

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
(СПбГУ)

Биолого-почвенный факультет
Кафедра генетики и селекции

Юрков

Андрей Павлович

**ПОЛИМОРФИЗМ ЛЮЦЕРНЫ ХМЕЛЕВИДНОЙ (*Medicago lupulina*)
ПО ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОЗА С ЭНДОМИКОРИЗНЫМ
ГРИБОМ *Glomus intraradices***

Магистерская диссертация

Работа выполнена на базе

Лаборатории экологии симбиотических и
ассоциативных микроорганизмов ГНУ

ВНИИ сельскохозяйственной
микробиологии РАСХН

Научный руководитель:

н.с. лаборатории экологии симбиотических
и ассоциативных микроорганизмов ГНУ

ВНИИ сельскохозяйственной
микробиологии РАСХН Л.М. Якоби

Куратор:

с.н.с. каф. генетики и селекции

к.б.н. Н.А. Проворов

Санкт-Петербург, 2004

СОДЕРЖАНИЕ	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. Арбускулярная микориза как генетическая система.	
Обзор литературы.....	7
1.1. Микориза.....	7
1.2. Филогения и генетика эндомикоризных грибов.....	10
1.3. Развитие арбускулярной микоризы.....	12
1.4. Генетические исследования арбускулярной микоризы.....	17
1.5. Метаболическая интеграция растений и АМ-грибов.....	21
1.6. Эффективность арбускулярной микоризы.....	25
ГЛАВА II. Материалы и методы.....	27
2.1. Растительный материал.....	27
2.2. Грибной материал.....	29
2.3. Вегетационный метод.....	29
2.3.1. Агрехимическая характеристика почвы.....	29
2.3.2. Постановка экспериментов.....	30
2.3.3. Оценка продуктивности.....	31
2.3.4. Оценка симбиотической эффективности.....	31
2.4. Метод оценки растительных морфотипов озимых форм.....	32
2.5. Оценка показателей микоризообразования.....	33
2.5.1. Методика мацерации и окрашивания корней.....	33
2.5.2. Методика оценки интенсивности микоризообразования с использованием световой микроскопии.....	34
2.6. Статистический анализ результатов.....	36
ГЛАВА III. Результаты исследований.....	37
3.1. Оценка различий между формами люцерны хмелевидной разного происхождения по симбиотическим свойствам.....	37
3.1.1. Показатели микоризообразования.....	37
3.1.2. Показатели продуктивности.....	39
3.2. Выявление внутривидового полиморфизма люцерны хмелевидной по симбиотической эффективности.....	44

3.2.1. Статистические параметры изменчивости показателей продуктивности..	44
3.2.1.1. Коэффициенты вариации.....	44
3.2.1.2. Коэффициенты асимметрии и эксцесса.....	46
3.2.2. Статистические параметры изменчивости показателей микоризообразования.....	49
3.2.2.1. Коэффициенты вариации.....	49
3.2.2.2. Коэффициенты асимметрии и эксцесса.....	50
3.2.3. Оценка морфотипических показателей озимых образцов люцерны хмелевидной.....	52
3.2.4. Корреляционный анализ взаимосвязей между продуктивностью растений люцерны хмелевидной и микоризообразованием.....	54
3.2.4.1. Коэффициенты корреляции.....	54
3.2.4.2. Корреляционные отношения.....	57
3.3. Выделение контрастных по отзывчивости на инокуляцию <i>Gl. intraradices</i> генотипов люцерны хмелевидной.....	60
3.3.1. Отбор контрастных по продуктивности генотипов из 4-х образцов люцерны хмелевидной.....	60
3.3.2. Анализ отзывчивости на инокуляцию <i>Gl. intraradices</i> контрастных по продуктивности генотипов сорта ВИК32.....	60
3.3.3. Выделение немикоризируемой формы из популяции Павловская.....	66
ГЛАВА IV. Обсуждение.....	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	74
ВЫВОДЫ.....	76
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	78
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	90

Список используемых сокращений

АМ – арбускулярная микориза

АМГ – арбускулярный эндомикоризный гриб

-АМ – вариант без инокуляции растений АМГ (контрольный вариант)

+АМ – вариант растений с инокуляцией АМГ (опытный вариант)

Рд – доступные для питания растений формы фосфора

X_{+AM} – показатели продуктивности растений с микоризой

X_{-AM} – показатели продуктивности растений без микоризы

X_m – среднее значение показателя продуктивности растений

ВВЕДЕНИЕ

*“Land plants never had an independence (from fungi);
for if they had, they could never have colonized the land.”
Pirozynski and Malloch, 1975*

Взаимодействия растений с симбиотическими микроорганизмами – фундаментальное свойство растений, которое определяет их экологический потенциал и высокую продуктивность. Эти взаимодействия осуществляются путем перекрестной регуляции генов – сигнальных взаимодействий. Такая генетическая интеграция приводит к развитию новых структур и к объединению метаболических систем партнеров симбиоза, изучение которых составляет предмет симбиогенетики (И.А. Тихонович, Н.А. Проворов, 2004).

Для ведения устойчивого сельского хозяйства необходимо поддерживать симбиотические растительно-микробные взаимосвязи в агробиоценозах, направленные на реализацию естественного адаптивного потенциала растений.

Актуальность темы исследования

Арбускулярная микориза (АМ) является наиболее широко распространенной формой растительно-микробных взаимодействий (D.P. Schachtman et al., 1998). В ее образовании участвуют грибы типа *Glomeromycota* и большинство наземных растений. В основе отношений между макро- и микросимбионтом лежит обмен продуктами метаболизма, в результате которого гриб получает углеводы, а растение получает фосфор, азот, калий, цинк, медь, другие элементы, а также воду. АМ положительно влияет на продуктивность растений также и за счет оптимизации гормонального статуса растений, их защиты от патогенов и абиотических стрессов.

До настоящего времени генетический анализ АМ со стороны грибов крайне затруднен в связи с их неспособностью к самостоятельному развитию. Поэтому генетический анализ симбиоза со стороны растения-хозяина особенно актуален. К настоящему времени изучение проводили на ограниченном круге растений. Выявлен ряд генов, контролирующих различные стадии развития АМ. В то же

время нет данных по генетическому контролю симбиотической эффективности – способности растений повышать продуктивность за счет взаимодействия с АМ-грибом. Селекция растений на повышение симбиотической эффективности также не проводилась. Для решения поставленной проблемы, в первую очередь, необходимо подобрать объекты исследования, в качестве которых могут использоваться контрастные по симбиотической эффективности генотипы растений. Особый интерес представляют природные формы с отклонениями в развитии микоризы, а также облигатно симбиотрофные генотипы растений.

Настоящее исследование направлено на решение одной из фундаментальных проблем биологии микоризы, связанной с поиском модельных объектов для изучения генетических и молекулярных механизмов, контролирующих эффективность микоризного симбиоза. Раскрытие данных механизмов будет способствовать дальнейшему развитию симбиогенетики, а также применению АМ в сельском хозяйстве при селекции высокопродуктивных сортов растений.

В качестве объекта исследования выбрана люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L.) как одна из наиболее широко распространенных форм рода *Medicago*. Этот вид является самоопылителем, диплоидом, т.е. он удобен для получения линейного материала. Кроме того, этот вид бобовых отличается высокой семенной продуктивностью, используется в качестве сидератов и возделывается как пастбищная и кормовая культура (Г.В. Степанова, 1998). Люцерна хмелевидная подходит для получения линейного материала.

Как показал анализ литературных данных, исследования АМ с использованием контрастных по эффективности близкородственных генотипов растений не проводились. Поэтому подходы, предложенные в настоящей работе, позволят получить качественно новую информацию о факторах, влияющих на взаимодействие между макро-, микросимбионтом и средой.

Цель и задачи работы

Целью настоящего исследования является изучение полиморфизма люцерны хмелевидной по отзывчивости на инокуляцию эндомикоризным грибом *Glomus intraradices*.

Задачи работы:

1. Оценка различий между формами люцерны хмелевидной разного происхождения по эффективности симбиоза с эндомикоризным грибом и структуре микоризы;
2. Выявление внутривидового полиморфизма по эффективности симбиоза люцерны хмелевидной с эндомикоризным грибом;
3. Выделение контрастных по отзывчивости на инокуляцию *Gl. intraradices* генотипов люцерны хмелевидной.

Научная значимость работы

Результаты настоящего исследования будут способствовать решению фундаментальной проблемы биологии микоризы, связанной с изучением механизмов, регулирующих эффективность симбиотических отношений со стороны растения-хозяина. Контрастные генотипы, полученные из наиболее полиморфных по эффективности образцов люцерны хмелевидной, могут быть использованы в генетическом и молекулярном анализе развития и функционирования АМ симбиоза.

Практическая значимость работы

Данные по изменчивости люцерны представляют интерес при отборе линий с высокой симбиотической эффективностью. Полученные контрастные формы могут быть использованы при создании высокопродуктивных симбиотических систем «растения-микроорганизмы». Использование сортов с высокой симбиотической активностью позволит снизить нормы минеральных удобрений и сделать производство сельскохозяйственной продукции экологически безопасным.

ГЛАВА I. Арбускулярная микориза как генетическая система

Обзор литературы

1.1. Микориза

Микориза - это симбиоз, образуемый растениями и грибами, которые колонизируют корни или другие подземные органы. Это наиболее широко распространенная группа микробно-растительных взаимодействий: способностью к образованию той или иной формы микоризы обладает 80-90% видов наземных растений. Микоризные симбиозы разделяют на два типа: эндомикоризу и эктомикоризу. При образовании эктомикоризы большая часть мицелия остается вне растения, а гифы гриба, хотя и колонизируют наружные ткани кортекса, не инфицируют растительные клетки. В случае эндомикоризы большая часть грибного мицелия находится внутри корня, обычно колонизируя все слои кортекса и проникая внутрь растительных клеток. Самой изученной формой эндомикоризы является арбускулярная микориза (АМ).

АМ (Рис. №1) – это наиболее широко-распространенная и экологически значимая форма растительно-микробных взаимодействий (D.P. Schachtman et al., 1998). В ее образовании участвуют грибы типа Glomeromycota (A. Schüßler et al., 2001) и около 75% наземных растений (B. Mosse et al., 1981; J.L. Harley, E.L. Harley, 1987; C. Renker et al., 2003).

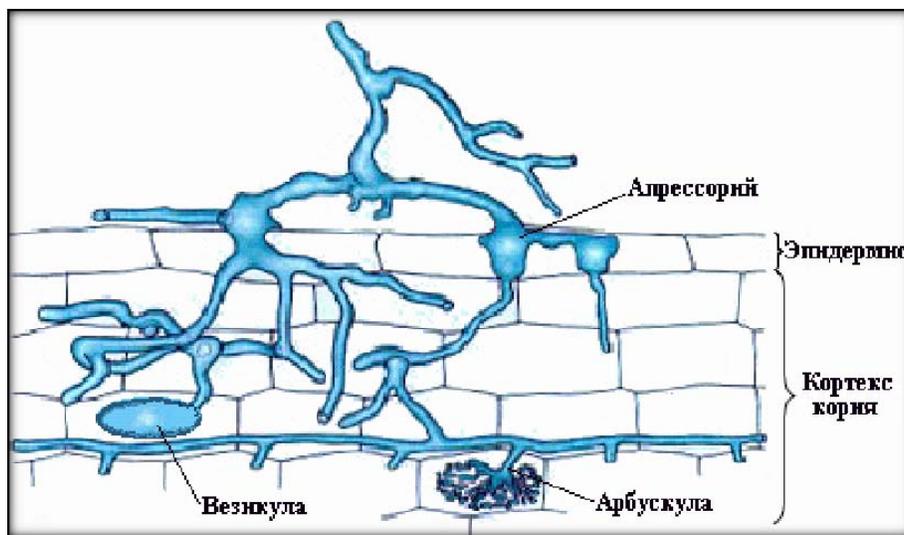


Рис. №1. Схема проникновения и развития эндомикоризного гриба в корне (E. Wegel et al., 1998)

Вследствие своей высокой адаптивной способности АМ повсеместно распространена от альпийской и полярной зон до тропических лесов и саванн. Она является источником биоразнообразия фитоценозов (M.G.A. van der Heijden et al., 1998). По мнению И.В. Каратыгина (1993) на ее долю приходится не менее 20% объема круговорота веществ в наземных экосистемах.

В сельском хозяйстве АМ является естественной альтернативой внесению больших количеств удобрений, в первую очередь фосфорных (т.е. АМ выступает в качестве биоудобрения), и может быть использована для восстановления нарушенных естественных экосистем (R.M. Miller, J.D. Jastrow, 1992; R.G. Linderman, 1994; S. Gianinazzi, H. Schüepp, 1994). АМ имеет исключительную важность в продуктивности растений, а также играет ключевую роль в том, что мы сейчас называем “устойчивым сельским хозяйством” (G.J. Bethenfalvay, 1992; S. Gianinazzi, H. Schüepp, 1994; D.J. Read, 2002). Ведение устойчивого сельского хозяйства на современном этапе развития предполагает селекцию растений с высокой симбиотической активностью, которая обуславливает высокие адаптивные способности симбионтов. Так, согласно литературным данным имеет место общестимулирующее влияние арбускулярных микориз, в результате которого значительно возрастает урожайность сельскохозяйственных культур (Г.Н. Маршунова и др., 1988). АМ оказывает оздоравливающий эффект, защищая от корневых патогенов (H.W. Dehne, 1982; M. Caron, 1989; K.K. Newsham et al., 1995; R. Kjoller, S. Rosendahl, 1996; J.F. Marsh et al., 2001). АМ снижает заболеваемость растений за счет действия двух механизмов: 1. устранение патогенна путем синтеза антибиотиков или при конкуренции за субстрат; 2. индукция иммунных реакций у растения-хозяина (R.G. Linderman, 1994).

Арбускулярная микориза изменяет фитогормональный статус растений, влияя на содержание ауксинов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и цитокининов (M.F. Allen et al., 1980; G. Danneberg et al., 1992; M.F. Allen et al., 1982). Однако механизм этого влияния (синтез фитогормонов грибом или изменение их растительного синтеза) пока не ясен.

Исследования фотосинтетического аппарата продемонстрировали влияние арбускулярной микоризы на активность фотосистемы II (M. Tsimilli-Michael, R.J.

Strasser, 2002). Таким образом, АМ следует считать полифункциональной структурой: она оказывает плейотропное действие на растение-хозяина, в результате которого у микоризных растений повышаются адаптивные и конкурентные качества по сравнению с растениями без АМ.

Отметим важную особенность АМ – для АМ-грибов свойственна низкая специфичность по отношению к растению-хозяину, один и тот же вид эндомикоризного гриба способен вступать в симбиотические отношения с большим числом видов растений (S.E. Smith, D.J. Read, 1997). По мнению D.J. Read (2002) АМ-грибы (АМГ) обладают высокой приспособляемостью к различным экологическим условиям. Они хорошо развиваются в широком интервале кислотности почвы, температуры, влажности и аэрации (Г.С. Муромцеву, 1992). Но для большинства АМ-грибов образование микоризы является генетически облигатной стадией жизненного цикла: вне растения они стабильно существуют только в форме покоящихся спор. Прорастание этих спор может быть индуцировано *ex planta* (в том числе и на искусственных средах), однако возникающие гифы не могут формировать стабильный мицелий или споры.

