (in Russian)]
- Клечковский В.М., Петербургский А.В. Агрохимия. М.: Колос, 1967.
[Klechkovsky V.M., Petersburgsky A.V. Agrochemistry. Moscow: Kolos Publ., 1967. (in Russian)]
- Крюков А.А., Горбунова А.О., Кудряшова Т.Р., Яхин О.И., Лубянов А.А., Маликов У.М., Шишова М.Ф., Кожемяков А.П., Юрков А.П. Транспортеры сахаров семейства *SWEET* и их роль в арбускулярной микоризе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):754-760. DOI 10.18699/VJ21.086.
[Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Yakhin O.I., Lubyaynov A.A., Malikov U.M., Shishova M.F., Kozhemyakov A.P., Yurkov A.P. Sugar transporters of the *SWEET* family and their role in arbuscular mycorrhiza. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):754-760. DOI 10.18699/VJ21.086. (in Russian)]
- Крюков А.А., Юрков А.П. Оптимизация процедуры молекулярно-генетической идентификации грибов арбускулярной микоризы в симбиотическую фазу на примере двух близкородственных штаммов. *Микология и фитопатология*. 2018;52(1):38-48.
[Kryukov A.A., Yurkov A.P. Optimization procedures for molecular-genetic identification of arbuscular mycorrhizal fungi in symbiotic phase on the example of two closely kindred strains. *Mikologiya i Fitopatologiya* = *Mycology and Phytopathology*. 2018;52(1):38-48. (in Russian)]
- Соколов А.В. Агрохимические методы исследования почв. М.: Наука, 1975.
[Sokolov A.V. Agrochemical Methods of Soil Research. Moscow: Nauka Publ., 1975. (in Russian)]
- Юрков А.П., Шишова М.Ф., Семенов Д.Г. Особенности развития люцерны хмелевидной с эндомикоризным грибом. Саарбрюккен: LAP, 2010.
[Yurkov A.P., Shishova M.F., Semenov D.G. Features of the Development of Hop Clover with Endomycorrhizal Fungus. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2010. (in Russian)]
- An J., Zeng T., Ji C., Graaf S., Zheng Z., Xiao T., Deng X., Xiao S., Bisseling T., Limpens E., Pan Z. A *Medicago truncatula* *SWEET* transporter implicated in arbuscule maintenance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 2019;224(1):396-408. DOI 10.1111/nph.15975.