Для растений АМ-симбиоз является, как правило, “экологически облигатным” (S.E. Smith, D.J. Read, 1997), то есть не обязательным для прохождения онтогенеза, но необходимым для выживания в типичных для данного растения экологических условиях. Наиболее важен этот симбиоз для деревянистых и кустарниковых форм, а также для растений со слабо развитой системой корневых волосков и с низкой поглотительной способностью корней. Безмикоризные растения - это, как правило, травы с коротким жизненным циклом и хорошо развитыми корневыми волосками. Среди цветковых наиболее высока встречаемость безмикоризных видов у крестоцветных (87%), осоковых (74%), маревых (61%), синтниковых (56%), гвоздичных (50%) и гречишных (37%).

1.2. Филогения и генетика эндомикоризных грибов

Классификация АМ-грибов (АМГ) традиционно проводилась на основании анализа морфологических особенностей вегетативных спор: размер, форма,

окраска, характер прикрепления к несущей гифе, толщина и структура клеточной стенки (Schenck, N.C. Pérez, Y., 1988). Было выделено по разным источникам от 149 до 168 видов АМГ (Schenck, N.C. Pérez, Y., 1988; J.O. Siqueira et al., 2002). Согласно классификации по морфологии спор к АМГ относили грибы полифилетической группы – типа Zygomycota класса Zygomycetes порядка Glomales (Селиванов И.А., 1978; J.L. Harley, E.L. Harley, 1987). На Рис. №2 представлена схема филогении грибов порядка Glomales (<http://invam.caf.wvu.edu>).

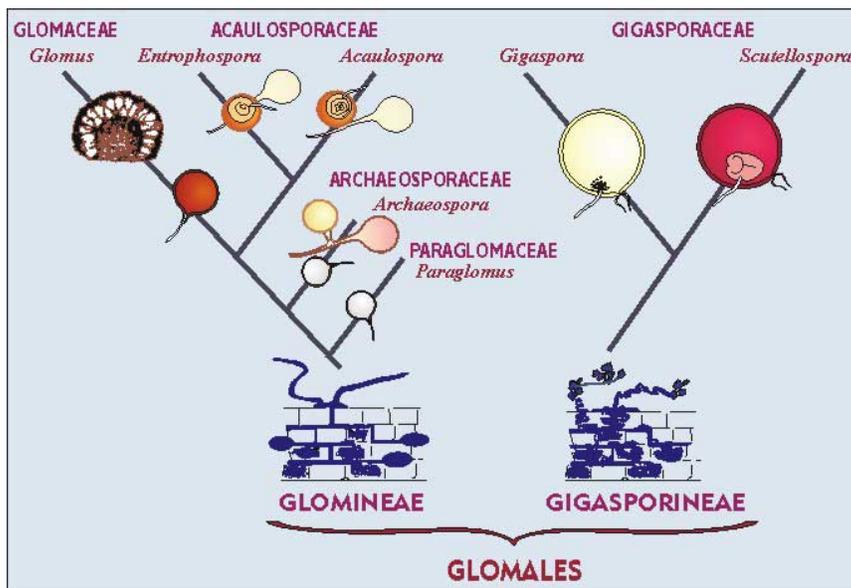


Рис. №2. Классификация грибов порядка Glomales (<http://invam.caf.wvu.edu>)

Однако результаты молекулярных исследований 18S рРНК показали, что АМГ следует выделять в отдельный новый монофилетический таксон – тип Glomeromycota (A. Schüßler et al., 2001; C. Renker et al., 2003). Новые схемы филогении АМГ представлены на Рис. №№3 и 4.

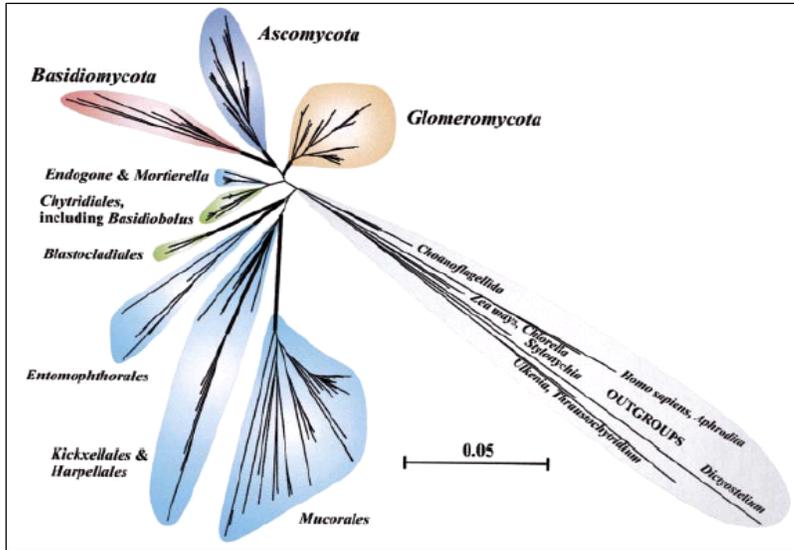


Рис. №3. Филогения грибов, основанная на сиквенсах 18S рРНК (А. Schüßler et al., 2001). Толстые линии описывают клады. Zygomycota и Chytridiomycota не формируют монофилетических групп и поэтому показаны как соответствующие таксоны, представляющие клад.

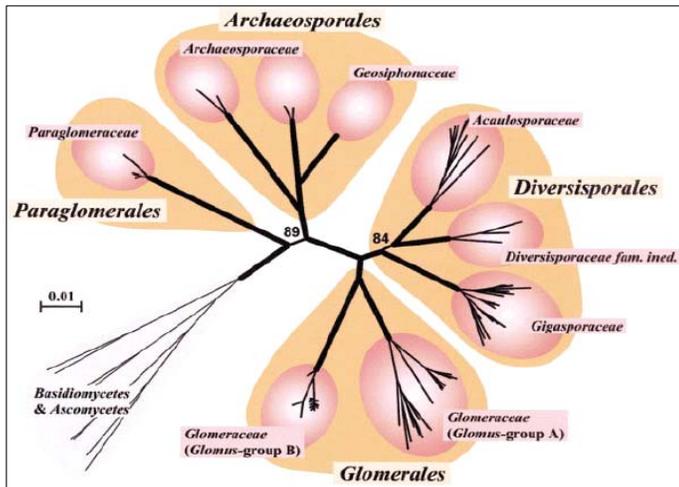


Рис. №4. Предположительная генерализованная таксономическая структура АМГ и родственных им грибов (Glomeromycota), основанная на сиквенсах 18S рРНК (А. Schüßler et al., 2001). Тип Glomeromycota состоит из 4-х порядков. Типичные ("классические") АМ-грибы отнесены к порядку Glomerales. Показано предположительное расположение семей. Семья Glomeraceae включает две группы рода Glomus.

Молекулярные филогенетические исследования показали, что АМГ дивергировали около 462–353 млн. лет назад (L. Simon et al., 1993; W. Remy et al., 1994). В то же время, по данным анализа ископаемых форм, микориза обнаружена у самых ранних наземных растений, которые жили более чем 400 млн. лет назад в раннем девоне (Barker S.J. et al., 1998). Таким образом, АМ-симбиоз настолько же древний, как и высшие растения (И.В. Каратыгину, 1990). Считается, что АМГ стимулировали процесс выхода растений на сушу и освоения ими наземных местообитаний (К.А. Pirozynski, D.W. Malloch et al., 1980; И.В. Каратыгин, 1993). Согласно И.В. Каратыгину (1993) для наземных растений и АМГ имела место тесная коэволюция, в результате которой происходила параллельная дивергенция партнеров симбиоза.

Сведения о генетике АМ-грибов немногочисленны и противоречивы. Эти грибы гаплоидны, причем их геномы имеют крупные размеры (100-1000 млн. пар оснований). Несмотря на отсутствие у АМ-грибов полового процесса, в их популяциях поддерживается очень высокое генетическое разнообразие, что было показано путем анализа структуры локусов, содержащих гены рРНК, а также с использованием биохимических маркеров - изоферментных спектров малатдегидрогеназы и эстераз (Sanders et al., 1996). Более того, отдельные споры, которые содержат до 5000 ядер, обладают высокой степенью гетерокариотичности. Каким образом гломусовые грибы сочетают отсутствие полового процесса с высоким генетическим полиморфизмом, а полную зависимость от симбиоза с большим размером генома? Эти вопросы еще ждут своих исследователей.

1.3. Развитие арбускулярной микоризы

Процесс микоризообразования включает следующие этапы (Рис. №5):

1. Pid (preinfection development – преинфекционное развитие) – этап узнавания растением эндофитов, обмен сигналами между растением и эндомикоризным грибом (V. Gadkar et al., 2001; K. Szczyglowski, L. Amyot, 2003).

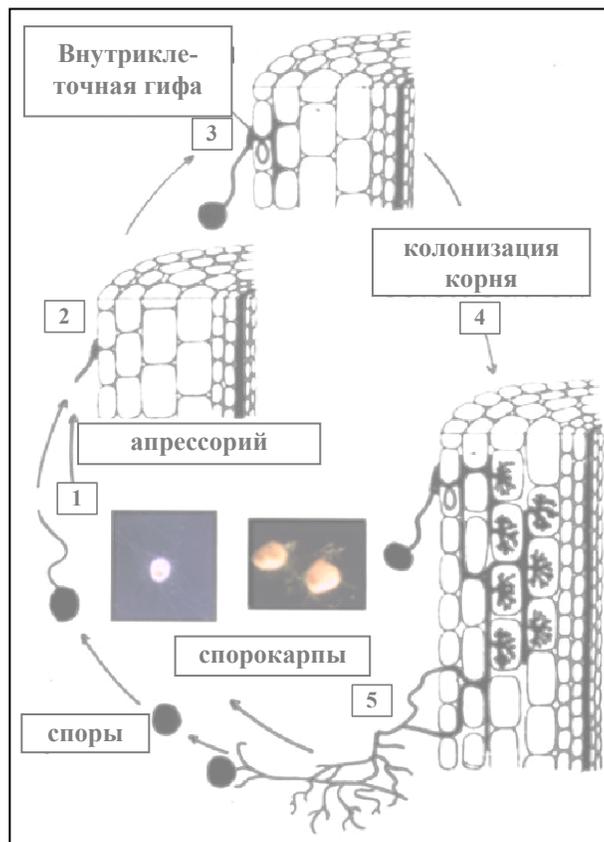


Рис. 5. Биологический цикл арбускулярных микоризных грибов (схема по А. Gollotte et al., 2004)

1-5 – стадии развития арбускулярной микоризы (указаны в тексте).

По результатам исследований М. Giovannetti et al. (1996) прорастание спор эндомикоризного гриба индуцируется растительным фактором, молекулярная масса которого не превышает 500 Да. Однако прорастание спор не всегда зависит от присутствия/отсутствия потенциального хозяина. По многочисленным наблюдениям споры АМГ способны израстать мицелием на чашках Петри, теряя при этом свои энергетические запасы (Л.М. Якоби, не опубликованные данные). Если через 10-14 дней после прорастания гифа не вступит в контакт с корнем, то происходит ее септирование, автолиз ядер и возвращение питательных веществ в спору. Каждая спора может произвести несколько попыток вступить в симбиоз с растением (В. Vago et al., 1999). Анализ литературных источников позволяет

заклучить, что споры АМГ не имеют длительной фазы покоя. Прорастание спор, главным образом, зависит от условий внешней среды – влажности и температуры почвы.

2. Apf (apressoria formation – формирование апрессориев) – этап ветвления гифы гриба у поверхности корня и закрепления его на поверхности путем образования апрессория (Рис. №№1, 5).

3. Img (intercellular mycelium growth – рост межклеточного мицелия) – эндифит проникает в корень, проходя через внешние ризодермальные клетки (эпидермис) растения-хозяина, и формирует внутриклеточные кольца (Р. Bonfante-Fasolo, А. Fontana, 1985). Наблюдается от 1-й до 4-х клеток с кольцами (Рис. №5). Затем гифы АМГ проникают в кортекс (кору) корня, формируется межклеточный мицелий. Данный этап может быть подразделен на более частные по проникновению АМГ в различные слои клеток корня растения-хозяина. Так, например, у лядвенца японского получены мутации, специфически блокирующие развитие мицелия в экзодерме или в различных слоях кортекса (J. F. Marsh, M. Schultze, 2001).

4. Ard (arbuscule differentiation – дифференцировка арбускул) – во внутреннем кортексе гифы дифференцируются на арбускулы (Рис. №№1, 5). Гриб окружен плазмалеммой растения (периарбускулярной мембраной). Разделительная зона между грибной стенкой арбускулы и плазмалеммой растения заполнена электронно-плотным материалом (Рис. №6), который называется “*interfacial material*” (разделительный материал) и является продолжением клеточной стенки растения вблизи точки проникновения гриба в клетку растения (Р. Bonfante-Fasolo, А. Fontana, 1985).

Одновременно с образованием арбускул идет процесс формирования внутриклеточных и межклеточных образований – везикул, которые накапливают запасные энергетические вещества: липиды и пр. (Рис. №1). Согласно некоторым данным везикулы являются начальной стадией развития спор (N.C. Schenck, Y. Pérez, 1988; J.A. Fortin et al., 2002).

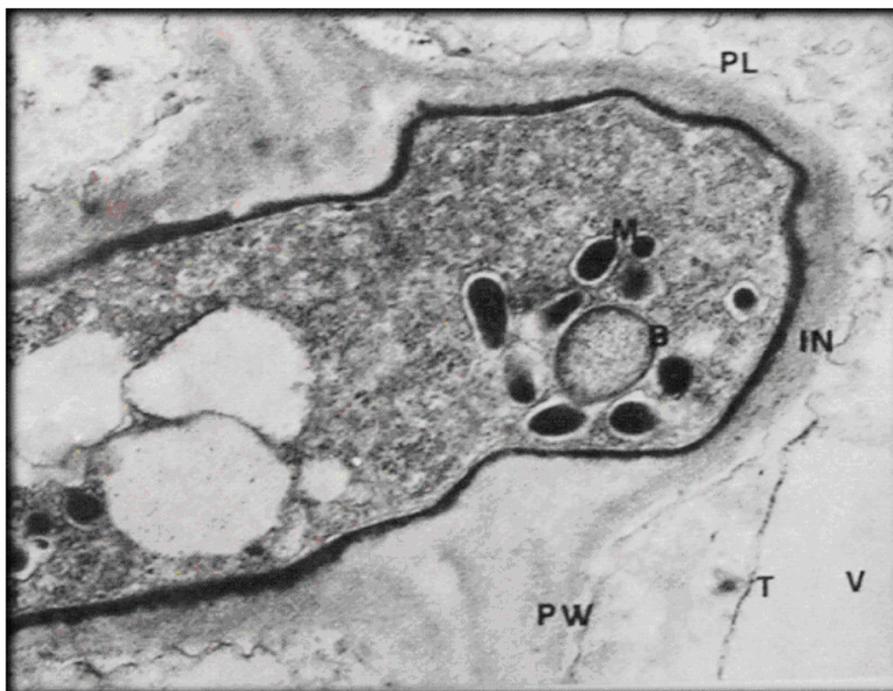


Рис. 6. Данные электронной микроскопии клетки кортекса при проникновении гифы *Glomus macrocarpum* (P. Bonfante-Fasolo, A. Fontana, 1985). Гифа *Gl. macrocarpum* пересекает клеточную стенку растения-хозяина, растягивая первичную стенку (primary wall - PW) и проталкивает растительную плазмалемму, окружающую гриб (plasmalemma - PL); бактерие-подобное включение (bacteria-like inclusion - B) окружено гранулами, покрытыми мембраной (membrane - M); IN - разделительный электронноплотный материал (interfacial material); T - тонопласт вакуоли (tonoplast); V - вакуоль (vacuole). X31000.

В инфицированных АМ-грибом клетках растения наблюдается комплекс ультраструктурных изменений: уменьшается или полностью исчезает вакуоль; пластиды деградируют до состояния пропластид; ядро деформируется, а хроматин переходит в диффузное состояние, что свидетельствует о его высокой транскрипционной активности. В растительных клетках резко возрастает число телец аппарата Гольджи, которые участвуют в формировании периабускулярной мембраны. Вблизи арбускул наблюдается синтез α -тубулина, что свидетельствует об активном развитии цитоскелета (P. Bonfante-Fasolo, 1978; P. Bonfante-Fasolo, A. Fontana, 1985).

5. Мур (mycobiont persistence – стабильность микобионта) – формирование внекорневого мицелия, внутри-/внекорневых спор эндомикоризного гриба, а также скоплений внекорневых спор на поверхности почвы – спорокарпов (Рис. №5).

Отметим, что по данным ряда исследований арбускулярная микориза бывает двух типов: “арум” (Arum) и “парис” (Paris) типа (J.F. Marsh, M. Schultze, 2001; S.J. Barker et al., 1998). Арум тип характеризуется образованием арбускул, а парис тип характеризуется формированием плотных клубков из внутриклеточных колец гиф гриба (Рис. №7).

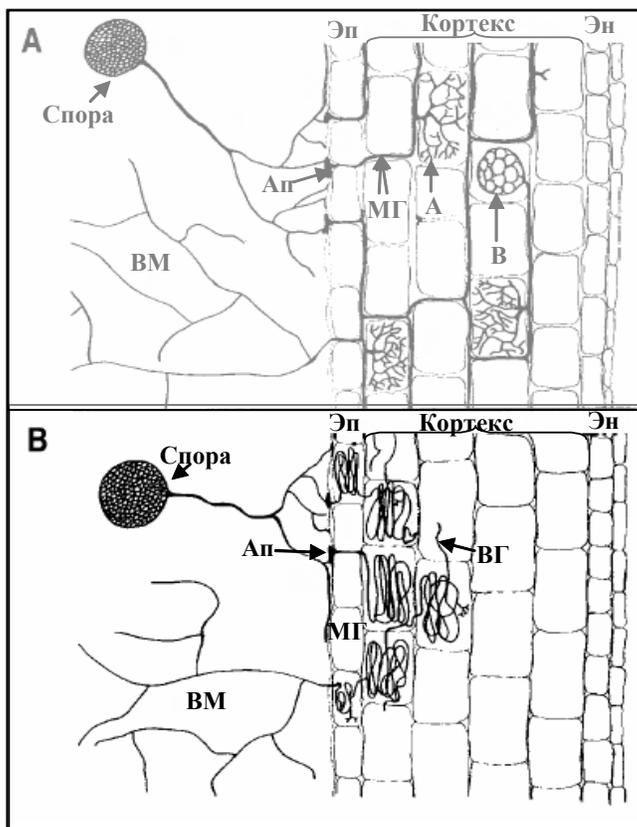


Рис. №7. Арум и парис тип арбускулярной микоризы (схема по S.J. Barker et al., 1998)

Рис. №7.а - арум тип, Рис. №7.б - парис тип;

Эп – эпидермис, Эн - эндодерма, Ап - апессорий,

А - арбускула, В - везикула, МГ - межклеточные гифы,

ВГ - внутриклеточные гифы, ВМ - внешний мицелий гриба.

Регуляция арбускулярной микоризы. Основой АМ-симбиоза является перекрестная регуляция генов партнеров, приводящая к образованию новых структур и объединенных метаболических путей. У бобовых растений образование

мицелия в кортексе корня сопровождается индукцией процессов, сходных с реакциями защиты растения от патогенов (И.А. Тихонович, Н.А. Проворов, 2004). К их числу относятся: модификация клеточной стенки, синтез фитоалексинов, накопление каллозы и патоген-регулируемых (PR) белков (пероксидаз, литических ферментов). В то же время, при взаимодействии с мутуалистами и патогенами эти механизмы действуют по-разному (Табл. №1). При развитии АМ-грибов интенсивность защитных реакций низка, они менее продолжительны и более дифференцированы во времени и пространстве. По-видимому, ответные реакции хозяина строго регулируются сигналами, которые выделяет эндосимбионт. В то же время очевидно, что в основе регуляции развития микоризы и защиты растений от грибов-патогенов лежат сходные механизмы.

1.4. Генетические исследования арбускулярной микоризы

В последние годы начались работы по выявлению растительных генов, контролирующих образование АМ. Прямой отбор таких мутантов затруднен тем, что развитие АМ - медленный процесс, не сопровождаемый визуально различимыми анатомическими изменениями. К счастью, оказалось, что у бобовых растений мутанты с нарушением АМ могут быть отобраны по неспособности формировать клубеньки при инокуляции ризобиями (фенотип Nod⁻) (А.Yu. Borisov et al., 1992; V. Gianinazzi-Pearson, 1996).

Исследования АМ во многих лабораториях ведутся с использованием мутантов, полученных на линиях бобовых растений, таких как, горох посевной (*Pisum sativum* L.) (А.У. Borisov, et al., 2000), люцерна ствольчатая (*Medicago truncatula* Gaertn.) (М. Sagan et al., 1995), конские бобы (*Vicia faba* L.) (G. Duc et al., 1989), лядвенец японский (*Lotus japonicus* L.) (E. Wegel et al., 1998), фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) (S.J. Shirtliffe, J.K. Vessey, 1996). С помощью таких мутантов был выявлен генетический контроль со стороны растения-хозяина за становлением микоризного симбиоза.

Таблица №1

Ответные реакции, индуцируемые при проникновении в корни симбиотических грибов

Реакция	Эндомикоризные грибы (<i>Glomus</i>)	Корневые патогены (<i>Rhizoctonia</i>)
Модификация клеточных стенок	Слабое утолщение без заметной структурной модификации, фенолы не накапливаются	Сильное утолщение с образованием папилл и накопление фенолов
Активация ферментов фенилпропаноидного пути* и синтез флавоноидов	Замедленное возрастание концентрации флавоноидов; PAL, CHI и CHS активны во время колонизации корня, PAL и CHS - при формировании арбускул; активация IFR не наблюдается	Резкое и быстрое возрастание концентрации флавоноидов; одновременная индукция PAL, CHS, CHI и IFR
Синтез и накопление каллозы	На ранних стадиях отсутствует, наблюдается в небольших количествах при формировании арбускул	Интенсивно происходит на ранних стадиях инфекции
Синтез пероксидаз, хитиназ, глюканаз	Происходит на ранних стадиях симбиоза, отсутствует при формировании арбускул	Происходит на всех стадиях инфекции
Синтез патоген-регулируемого белка PR-1	Небольшое количество транскриптов выявляется вблизи арбускул	Образуется много транскриптов и белка без специфической субклеточной локализации

*PAL - фенилаланин-аммоний лиаза, CHI - халькон-изомераза, CHS - халькон-синтаза, IFR - изофлавоон-редуктаза.

Получено множество растительных мутантов по разным стадиям формирования АМ. Мутанты, полученные на этих бобовых традиционно разделяют на две группы. Мус⁻¹-мутанты, которые характеризуются отсутствием инфицирующих гиф, арбускул и везикул, т.е. взаимодействие микро- и макросимбионта заканчивается на стадии образования апрессория, число апрессориев повышено в 4-7 раз (G. Duc et al., 1989; V. Gianinazzi-Pearson, 1996; M.J. Harrison, 1997; E. Wegel et al., 1998) (Рис. №8.a). Мус⁻²-мутанты характеризуют отсутствие внутриклеточных структур гриба – арбускул, т.е. взаимодействие партнеров по симбиозу заканчивается на стадии формирования межклеточных гиф (V. Gianinazzi-Pearson, 1996; E. Wegel et al., 1998; Gollotte et al., 2002) (Рис. №8.b).

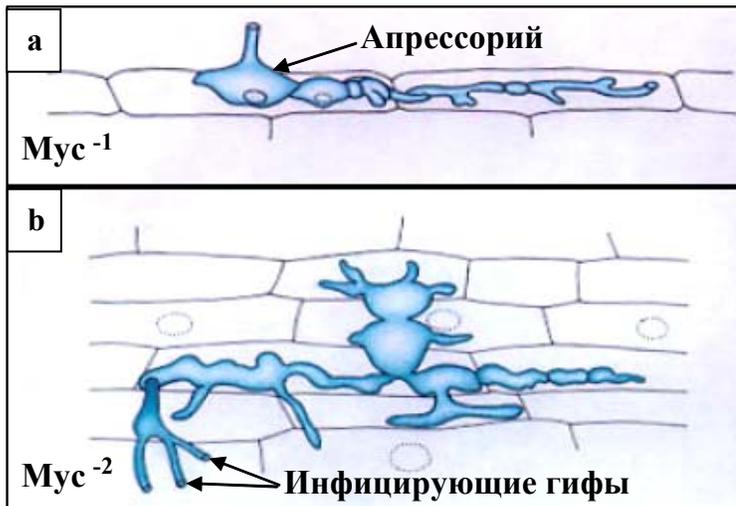


Рис. №8. Растительные мутанты по стадиям формирования АМ-симбиоза (E. Wegel et al., 1998). У Мус⁻¹-мутанта образуется апрессорий, но отсутствуют инфицирующие гифы АМГ. У Мус⁻²-мутанта образуются инфицирующие гифы, но отсутствуют внутриклеточные структуры: арбускулы и везикулы.

Кроме того, среди Nod⁺⁺ мутантов отобраны линии с Мус⁺⁺-фенотипом, который характеризует более интенсивную микоризацию тканей кортекса корня растения-хозяина (Krusell L. et al., 2002). По данным А.У. Vorisov et al. выделены Мус^{+/-}-мутанты, которые характеризуются существенным снижением количества гифов и арбускул в корне, а также снижением количества инфицирующих гиф (А.У.

Borisov et al., 2000). Эти мутанты были отобраны как Fix⁻ мутанты, т.е. такие растения образуют не фиксирующие азот клубеньки. Таким образом, результаты мутационного анализа показали, что у бобовых развитие АМ и клубеньков контролируется единой генетической системой (Табл. №2).

Таблица №2

Гены бобовых, регулирующие развитие клубеньков и арбускулярной микоризы

Гены	Фенотипы мутантов	Генные продукты
LjSYMRK = MsNORK = MtDMI2 = PsSym19	Nod ⁻ Myc ⁻	Рецептор-подобная киназа
LjHar1 = PsSym29 = GmNARK	Nod ⁺⁺ Myc ⁺⁺	Рецептор-подобная киназа
LjNFR5 = PsSym10	Nod ⁻ Myc ⁺	Рецептор-подобная киназа
LjNFR1 ~ MtLYK3 (~PsSym2)	Nod ⁻ Myc ⁺	Рецептор-подобная киназа
LjNin = PsSym35	Nod ⁻ Myc ⁺	Транскрипционный активатор
LjASTRAY	Nod ⁺⁺ Myc [?]	Транскрипционный активатор
MtDMI1 ~ PsSym8	Nod ⁻ Myc ⁻	Лиганд-оперируемый катионный канал
MtDMI3 = PsSym9	Nod ⁻ Myc ⁻	Ca ²⁺ /кальмодулин-зависимая киназа

Примечание:

Ортологичные гены объединены знаком “=”, предположительно ортологичные гены - знаком “~”. Первые буквы генсимвола: *Lj* – *Lotus japonicus*, *Ms* – *Medicago sativa*, *Mt* – *M. truncatula*, *Ps* – *Pisum sativum*, *Gm* – *Glycine max*. Фенотипы: Nod - клубенькообразование, Myc – образование микоризы (использованы данные работ: G. Endre et al., 2002; L. Krusell et al., 2002; R. Nishimura et al., 2002; S. Stracke et al., 2002; E. Limpens et al., 2003; E.B. Madsen et al., 2003; S. Radutoiu et al., 2003; I.R. Searle et al., 2003; R.M. Mitra et al., 2004; J. Lévy et al., 2004).

Общность развития АМ и клубеньков показана и при изучении белков, которые специфически индуцируются в корнях при развитии АМ. В процессе онтогенеза растения с арбускулярной микоризой способны *de novo* синтезировать определенные белки, которые отсутствуют в корнях растений без микоризы. Эти белки называют микоризинами. Согласно данным V. Gianinazzi-Pearson (1996) они составляют около 4% общего белка корней. У бобовых некоторые из этих белков являются общими для АМ и клубеньков. Например, в периабускулярной мембране выявлен ряд белков (ENOD2, ENOD11, ENOD12), которые входят в состав мембраны симбиосом (V. Gianinazzi-Pearson, 1997).

Многие общие гены к настоящему времени клонированы и сиквенированы. Их продукты контролируют общий регуляторный каскад, управляющий развитием АМ и клубеньков. Большой интерес представляют гены, специфичные для АМ-симбиоза. В последние годы появились данные о выявлении генов, контролирующих АМ у небобовых растений. У кукурузы немикоризируемый мутант был отобран по отсутствию желтого пигмента, синтезируемого в корнях при нормальном развитии АМ. При взаимодействии с этим мутантом у *Glomus* наблюдали прорастание спор, однако образующиеся гифы не прикреплялись к корням и не формировали апрессории (А. Klingner et al., 1995). Аналогичный мутант, который характеризуется резким снижением числа образуемых апрессориев и активности преинфекционного роста гриба, описан у томатов (С. Cordier et al., 1998).

1.5. Метаболическая интеграция растений и АМ-грибов

Между макро- и микросимбионтом происходит обмен продуктами метаболизма (цит. по М.Е. Theodorou, W.C. Plaxton, 1993). По результатам исследований Р.Е. Pfeffer et al., I. Jakobsen, В. Vago et al. через арбускулу АМ-гриб получает от растения-хозяина углеводы (в виде гексозы, Рис. №9) (Р.Е. Pfeffer et al., 1999; I. Jakobsen, 1999; В. Vago et al., 1999).