- Cao Y., Liu W., Zhao Q., Long H., Li Z., Liu M., Zhou X., Zhang L. Integrative analysis reveals evolutionary patterns and potential functions of SWEET transporters in Euphorbiaceae. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;139:1-11. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.102.
- Chen L.Q., Cheung L.S., Feng L., Tanner W., Frommer W.B. Transport of sugars. *Annu. Rev. Biochem.* 2015;84(1):865-894. DOI 10.1146/annurev-biochem-060614-033904.
- Chen L.Q., Hou B.H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M.L., Qu X.Q., Guo W.J., Kim J.G., Underwood W., Chaudhuri B., Chermak D., Antony G., White F.F., Somerville S.C., Mudgett M.B., Frommer W.B. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature.* 2010;468(7323):527-532. DOI 10.1038/nature09606.
- Chen L.Q., Qu X.Q., Hou B.H., Sosso D., Osorio S., Fernie A.R., Frommer W.B. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science.* 2012;335(6065):207-211. DOI 10.1126/science.1213351.
- Cohn M., Bart R.S., Shybut M., Dahlbeck D., Gomez M., Morbitzer R., Hou B.H., Frommer W.B., Lahaye T., Staskawicz B.J. *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2014;27(11):1186-1198. DOI 10.1094/MPMI-06-14-0161-R.
- Cope K., Kafle A., Yakha J., Pfeffer P., Strahan G., Garcia K., Subramanian S., Bücking H. Physiological and transcriptomic response of *Medicago truncatula* to colonization by high- or low-benefit arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 2022;32(3-4):281-303. DOI 10.1007/s00572-022-01077-2.
- Doidy J., Vidal U., Lemoine R. Sugar transporters in Fabaceae, featuring SUT MST and SWEET families of the model plant *Medicago truncatula* and the agricultural crop *Pisum sativum*. *PLoS One.* 2019;14(9):e0223173. DOI 10.1371/journal.pone.0223173.
- Feng C.Y., Han J.X., Han X.X., Jiang J. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato. *Gene.* 2015;573(2):261-272. DOI 10.1016/j.gene.2015.07.055.
- Gautam T., Saripalli G., Gahlaut V., Kumar A., Sharma P.K., Balyan H.S., Gupta P.K. Further studies on sugar transporter (SWEET) genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Biol. Rep.* 2019;46:2327-2353. DOI 10.1007/s11033-019-04691-0.
- Hennion N., Durand M., Vriet C., Doidy J., Maurousset L., Lemoine R., Portau N. Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Physiol. Plant.* 2019;165(1):44-57. DOI 10.1111/ppl.12751.
- Ho L.H., Klemens P.A.W., Neuhaus H.E., Ko H.Y., Hsieh S.Y., Guo W.J. SISWEET1a is involved in glucose import to young leaves in tomato plants. *J. Exp. Bot.* 2019;70(12):3241-3254. DOI 10.1093/jxb/erz154.
- Hu B., Wu H., Huang W., Song J., Zhou Y., Lin Y. SWEET gene family in *Medicago truncatula*: genome-wide identification, expression and substrate specificity analysis. *Plants.* 2019;8(9):338. DOI 10.3390/plants8090338.
- Jeena G.S., Kumar S., Shukla R.K. Structure, evolution and diverse physiological roles of SWEET sugar transporters in plants. *Plant Mol. Biol.* 2019;100(4-5):351-365. DOI 10.1007/s11103-019-00872-4.
- Kafle A., Garcia K., Wang X., Pfeffer P.E., Strahan G.D., Bücking H. Nutrient demand and fungal access to resources control the carbon allocation to the symbiotic partners in tripartite interactions in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ.* 2019;42(1):270-284. DOI 10.1111/pce.13359.
- Kanno Y., Oikawa T., Chiba Y., Ishimaru Y., Shimizu T., Sano N., Koshihara T., Kamiya Y., Ueda M., Seo M. AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nat. Commun.* 2016;7:13245. DOI 10.1038/ncomms13245.
- Kaur S., Campbell B.J., Suseela V. Root metabolome of plant-arbuscular mycorrhizal symbiosis mirrors the mutualistic or parasitic mycorrhizal phenotype. *New Phytol.* 2022;234(2):672-687. DOI 10.1111/nph.17994.
- Li X., Si W., Qin Q., Wu H., Jiang H. Deciphering evolutionary dynamics of SWEET genes in diverse plant lineages. *Sci. Rep.* 2018;8(1):13440. DOI 10.1038/s41598-018-31589-x.
- MacRae E. Extraction of plant RNA. *Methods Mol. Biol.* 2007;353:15-24. DOI 10.1385/1-59745-229-7:15.
- Manck-Gotzenberger J., Requena N. Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Front. Plant Sci.* 2016;7:487. DOI 10.3389/fpls.2016.00487.
- Phillips J.M., Hayman D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1970;55(1):158-161. DOI 10.1016/S0007-1536(70)80110-3.
- Sugiyama A., Saida Y., Yoshimizu M., Takanashi K., Sosso D., Frommer W.B., Yazaki K. Molecular characterization of LjSWEET3, a sugar transporter in nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 2017;58(2):298-306. DOI 10.1093/pcp/pcw190.
- Sun M.X., Huang X.Y., Yang J., Guan Y.F., Yang Z.N. *Arabidopsis* R_{PGI} is important for primexine deposition and functions redundantly with R_{PG2} for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant Reprod.* 2013;26(2):83-91. DOI 10.1007/s00497-012-0208-1.
- Yurkov A.P., Jacobi L.M., Gapeeva N.E., Stepanova G.V., Shishova M.F. Development of arbuscular mycorrhiza in highly responsive and mycotrophic host plant – black medick (*Medicago lupulina* L.). *Russ. J. Dev. Biol.* 2015;46:263-275. DOI 10.1134/S1062360415050082.
- Yurkov A., Kryukov A., Gorbunova A., Sherbakov A., Dobryakova K., Mikhaylova Y., Afonin A., Shishova M. AM-induced alteration in the expression of genes, encoding phosphorus transporters and enzymes of carbohydrate metabolism in *Medicago lupulina*. *Plants.* 2020;9(4):486. DOI 10.3390/plants9040486.
- Yurkov A.P., Puzanskiy R.K., Avdeeva G.S., Jacobi L.M., Gorbunova A.O., Kryukov A.A., Kozhemyakov A.P., Laktionov Y.V., Kosulnikov Y.V., Romanyuk D.A., Yemelyanov V.V., Shavarda A.L., Kirpichnikova A.A., Smolikova G.N., Shishova M.F. Mycorrhiza-induced alterations in metabolome of *Medicago lupulina* leaves during symbiosis development. *Plants.* 2021;10(11):2506. DOI 10.3390/plants10112506.
- Zhao D., You Y., Fan H., Zhu X., Wang Y., Duan Y., Xuan Y., Chen L. The role of sugar transporter genes during early infection by root-knot nematodes. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(1):302. DOI 10.3390/ijms19010302.

ORCID ID

A.A. Kryukov orcid.org/0000-0002-8715-6723
A.O. Gorbunova orcid.org/0009-0002-5624-1244
T.R. Kudriashova orcid.org/0000-0001-5120-7229
M.F. Shishova orcid.org/0000-0003-3657-2986
A.P. Yurkov orcid.org/0000-0002-2231-6466
O.B. Ivanchenko orcid.org/0000-0002-1311-1258

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ, 20-016-00245_A (оценка экспрессии генов семейства SWEET, оценка параметров продуктивности и симбиотической эффективности), РФФИ, 19-29-05275_мк (оценка параметров микорризации) и РНФ, № 22-16-00064 (подбор и проверка применимости использования праймеров к генам интереса).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.09.2022. После доработки 01.12.2022. Принята к публикации 01.12.2022.