По результатам исследований ряда авторов растение-хозяин получает от АМГ фосфор, азот, калий, микроэлементы и воду (S.E. Smith, F.A. Smith, 1990; P.A. Olsson, et al., 2002), такие как: фосфор (Л.Д. Утемова, 1989; N.S. Bolan, 1991; I. Jakobsen et al. 1994; D.P. Schachtman et al., 1998; S.E. Smith et al., 2003), цинк, медь (D.H. Lambert et al., 1979), азот (цит. по S.E. Smith, D.J. Read, 1997), кальций, магний (J. Dissing-Neilsen, 1989), воду (цит. по K. Hardie, 1985; De Wit et al., 1985; Allen, 1991; D.P. Schachtman et al., 1998). Схема трансмембранного транспорта в интерфейсе взаимодействия гриба - растение представлена на Рис. №9 (схема по M. Hahn et al., 2001). Микоризная зависимость растений на почве с низким содержанием доступного фосфора в почве впервые была обнаружена еще в 1960-х гг. (В. Mosse, 1963; В. Mosse, 1972; В. Mosse, 1973). С этого времени началась эра активных исследований роли микоризы в фосфорном питании растений.

Образование АМ в наибольшей степени стимулирует накопление фосфатов. По данным Л.М. Якоби с соавторами (2000) у гороха прибавка по накоплению фосфора при инокуляции АМ-грибами в 7 раз выше, чем по массе растений, в 3 раза – чем по накоплению азота, в 2 раза – чем по накоплению калия. Эти данные показывают, что АМ-грибы имеют особый механизм поглощения почвенных фосфатов, который отличается от механизма поглощения других элементов. Поэтому функционирование АМ может быть представлено как сопряжение систем фосфорного метаболизма грибов и углеродного метаболизма растений.

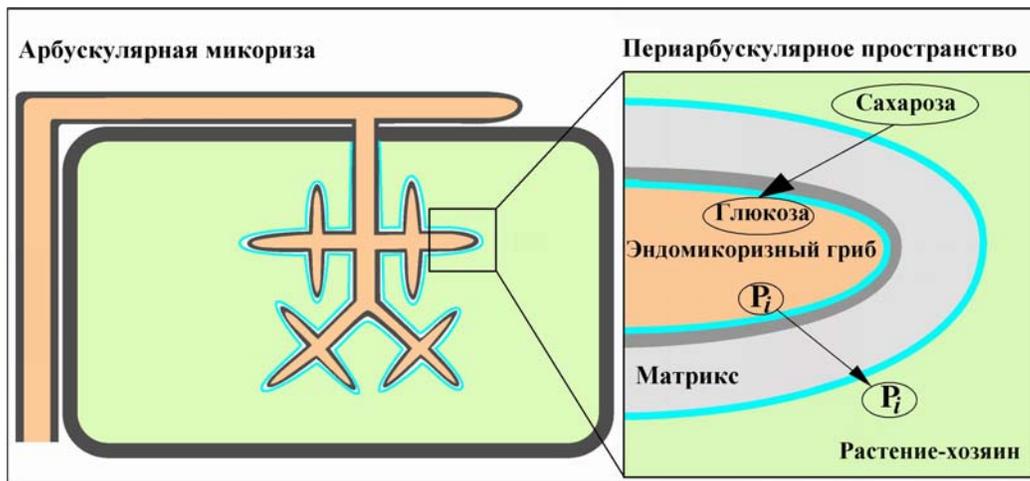


Рис. №9. Схема трансмембранного транспорта в интерфейсе взаимодействия гриба - растение (M. Hahn et al., 2001)

Со стороны растения, в инфицированный АМ-грибами кортекс корня поступает сахароза, расщепляемая растительной инвертазой до моносахаридов. По результатам исследований В. Vago et al. (1999, 2000) они транспортируются в арбускулы и межклеточный мицелий, где конвертируются в запасную форму – трегалозу (димер глюкозы).

Со стороны гриба, фосфаты, поглощаемые из почвы наружными гифами, передаются в арбускулы, из которых поступают в растительную цитоплазму (S.E. Smith, D.R.Read, 1997). В растительной клетке вблизи арбускул синтезируется АТФ-аза, которая связана с протонной помпой, необходимой для транспорта метаболитов между партнерами. Важно отметить, что спектры генов,

индуцируемых в корнях растений и инокуляции АМ-грибом и при внесении подвижных соединений фосфора, резко различаются. Это показывает, что механизмы самостоятельного и симбиотического фосфорного питания различны – второй тип осуществляется за счет глубокой генетической интеграции партнеров.

В низкофосфорных условиях среды поступление фосфора в растение возможно, главным образом, за счет фосфорных транспортеров АМ-гриба. Согласно многочисленным исследованиям ряда авторов гриб оказывает общестимулирующее мультифункциональное влияние на растение хозяина, активируя экспрессию определенных регуляторных последовательностей в его геноме, отвечающих за активацию/репрессию генов метаболизма и транспорта фосфора, включая активацию генов растительных белков-транспортеров фосфора, задействованных в периапробускулярном интерфейсе (M.J. Harrison et al., 2002; S.H. Burleigh et al., 2002; S.E. Smith et al., 2003).

Фосфаты извлекаются гифами из почвы за счет высокой адсорбционной активности, а возможно, и благодаря способности к фосфатрастворению (выделение кислот и фосфатаз). С помощью изотопных методов показано, что образование АМ в 3-4 раза повышает интенсивность поглощения фосфора, до 80% которого поступает в корень через гриб. Транспорт фосфора в растение из почвы происходит главным образом в форме ионов H_2PO_4^- посредством белка-переносчика, обладающего высоким сродством к фосфату. Ген *Glomus*, кодирующий этот белок (*GvPT*) был клонирован и перенесен в дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), где он может активно экспрессироваться (C. Rausch et al., 2001).

Особенностью АМ является пространственное удаление сайтов метаболического обмена партнеров от сайтов поглощения фосфатов. Это делает необходимым развитие у гриба систем транспорта С- и Р-метаболитов, которое облегчается отсутствием в мицелии клеточных перегородок. Учитывая, что в микоризных грибах поддерживаются разнонаправленные потоки питательных веществ (фосфор, азот и другие питательные элементы – в растение, углерод – из растения), можно предположить, что транспортные процессы в гифах структурно организованы. Согласно данным P.A. Olsson et al. (2002) ключевую роль в транспорте фосфатов по

мицелию АМ-гриба играют гранулы полифосфатов, образующиеся под действием фермента полифосфатазы. В свою очередь, С-соединения транспортируются в наружные гифы в форме липидных телец или гранул гликогена.

В гифах АМ-грибов весьма активны гены, контролирующие энергетический обмен. В разных участках мицелия наблюдается четкие различия по экспрессии этих генов. Так, по данным В. Vago et al. во внутрикорневых гифах наиболее активны ферменты глиоксилатного цикла (синтез липидов), а во внекорневых гифах - ферменты цикла трикарбоновых кислот, обеспечивающие энергией процессы осмотрофного питания и спороношения (В. Vago et al., 2000).

В связи с высокой энергоемкостью развития и функционирования АМ, часто возникает вопрос о целесообразности ее использования для питания растений. Хотя микобионт потребляет до 20-30% продуктов фотосинтеза, это не означает, что образование микоризы ухудшает энергетический статус растений. По результатам исследований I. Paradí et al. инфицирование растений АМ-грибами повышает активность фотосинтеза (количество хлорофилла, листовая поверхность, скорость фиксации CO₂), а также усиливает приток его продуктов в корни (I. Paradí et al., 2003). Однако подача растению эквивалентного количества фосфорных удобрений не приводит к стимуляции фотосинтеза. Поэтому для растения в 10-100 раз энергетически выгоднее поддержать микоризу, чем развивать эквивалентную ассимилирующую активность корней.

Важно отметить, что АМ существенно повышает эффективность использования растениями трофических ресурсов почвы. Действительно, растение за счет АМ преодолевает 2-х миллиметровую зону обеднения питательными веществами, которая образуется в ризосфере (Y.-G. Zhu et al., 2001; S.E. Smith et al., 2003). При этом мицелий АМГ 100-кратно увеличивает абсорбирующую поверхность корня (цит. по S.E. Smith, D.J. Read, 1997). Растение-хозяин и микосимбионт формируют развитую сферу взаимодействия с почвенным субстратом (зона диаметром от 10 до 150 мм вокруг корня) – микоризосферу (цит. по А. Rambelli, 1973; R.G. Linderman, 1988; V. Vancura et al., 1989; R.G. Linderman, 1994; S.E. Smith et al., 2003).

1.6. Эффективность арбускулярной микоризы

Эффективность АМ определяется отзывчивостью растений на микоризацию, выраженной в прибавке их урожая. С помощью полученных растительных мутантов по различным стадиям формирования АМ до сих пор не удалось изучить механизмы формирования высокоэффективного симбиоза. Мутанты по симбиотической эффективности в литературе не описаны.

Основные проблемы исследования эффективности АМ можно разделить на два блока. Во-первых, продуктивность растений – комплексный признак и лишь часть факторов, его контролирующих, связана с образованием АМ. Во-вторых, как уже отмечалось, действие АМ наиболее четко проявляется в том, что она способствует усвоению растениями труднорастворимого фосфора. В то же время, культивируемые сорта часто имеют ослабленную способность к симбиотрофному питанию фосфором, потому что селекция проводилась на хорошем агрохимическом фоне, при полном минеральном питании. Как результат, сорта растений оказались менее отзывчивыми и менее вариабельными при инокуляции АМ-грибами по сравнению с дикорастущими популяциями (А. Martenonson, I. Rydberg, 1994; Л.М. Якоби и др., 2000) (Табл. №3).

Таблица №3

Влияние инокуляции *Glomus* на растения гороха

Признаки		Прибавка (%)	
		99 дикорастущих форм (семена)	16 коммерческих сортов (вегетативные органы)
Масса		+184.0	+12.3
Накопление (мг/раст.)	N	+123.8	+5.0
	P	+356.9	+42.6-
Содержание (%)	N	-18.1	-6.5
	P	+60.0	+27.0

Вероятно, дикорастущие популяции представляют собой природный резерв симбиотических генов (Н.А. Проворов, 1996). Поэтому для селекции по признакам АМ-симбиоза в большей степени подходят дикорастущие формы растений.

Низкая симбиотическая эффективность исследуемых коммерческих сортов (отсутствие ростового отклика) не позволяет выделить контрастные по

эффективности генотипы, значит, эти формы не подходят для изучения эффективности АМ. Возникла необходимость в новом модельном растении.

Исходя из данных, представленных в литературном обзоре, растительные модельные объекты, подбираемые для исследования механизмов, контролирующих эффективность АМ-симбиоза, должны обладать определенными качествами:

1) Для возможности выявления действия микоризы необходимы растения, которые не адаптированы к низкому фосфору в почве. Такие растения имеются в дикорастущих популяциях, поскольку они не были подвержены селекции в отличие от коммерческих сортов и полученных на них мутантов.

2) Для возможности отбора контрастных генотипов необходимы высокополиморфные и высокоотзывчивые на инокуляцию эндомикоризным грибом модельные растения. Такие растения также следует искать среди дикорастущих популяций, поскольку селекция сортов на повышение продуктивности приводит к обеднению генома растений высокоэффективными аллелями, контролирующими минеральное питание.

3) Для возможности получения линейного материала в короткие сроки необходимо подобрать самоопыляемые растения с коротким жизненным циклом.

4) Для возможности проведения молекулярно-генетических исследований симбиотической эффективности отобранных линий необходимы образцы растений с небольшим геномом.

Идеальный объект для исследования механизмов эффективности АМ подобрать сложно и, скорее всего, невозможно. Но в настоящем исследовании в качестве объекта выбраны дикорастущие популяции и сорта люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*), которые по предварительным данным могут обладать перечисленными качествами модельного объекта.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

Для решения поставленной в работе задачи в качестве объекта исследования была выбрана люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina*) – одна из наиболее широко распространенных видов рода *Medicago* L. (подрод *Lupularia* (Ser.) Grossh., сем. Leguminosae Endl.) (Рис. №10). Включает мезофитные и ксерофитные экотипы, яровые и озимые формы, одно- и малолетники. Диплоид ($2n = 16$).

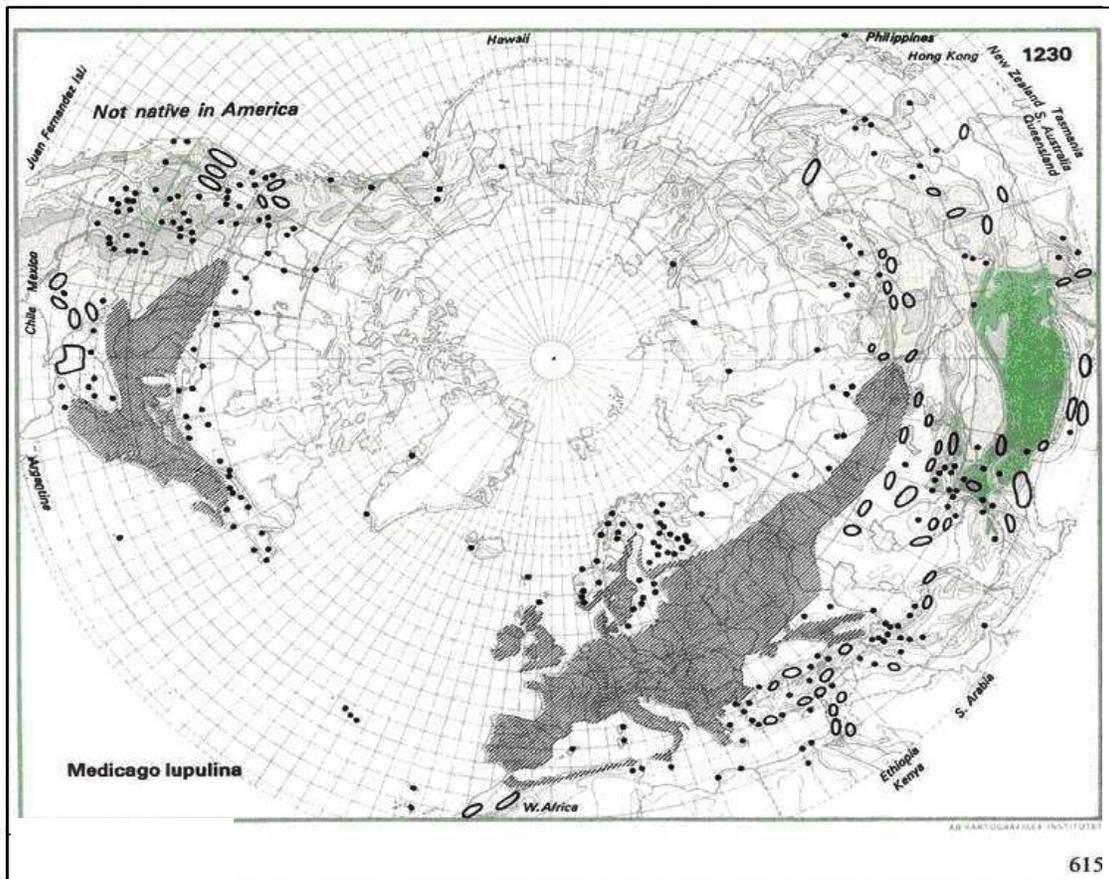


Рис. №10. Карта распространения люцерны хмелевидной.

Серой штриховкой закрашен ареал распространения люцерны хмелевидной. Черные точки – места обнаружения отдельных популяций. Генетический центр происхождения – Западная Европа.

Травянистое растение, растет в разных природно-климатических зонах, кроме крайнего севера и пустынь. Тип и способ опыления: автогамия, сопряженная с автотриппингом и клейстогамией.

Селекционная работа с этим видом в России не проводилась до начала 90-х годов XX века, хотя в прошлом (XIX в.) люцерна хмелевидная считалась одним из лучших пастбищных растений. Согласно данным Г.В. Степановой в 1992 году люцерна хмелевидная была включена в селекционную программу ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса с целью создания сортов для лугопастбищного использования и сортов, пригодных для выращивания в качестве промежуточной культуры или сидерата в зерновых севооборотах (Г.В. Степанова, 1998). Этот вид высокой семенной продуктивностью (500-800 семян с 1 растения) и хорошим качеством корма.

В исследование взяты 4 образца люцерны хмелевидной: сорт Мира, дикорастущие популяции Павловская и Юнтоловская – озимые формы; сорт ВИК32 – яровая форма (Табл. №4).

Таблица №4

Образцы люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.)

Озимые формы			Яровая форма
сорт Мира Московская область	популяция Павловская Ленинградская область	популяция Юнтоловская Ленинградская область	сорт ВИК32 Казахстан

Семена дикорастущих популяций люцерны хмелевидной (Ленинградская область) – п. Павловская и п. Юнтоловская получены из коллекции ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова. Семена сорта Мира (Московская область) и сорта ВИК32 (Казахстан) получены из коллекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса. Для посева были отобраны крупные и одинаковые по размеру семена. Масса 1000 семян составила: для с. Мира – 1,30 г, п. Павловская – 1,93 г, п. Юнтоловская – 1,54 г, для с. ВИК32 – 1,77 г.

2.2. Грибной материал

В исследование взят штамм арбускулярно микоризного гриба (АМГ) *Glomus intraradices* Shenck&Smith – изолят CIAM8 из коллекции лаборатории экологии и физиологии почвенных микроорганизмов (лаб. №4 ВНИИ сельскохозяйственной

микробиологии). Вид *Gl. intraradices* относится к типу Glomeromycota классу Glomeromycetes порядку Glomerales семейству Glomeraceae роду Glomus (таксономия вида представлена на сайте: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Glomus+intraradices>). Штамм СИАМ8 зарегистрирован в Европейском банке Glomeromycota (Дижон, Франция) как изолят ВЕГ144. Данный штамм был выделен в 1980-е гг. из дерново-подзолистой почвы Ленинградской области и является высокоэффективным штаммом АМГ (Г.Н. Маршунова, Л.М. Якоби, 1988; Л.М. Якоби и др., 2000; L. Jacobi et al., 2003). Его эффективность была установлена с большим числом сельскохозяйственных растений разных видов, такими как: овес (с. Хадмерслебенер), ячмень (с. Пиррка), суданская трава, вика посевная (Льговская), клевер белый (с. Белогорский), клевер красный (ВИК-7), картофель (с. Невский), некоторые дикорастущие формы и примитивные сорта гороха посевного, козлятник восточный (с. Гале, с. Надежда). Гриб является облигатным симбионтом и в лабораторных условиях поддерживается на плектрантусе (*Plectranthus australis* L.) и суданской траве (*Sorghum vulgare* Pers.) согласно методическим разработкам S. Gianinazzi et al. (2002).

Для инокуляции люцерны взяты свежие микоризованные (или немикоризованные в контроле) корни суданской травы, которые вносили в почву при посадке проростков из расчета 100 мг на одно растение.

2.3. Вегетационный метод

2.3.1. Агрохимическая характеристика почвы

Содержание органического вещества в дерново-подзолистой легкосуглинистой почве составляет 3%, содержание доступного фосфора – 3,9 мг P_2O_5 (1,7 мг Р) на 100 г почвы, доступного калия – 3,5 мг K_2O (2,9 мг К) на 100 г – вытяжка 0,2 НСl по Кирсанову; $pH_{НСl}$ - 4,9; гидролитическая кислотность (Гк) - 3,3 мг на 100 г, сумма подвижных оснований – 9,8 мг-экв на 100 г почвы. Для нейтрализации кислотности в почву была внесена известь ($CaCO_3$) из расчета 1 Гк в количестве 1,65 г $CaCO_3$ на 1 кг почвы. После известкования $pH_{НСl}$ составил 6,1.

2.3.2. Постановка экспериментов

Перед проращиванием семена очищены от створок, простерилизованы концентрированной серной кислотой в течение пяти минут и промыты стерилизованной водой. Проращивание проведено на влажной стерилизованной фильтровальной бумаге в чашках Петри при температуре 27°C. Четырехдневные проростки высажены в почву по 5 растений на один сосуд. После учета растения были высажены на нестерильную плодородную почву в вегетационный домик для получения семян.

Методика проведения вегетационного опыта для изучения эффективности микоризного симбиоза в отсутствие инокуляции ризобиями предполагает использование стерилизованного ультрафиолетом (до постановки опыта) светового бокса с неактивной вентиляцией, стерилизованного субстрата с низким содержанием доступного фосфора и свежekiпяченой воды для полива. Режим смены дня и ночи: 18 и 6 часов при температуре +21 и +25°C, соответственно. Для освещения используются люминесцентные лампы LB-40 (Россия) и OSRAM L36/77 Fluora (Германия). Полив растений производится один раз в сутки по весу из расчета 60% от полной влагоемкости почвы. Данный вегетационный метод обеспечивает оптимальные условия для развития микоризы и, при этом, позволяет избежать спонтанного заражения клубеньковыми бактериями.

Для решения поставленных в работе задач проведены два эксперимента. Используются вегетационные сосуды, вмещающие 2,65 кг воздушно-сухой смеси песка и дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы в соотношении 1 : 2 по весу.

I. Первый вегетационный опыт проведен с целью анализа:

- отзывчивости на инокуляцию АМГ форм люцерны различного происхождения и разной биологии;
- внутривидового полиморфизма люцерны по симбиотической эффективности.

Повторность опыта составила 35 растений для п. Павловская и п. Юнтоловская и 65 растений для с. Мира, с. ВИК32.

II. Второй вегетационный опыт проведен с целью анализа влияния АМ на контрастные по продуктивности генотипы примитивного сорта ВИК32 люцерны

хмелевидной. Для проведения II-го эксперимента по результатам I-го вегетационного опыта отобраны 10 контрастных генотипов с. ВИК32 (взяты семена потомства 1 растения). Повторность II-го опыта составила 10 растений.

Схема обоих опытов: 1) контрольный вариант – растения без микоризы; 2) опытный вариант – растения, инокулированные АМГ.

2.3.3. Оценка продуктивности

Уборка растений и оценка показателей продуктивности проведена на 88-е сутки от посева в фазу розетки – для озимых форм, в фазу плодоношения – для яровой формы люцерны. Перед учетом корни растений были отмыты от почвы водопроводной водой. Для каждого растения были определены показатели продуктивности: средняя высота растения, кустистость (число стеблей) и сухая биомасса.

2.3.4. Оценка симбиотической эффективности

Согласно ранее разработанным методикам эффективность АМ принято рассчитывать по показателям продуктивности, таким как: сухая биомасса, накопление фосфора, высота растения, кустистость и пр. (A. Martenonson, I. Rydberg, 1994; H. Kahiluoto, 1998; Л.М. Якоби и др., 2000). При этом рассчитывают два показателя:

1. Основанный на учете “биологического эффекта” – действия на жизнеспособность (относительную приспособленность) партнеров (Ю. Одум, 1975):

$$[\text{Эффект}] = \frac{[X_{+AM}] - [X_{-AM}]}{[X_{-AM}]} 100\%, \text{ где}$$

X_{+AM} , X_{-AM} – показатели продуктивности растений, инокулированных и неинокулированных эндомикоризным грибом, соответственно.

2. Основанный на определении микоризной зависимости (C. Plenchette et al., 1983; H. Kahiluoto, 1998; T.A. Diop et al., 2003; S.E. Smith et al., 2003):

$$[\text{Зависимость}] = \frac{[X_{+AM}] - [X_{-AM}]}{[X_{+AM}]} 100\%$$

2.4. Метод оценки морфотипов озимых форм

Использован метод оценки качественных и количественных характеристик куста и стеблей у индивидуальных растений. Для озимых форм люцерны хмелевидной выделено 4 фенотипа – 2 основных (“А” и “В”) и 2 “сопутствующих” им (“К” и “С”). Анализ проведен в фазу плодоношения растений.

Фенотип I – “А” – “раннее цветение”, скороспелые. Стебли на 2/3 имеют мелкие “сидячие” листья с коротким черешком. Фенотип II – “В” – “позднее цветение”, стебли хорошо облиственны. Имеют лист с черешком до высоты ~2/3 высоты стебля, затем идут “сидячие” листья. Стебли фенотипа “В” имеют выраженное боковое ветвление. Фенотип III – “К” – “вторичное кущение”, стебли, сопутствующие I-му, либо II-му фенотипу. Высота стебля – 20...40 см, лист с черешком. Стебли фенотипа “К” не имеют пазушного ветвления. Фенотип IV – “С” – “третичное кущение”, стебли, сопутствующие I-му, либо II-му типу. Высота стебля – до 15 см. Фенотип “С” не имеет соцветий. Отметим, что первичное кущение имеется у всех растений, поэтому оно не фиксировалось при выделении морфотипов.

На основании этих показателей выделяются следующие морфотипы: А, АС, АК, АКС, ВС, ВКС (см. Рис. №11).

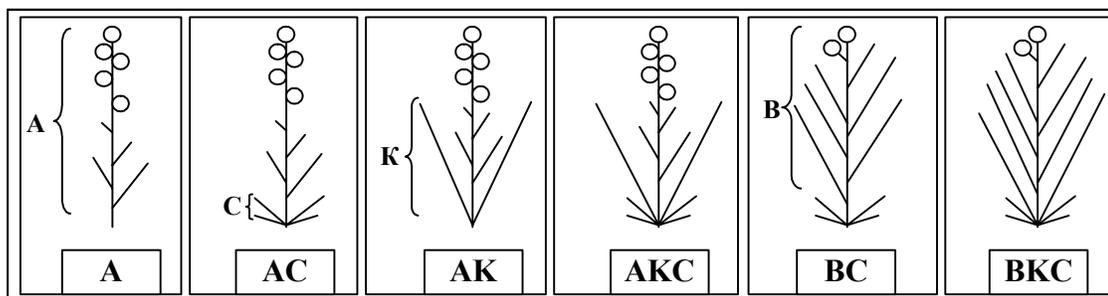


Рис. №11. Классификация морфотипов озимых форм люцерны хмелевидной

2.5. Оценка показателей микоризообразования

Для количественной оценки микоризообразования использованы две методики: 1) методика мацерации и окрашивания корней бобовых растений с микоризой (J.M. Phillips, D.S. Nauman, 1970); 2) метод световой микроскопии (A. Trouvelot et al.,

1986), усовершенствованному с помощью компьютерной программы “Mycorrhiza”, разработанной в оболочке Microsoft Excel А.П. Юрковым.

Оценка показателей микоризообразования проведена на 88-е сутки от посева в фазу розетки – для озимых форм, в фазу плодоношения – для яровой формы люцерны.

2.5.1. Методика мацерации и окрашивания корней

Методика по J.M. Phillips, D.S. Nayman (1970) включает следующие этапы:

1. Варка в водяной бане в дистиллированной воде – 30 мин. Пробирки с корнями ставятся на водяную баню (около 100⁰С). Если корни свежие, то начинают с п.2.

2. Осветление корней (мацерация) в щелочи (10% KOH) на водяной бане – 1 час. Слив раствора. Промывка водопроводной водой 3-5 раз.

3. Дополнительное осветление корней в растворе перекиси водорода на водяной бане - от 30 минут до 1 часа. Подготовка реактива для осветления: 3 мл 25% NH₄OH, 30 мл 10% H₂O₂, 567 мл дистиллированной H₂O. Пробирки с корнями в растворе перекиси водорода можно оставить на ночь. Слив раствора. Промывка водопроводной водой 3-5 раз.

4. Подкисление среды соляной кислотой на водяной бане – от 5 до 10 минут. Подготовка реактива: 23 мл 1% HCl доводят до 1 л дистиллированной водой. Слив раствора.

5. Окрашивание корней трипановым голубым (Trypan blue) в молочной кислоте на водяной бане – от 10 до 20 минут. Подготовка реактива для окрашивания: 875 мл дистиллированной воды, 63 мл глицерина, 63 мл 10% молочной кислоты, 0,3-0,5 г трипанового голубого на 1 л раствора. Слив раствора. Промывка водой не проводится.

6. Контрастирование. Заливка промывочного раствора для удаления избытка красителя. Поставить на водяную баню на 1-3 часа. Подготовка промывочного раствора: 875 мл дистиллированной воды, 63 мл глицерина, 63 мл 10% молочной кислоты. На данном этапе из корней выходят излишки красителя, растительные клетки освобождаются от красителя, грибные гифы – нет. Корни в растворе можно

оставить на ночь и более (до 1 месяца). Слив раствора. Промывка водой не проводится.

7. Заливка глицерина и хранение образцов корней в темноте (до нескольких лет).

2.5.2. Методика оценки интенсивности микоризообразования с использованием световой микроскопии

Для отбора фрагментов корней на анализ использован микроскоп стереоскопический (МБС-2).

Методика оценки по А. Trouvelot et al. (1986) включает определение следующих параметров микоризации:

1. встречаемость микоризной инфекции в корневой системе (F , %);
2. интенсивность микоризной инфекции в корневой системе (M , %);
3. обилие арбускул во всей корневой системе (A , %);
4. обилие арбускул в микоризованных фрагментах корней (a , %);
5. обилие везикул во всей корневой системе (B , %);
6. обилие везикул в микоризованных фрагментах корней (b , %).

Для оценки показателей микоризообразования использован микроскоп исследовательский проходящего света (Польша). Характеристики микоризообразования рассчитываются по трем классам плотности развития структур микоризы:

1. **M** – класс плотности микоризы (от 1 до 5 баллов). 1 балл – 0-1% микоризы в корне, 2 балла – 2-10%, 3 балла – 11-50%, 4 балла – 51-90%, 5 баллов – 91-100% микоризы в корне;
2. **A** – класс плотности арбускул (от 1 до 3 баллов). 1 балл – 1-20% арбускул в микоризованной части корня, 2 балла – 21-79%, 3 балла – 80-100% арбускул в микоризованной части корня;
3. **B** – класс плотности везикул (от 1 до 3 баллов). 1 балл – 1-20% везикул в микоризованной части корня, 2 балла – 21-89%, 3 балла – 80-100% везикул в микоризованной части корня.

Параметры микоризации имеют следующие расчетные формулы:

$$1. F = \frac{N - n_0}{N} 100\%, \text{ где}$$

где N – общее число просмотренных полей зрения (N должно быть не менее 50),
 n_0 – число полей зрения без микоризы.

$$2. M = \frac{(95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + 1n_1)}{N} \%, \text{ где}$$

n_5 – число полей зрения с классом плотности микоризы $M = 5$;

n_4 – число полей зрения с классом плотности микоризы $M = 4$;

n_3 – число полей зрения с классом плотности микоризы $M = 3$ и т.д.

$$3. A = \frac{a}{M} \% \quad A = [a/M] \%, \text{ где}$$

$$4. a = \frac{(100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1)}{100} \%, \text{ где}$$

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

$n_i mA_j$ – число полей зрения с $M = i, A = j$,

i (класс плотности микоризы) = 1...5, j (класс плотности арбускул) = 1...3.

$$5. B = \frac{b}{M} \%, \text{ где } b \text{ рассчитывается аналогично расчету } a.$$

$$6. b = \frac{(100mB_3 + 50mB_2 + 10mB_1)}{100} \%$$

2.6. Статистический анализ результатов

Статистический и корреляционный анализы проведены по Б.А. Доспехову (1973), Ф. Хедрику (2003). Определены следующие параметров изменчивости: коэффициенты вариации (Cv , %), асимметрии (As , %) и эксцесса (Ex , %) по показателям продуктивности и микоризообразования. Достоверность различий между средними значениями (Xm) и Cv оценивали с помощью t -критерия Стьюдента (Г.Ф. Лакин, 1990). При анализе существенности влияния микоризации на морфотипическую структуру оценка соответствия между наблюдаемыми и ожидаемыми распределениями оценивали с помощью χ^2 -критерия Пирсона (Г.Ф. Лакин, 1990).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка различий между формами люцерны хмелевидной разного происхождения по симбиотическим свойствам

3.1.1. Показатели микоризообразования

Определение структуры микоризы люцерны проведено с целью выявления полиморфизма по симбиотической эффективности и взаимосвязей между степенью микоризации корней и продуктивностью исследуемых образцов.

По результатам вегетационных опытов у люцерны хмелевидной с эндомикоризным грибом *Gl. intraradices* наблюдается *арум* тип арбускулярной микоризы. Данный факт показан впервые.

На Рис. №№12-14 представлены результаты оценки показателей микоризообразования трех озимых форм люцерны (с. Мира, популяции Павловская

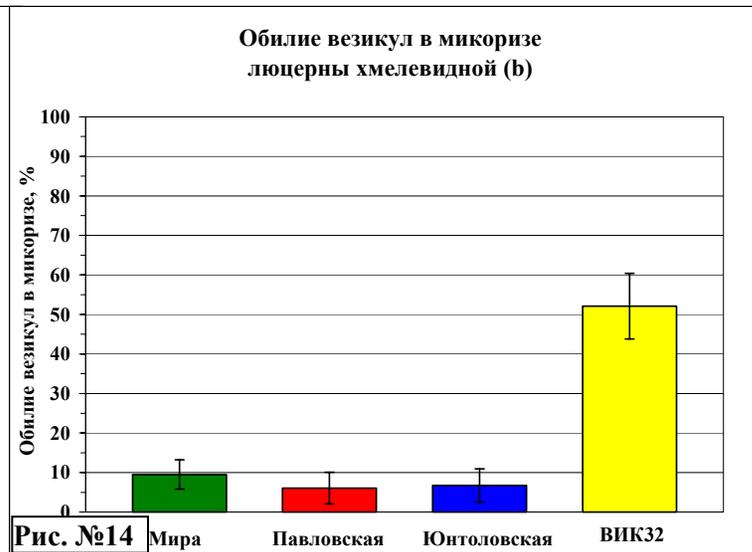
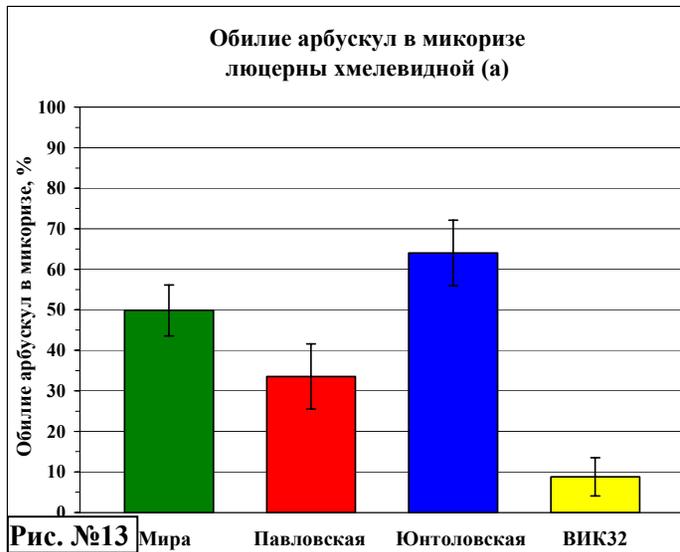
и Юнтоловская) и яровой формы (с. ВИК32). Для всех исследуемых образцов характерна высокая встречаемость микоризной инфекции в корнях (Табл. №5, Рис. №12). Однако анализ структуры микоризы выявил различия между формами люцерны хмелевидной различного происхождения.

Таблица №5

Показатели микоризообразования люцерны хмелевидной при инокуляции
Glomus intraradices

Встречаемость микоризной инфекции (F, %)	Обилие арбускул		Обилие везикул	
	A, %	a, %	B, %	b, %
Сорт Мира (n ₀ =63)				
78,6 ± 5,2	21,3 ± 5,2	49,9 ± 6,3	3,8 ± 2,4	9,5 ± 3,7
Популяция Павловская (n ₀ =35)				
65,6 ± 8,0	7,4 ± 4,4	33,6 ± 8,0	1,5 ± 2,1	6,1 ± 4,0
Популяция Юнтоловская (n ₀ =35)				
66,9 ± 8,0	21,7 ± 7,0	64,0 ± 8,1	2,2 ± 2,5	6,8 ± 4,2
Сорт ВИК32 (n ₀ =36)				
91,9 ± 4,5	5,5 ± 3,8	8,8 ± 4,7	30,1 ± 7,6	52,1 ± 8,3

Примечание: n₀ - число проанализированных растений в опыте с инокуляцией эндомикоризным грибом.



Сорт Мира, пп. Павловская и Юнтоловская характеризуются высоким облием арбускул и низкой плотностью везикул (Табл. №5; Рис. №15.а, b), в то время как для сорта ВИК32 – характерно обратное соотношение (Табл. №5; Рис. №15.с, d).

3.1.2. Показатели продуктивности

Для оценки эффективности микоризного симбиоза проведена оценка индивидуальных растений по таким показателям продуктивности, как: средняя высота, кустистость (число стеблей), воздушно-сухая биомасса (стебли + корни) (Табл. №6). Все исследуемые образцы люцерны были отзывчивы на инокуляцию эндомикоризным грибом *Glomus intraradices*. Так, эффективность была достоверно значима по всем показателям продуктивности на 0,1% и 5% уровнях значимости, о чем свидетельствует оценка достоверности различий средних значений показателей продуктивности по *t*-критерию Стьюдента (Приложение №1).

Таблица №6

Влияние инокуляции эндомикоризным грибом на продуктивность люцерны

Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
-АМ	+АМ	-АМ	+АМ	-АМ	+АМ
Сорт Мира (n _к =63; n _о =63)					
2,33 ± 0,08	6,17 ± 0,48	3,79 ± 0,18	8,24 ± 0,22	0,53 ± 0,03	0,92 ± 0,05
Популяция Павловская (n _к =34; n _о =35)					
2,12 ± 0,16	5,91 ± 0,77	3,12 ± 0,32	6,31 ± 0,41	0,57 ± 0,05	0,95 ± 0,14
Популяция Юнтоловская (n _к =33; n _о =35)					
1,77 ± 0,12	4,19 ± 0,46	2,33 ± 0,22	4,51 ± 0,30	0,34 ± 0,03	0,48 ± 0,05
Сорт ВИК32 (n _к =58; n _о =36)					
15,66 ± 0,66	53,44 ± 0,85	1,43 ± 0,09	3,83 ± 0,07	0,08 ± 0,01	2,19 ± 0,11

Примечание: -АМ - растения, не инокулированные эндомикоризным грибом; +АМ - растения, инокулированные эндомикоризным грибом, АМ - арбускулярная микориза; n_к, n_о - число проанализированных растений в контроле и опыте, соответственно.

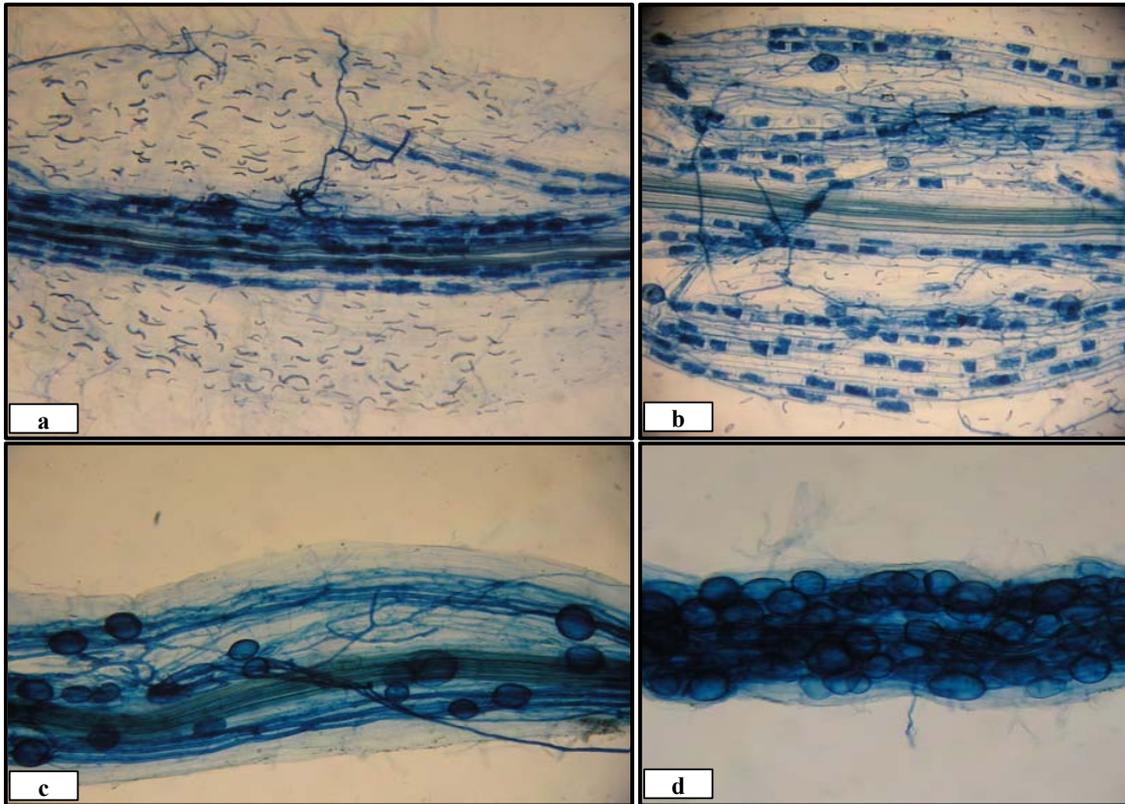


Рис. №15. Эндомикоризный гриб *Glomus intraradices* Schenck&Smith (BEG144) в корне люцерны хмелевидной

Рис. а-в - кластеры арбускул гриба в кортексе корня озимой люцерны;

Рис. с - корень яровой люцерны с развитым мицелием гриба;

Рис. d - кортекс корня яровой люцерны, целиком заполненный везикулами.

Таблица №7

Эффективность инокуляции эндомикоризным грибом форм люцерны
хмелевидной

Характеристика эффективности	Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
	-АМ	+АМ	-АМ	+АМ	-АМ	+АМ
Сорт Мира (n _к =63; n _о =63)						
Прибавка, %	165,5 ¹		117,2		73,2	
Микоризная зависимость, %	62,2		54,0		42,4	
Популяция Павловская (n _к =34; n _о =35)						
Прибавка, %	179,3		102,5		66,1 ²	
Микоризная зависимость, %	64,1		50,6		40,0	
Популяция Юнтоловская (n _к =33; n _о =35)						
Прибавка, %	136,1		93,5		40,9	
Микоризная зависимость, %	57,6		48,3		29,0	
Сорт ВИК32 (n _к =58; n _о =36)						
Прибавка, %	241,4		167,9		2776,2	
Микоризная зависимость, %	70,7		62,7		96,5	

Примечание: см. Табл. №6.

165,5¹, 66,1² - прибавка средних значений показателей продуктивности (эффективность) симбиоза достоверны при P<0,001 и P<0,05.

Анализ эффективности и микоризной зависимости свидетельствует о резких различиях между формами люцерны хмелевидной разного происхождения по продуктивности (Табл. №7, Приложение №2). Наиболее контрастно эти различия выражены между яровой и озимыми формами люцерны хмелевидной (Рис. №16). Данный контраст по продуктивности обусловлен тем, что сорт ВИК32 по результатам двухлетних экспериментов является облигатно-микотрофной формой (Табл. №6, 7; Рис. №16). Этот вывод подтверждается тем, что контрольные растения (без микоризы) в условиях низкого уровня доступного фосфора в почве имеют признаки карликовости: слаборазвитую корневую систему, измельченный лист, укороченный стебель и отсутствие кущения. Все это говорит о том, что сорт ВИК32 слабо адаптирован к низкому фосфору в почве. В то же время озимые формы более адаптированы к данным условиям (Рис. №16).

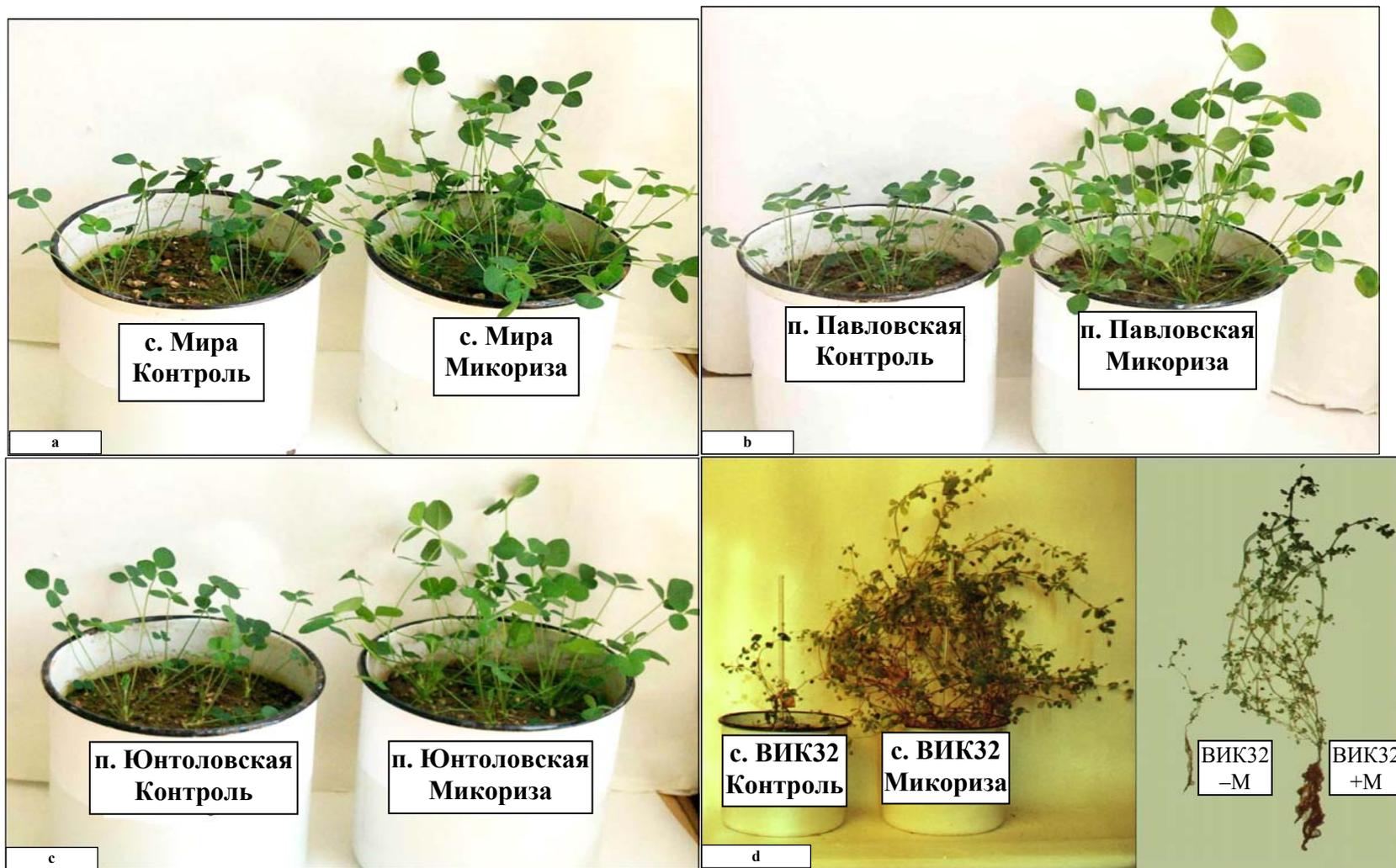


Рис. №16. Влияние инокуляции эндомикоризным грибом *Glomus intraradices* на рост и развитие люцерны хмелевидной
 На Рис. №16 изображено фото 4-х опытных образцов люцерны хмелевидной в вегетационных сосудах: слева – контрольные растения без микоризы, справа - опытные микоризованные растения

Оценка достоверности различий между формами люцерны хмелевидной разного происхождения и разной биологии по эффективности симбиоза с грибом *Gl. intraradices* проведена с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. Данный дисперсионный анализ учитывает влияние генотипа растения, инокуляции и их взаимодействия. Оценка действия изучаемых факторов по *F*-критерию Фишера показала их значимость на 0,1%-ном уровне.

Полученные данные свидетельствуют о достоверных различиях между формами люцерны хмелевидной разного происхождения и разной биологии по эффективности симбиоза с грибом *Gl. intraradices*.

3.2. Выявление внутривидового полиморфизма люцерны хмелевидной по симбиотической эффективности

Для выявления изменчивости образцов люцерны хмелевидной по отзывчивости на инокуляцию определены параметры распределения показателей продуктивности, такие как: коэффициент вариации (Cv), асимметрия (As) и эксцесс (Ex). Мы полагали, что если отзывчивость всех растений внутри популяции одинакова, то микоризация меняет лишь средние значения показателей продуктивности, но не меняет параметры их изменчивости, и популяционная структура также остается неизменной. Однако изменения данных статистических параметров говорят о наличии внутрипопуляционного полиморфизма по симбиотической эффективности.

3.2.1. Статистические параметры изменчивости показателей продуктивности

3.2.1.1. Коэффициенты вариации

Для оценки влияния микоризации на изменчивость образцов определены коэффициенты вариации по кустистости, высоте и сухой биомассе. Cv у всех проанализированных образцов имеют высокие значения как в контроле (без АМ), так и в опыте с инокуляцией *Gl. intraradices* (Рис. №№17-19). Полученные результаты указывают на то, что для всех образцов инокуляция достоверно изменяет вариабельность растений по кустистости, высоте и сухой биомассе, т.е. растения по-разному реагируют на микоризу (оценка достоверности изменений приведена в Приложении №3).

Коэффициенты вариации по кустистости у всех образцов достоверно снижаются в варианте с микоризой по сравнению с контролем (Рис. №17). Это говорит об оптимизирующем действии микоризы на кустистость растений.

По высоте у озимых форм коэффициенты вариации достоверно увеличиваются в варианте с микоризой (Рис. №18). А по сухой биомассе такая закономерность наблюдается только у популяции Павловская (Рис. №19). Здесь Cv достоверно ($P < 0,01$) возрастает с 53% до 89%.

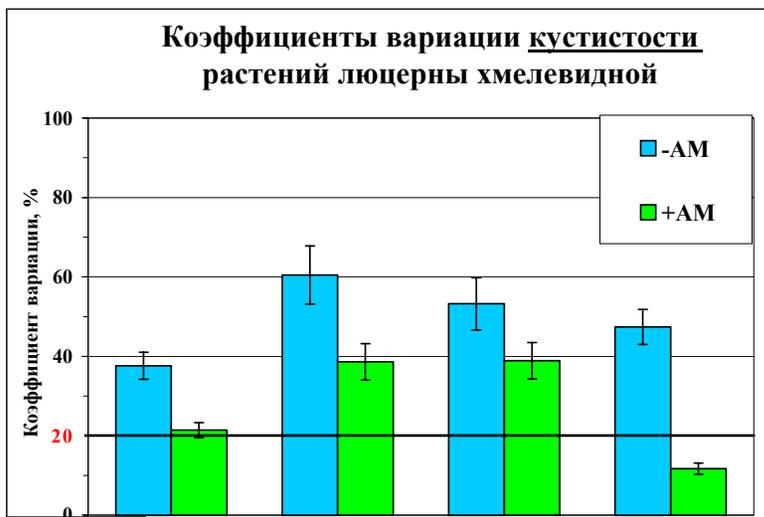


Рис. №17

Мира Павловская Юнтоловская ВИК32

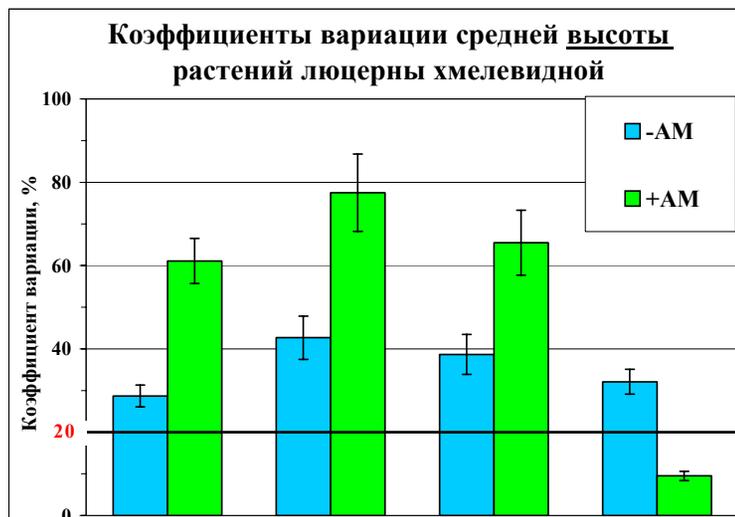


Рис. №18

Мира Павловская Юнтоловская ВИК32

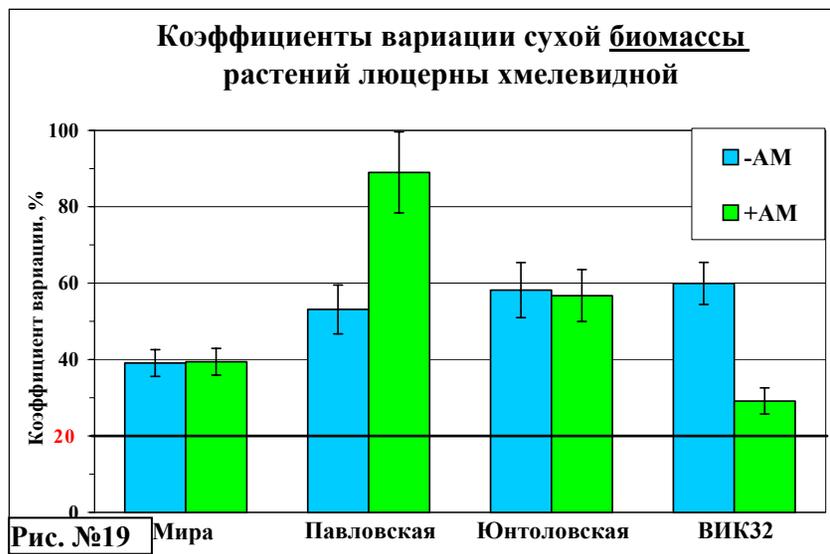


Рис. №19

Мира Павловская Юнтоловская ВИК32

Это увеличение коэффициентов вариации в микоризе, а также высокие показатели отзывчивости могут свидетельствовать о значительном внутривидовом полиморфизме по эффективности симбиоза у озимых форм, особенно у п. Павловская. Поэтому дикорастущая популяция Павловская (из Ленинградской области) отобрана как высоковариабельная для дальнейших исследований ее структуры.

Сорт ВИК32 – облигатно-микотрофная форма люцерны – отличается снижением коэффициентов вариации в варианте с микоризой по всем показателям продуктивности (Рис. №№17-19). Таким образом, микориза оптимизирует развитие этой формы растений.

3.2.1.2. Коэффициенты асимметрии и эксцесса

Асимметрия и эксцесс выборок позволяют сравнивать распределение с нормальным (см. Табл. №8, а также графики в Приложениях №№4-6). Для оценки изменчивости дикорастущих популяций и сортов люцерны хмелевидной по эффективности симбиоза с эндомикоризным грибом *Gl. intraradices* мы определили достоверность отличий значений коэффициентов асимметрии и эксцесса от нулевого значения, соответствующего нормальному распределению. Мы считали, что достоверные различия по данным статистическим параметрам однозначно будут наблюдаться между достоверно положительным и отрицательным значениями, либо между положительным и достоверно отрицательным значениями.

Таблица №8

Коэффициенты асимметрии и эксцесса параметров продуктивности

Статистический параметр	Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
	-AM	+AM	-AM	+AM	-AM	+AM
Сорт Мира ($n_k=63$; $n_o=63$)						
As	2,60 ¹	1,49	-0,77	-0,26	-0,03	0,95
Ex	10,32	4,44	-0,23	-0,25	-0,53	0,23
Популяция Павловская ($n_k=34$; $n_o=35$)						
As	1,26	1,72	0,51	-0,30	0,73	1,55
Ex	1,59	2,03	-0,77	-0,68	-0,33	1,42
Популяция Юнтоловская ($n_k=33$; $n_o=35$)						
As	0,42	1,37	0,44	0,21	0,36	1,41
Ex	-0,99	1,68	-1,10	-0,70	-0,85 ²	1,81
Сорт ВИК32 ($n_k=58$; $n_o=36$)						
As	0,48	0,01	1,61	-0,76 ³	1,85	-0,04
Ex	0,56	-0,64	2,46	0,86	5,70	-0,61

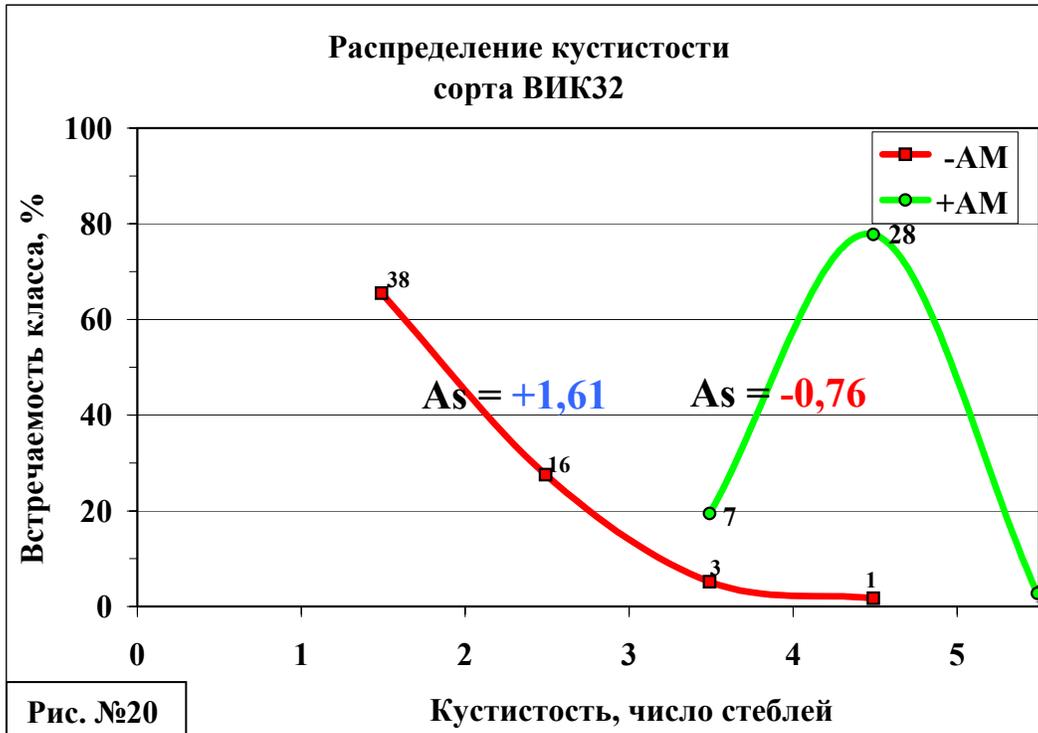
Примечание: см. Табл. №6.

2,60¹, -0,76³, -0,85²- коэффициент асимметрии (эксцесса) значим при $P<0,01$, $P<0,05$ и $P<0,10$, соответственно (t -критерий Стьюдента).

По результатам анализа коэффициентов асимметрии выявлен внутривидовой полиморфизм по симбиотической эффективности, оцениваемой по кустистости, у с. ВИК32 (Табл. №8; Рис. №20).

По результатам анализа коэффициентов эксцесса выявлен внутривидовой полиморфизм по симбиотической эффективности, оцениваемой по средней высоте и сухой биомассе, у п. Юнтоловская (Табл. №8).

Следует отметить, что микориза оптимизирует рост яровой люцерны – с. ВИК32, поскольку As и Ex снижаются в опыте с AM по сравнению с контролем (Табл. №8). Наиболее явное снижение наблюдается при сравнении As и Ex по сухой биомассе (Табл. №8; Приложение №6). В отличие от яровой формы общей закономерностью озимых форм люцерны (с. Мира, п. Павловская и п. Юнтоловская) является наличие положительной асимметрии распределения сухой биомассы в варианте с микоризой.



При сравнении контроля и опыта с инокуляцией *Gl. intraradices* достоверные различия между статистическими параметрами изменчивости ($Cv/As/Ex$) зафиксированы для с. Мира – в трех случаях, для п. Павловская – в четырех случаях, для п. Юнтоловская – в трех, для с. ВИК32 – в пяти случаях (Рис. №№17-19, Табл. №8, Табл. №17). В сочетании с высокими коэффициентами вариации индивидуальных растений это говорит о возможности отбора контрастных по симбиотической эффективности генотипов растений из образцов люцерны хмелевидной различного происхождения.

3.2.2. Статистические параметры изменчивости показателей микоризообразования

3.2.2.1. Коэффициенты вариации

Анализ структуры микоризы у индивидуальных растений выявил наличие высокого внутривидового полиморфизма люцерны хмелевидной по микоризообразованию (Табл. №9). Так, популяция Павловская характеризовалась наибольшими коэффициентами вариации обилия везикул и арбускул по сравнению со встречаемостью микоризы (Рис. №21).

Таблица №9

Коэффициенты вариации показателей микоризообразования 4-х форм люцерны при инокуляции *Glomus intraradices*

Встречаемость микоризной инфекции (F, %)	Обилие арбускул		Обилие везикул	
	A, %	a, %	B, %	b, %
Сорт Мира (n ₀ =63)				
20,2 ¹ ± 1,8	70,3 ± 6,3	53,3 ± 4,7	56,0 ± 5,0	44,7 ± 4,0
Популяция Павловская (n ₀ =35)				
35,6 ± 4,3	58,6 ± 7,0	43,6 ± 5,2	95,3 ± 11,4	72,3 ± 8,6
Популяция Юнтоловская (n ₀ =35)				
28,1 ± 3,4	61,7 ± 7,4	39,6 ± 4,7	89,9 ± 10,7	62,3 ± 7,4
Сорт ВИК32 (n ₀ =36)				
10,4 ² ± 1,2	84,9 ± 10,0	78,9 ± 9,3	24,9 ± 2,9	14,9 ± 1,8

Примечание: см. Табл. №6.

20,2¹, 10,4² - коэффициент вариации имеет высокое и среднее значение, соответственно.

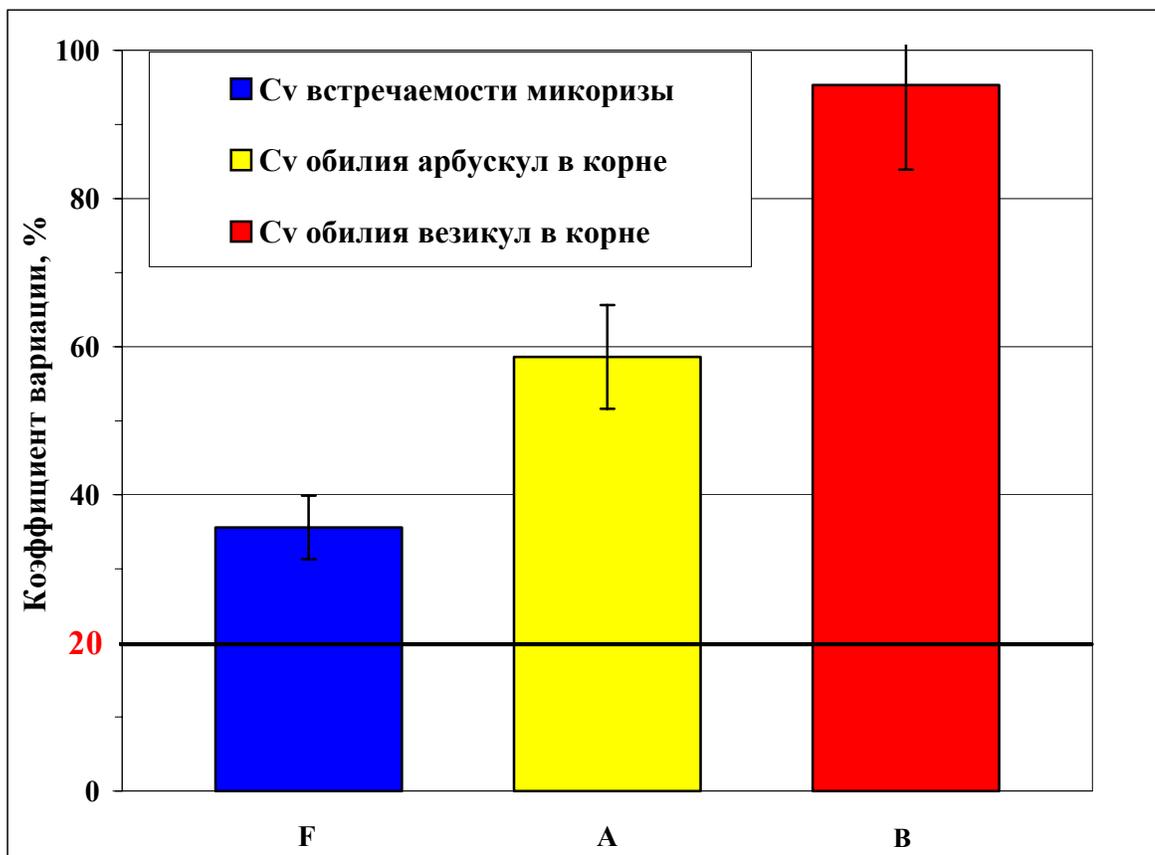


Рис. №21. Коэффициенты вариации по показателям микоризообразования популяции Павловская.

3.2.2.2. Коэффициенты асимметрии и эксцесса

Значения A_s и E_x показателей микоризообразования могут быть использованы для выявления полиморфизма люцерны по этому признаку. Выявлены общие закономерности распределения исследуемых показателей, таких как: встречаемость микоризной инфекции (F, %), обилие арбускул (A и a, %) и везикул (B и b, %). У всех исследуемых образцов имеет место правосторонняя отрицательная асимметрия и высокий E_x по встречаемости микоризной инфекции (Табл. №10). Это говорит о том, что большинство растений внутри популяции имеют высокие значения F. Наиболее четко данная закономерность выражена у с. ВИК32, для которого наблюдается максимальное значение F при минимальном его варьировании.

Таблица №10

Коэффициенты асимметрии и эксцесса показателей микоризообразования люцерны

Статистический параметр	Встречаемость микоризной инфекции (F, %)	Обилие арбускул		Обилие везикул	
		A, %	a, %	B, %	b, %
Сорт Мира (n ₀ =63)					
As	-1,36 ¹	0,34	-0,14	0,31	0,31
Ex	1,88	-1,31	-1,44	-0,45	-0,65
Популяция Павловская (n ₀ =35)					
As	-1,44	0,63 ²	-0,10	1,21	0,59
Ex	1,74	0,45	-0,40	0,80	-0,56
Популяция Юнтоловская (n ₀ =35)					
As	-1,04	0,09	-1,13	3,03	1,50
Ex	1,03	-1,20	0,13	12,92	3,32
Сорт ВИК32 (n ₀ =36)					
As	-2,56	0,95	1,15	0,13	0,08
Ex	8,06	0,32	2,09	0,88	-0,49

Примечание: см. Табл. №6.

-1,36¹, 0,63² - коэффициент асимметрии (эксцесса) значим при P<0,01 и P<0,05, соответственно (t-критерий Стьюдента).

Сорт Мира имеет распределение основных показателей структуры микоризообразования (обилие арбускул и везикул), наиболее близкое к нормальному (Табл. №10).

Отметим, что левосторонне-асимметричное распределение популяции организмов по изучаемому признаку (положительное значение As) по мнению А.С. Серебровского (1970) связано с рецессивностью генов, контролирующих его усиление, тогда как правосторонняя асимметрия свидетельствует о доминировании генов-усилителей. Исходя из вышесказанного, в настоящем исследовании следует предположить, что большинство генов люцерны, определяющих высокий уровень встречаемости микоризной инфекции (F), доминантно, тогда как большинство растительных генов, определяющих высокое содержание везикул гриба в кортексе корня растения-хозяина (B и b), рецессивно. Ранее использование аналогичного подхода при изучении бобово-ризобияльного симбиоза показало, что у люцерны

большинство генов, контролирующих интенсивность симбиотической азотфиксации, рецессивно, а большинство генов, контролирующих эффективность, доминантно (Н.А. Проворов и др., 1987).

3.2.3. Оценка морфотипических показателей озимых образцов люцерны хмелевидной

Дополнительные данные о влиянии арбускулярной микоризы на популяционную структуру растения-хозяина были получены при анализе морфотипов. С помощью критерия χ^2 -квадрат выявлено достоверное на 5% уровне значимости ($P < 0,05$) влияние АМ на структуру популяции Павловская, у которой при микоризации наблюдалось увеличение морфотипического класса АС в 2,5 раза при снижении класса ВКС в 3,5 раза (Рис. №22). Однако для с. Мира и п. Юнтоловская не наблюдалось достоверных отличий в популяционной структуре растений в контроле и в варианте с инокуляцией эндомикоризным грибом. Таким образом, микориза ускоряет развитие растений популяции Павловская, но не влияет на морфотипическую структуру с. Мира и п. Юнтоловская.

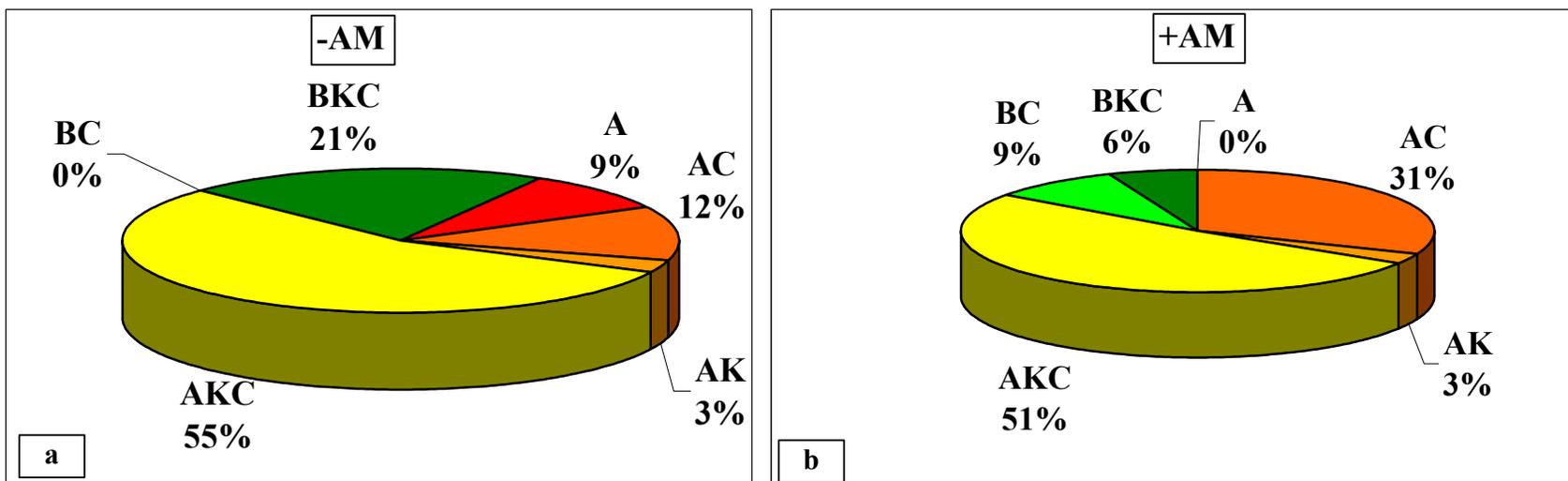


Рис. №22.1. Структура популяции Павловская по морфотипам

На Рис. а "-AM" - растения без арбускулярной микоризы; на Рис. б "+AM" - растения с арбускулярной микоризой; тип "А" - раннее цветение; тип "В" - позднее цветение; "К" - вторичное кущение; "С" - третичное кущение.

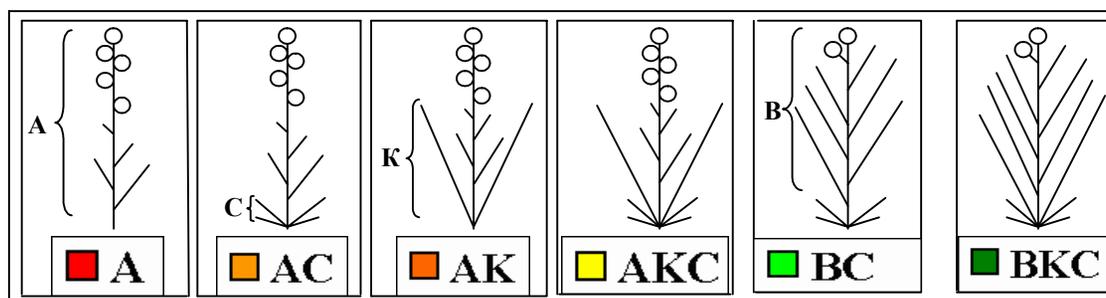


Рис. №22.2. Классификация морфотипов озимых форм люцерны хмелевидной

3.2.4. Корреляционный анализ взаимосвязей между продуктивностью растений люцерны хмелевидной и микоризообразованием

3.2.4.1. Коэффициенты корреляции

Проведен анализ корреляционных связей между показателями продуктивности и микоризообразования у 4-х образцов люцерны хмелевидной. Результаты представлены в Табл. №№11-14.

У популяции Павловская (Табл. №12) обнаружена достоверная, хотя и слабая положительная корреляция обилия арбускул (А и а) и везикул (В и в) с накоплением сухой биомассы, которая носит прямолинейный характер. Коэффициенты корреляции составляют 0,35-0,39 ($P < 0,05$). Кроме того, у п. Павловская выявлена достоверная положительная корреляционная связь обилия везикул (В и в) с высотой растения ($P < 0,05$, $P < 0,01$, соответственно; Табл. №12). В настоящем исследовании выявлена слабая корреляция между кустистостью и обилием арбускул в микоризе ($P < 0,05$; Табл. №12). Для п. Юнтоловская и сортов Мира и ВИК32 не выявлено достоверных корреляций ($P > 0,05$).

Результаты анализа свидетельствуют об отсутствии корреляционной связи между встречаемостью микоризной инфекции (F, %) и показателями продуктивности у всех образцов люцерны.

Таблица №11

Коэффициенты корреляции (r_{ij}) между показателями продуктивности и микоризообразования с. Мира (инокуляция *Gl. intraradices*)

	F, %	M, %	m, %	A, %	a, %	B, %	b, %
Кустистость, число стеблей	-0,01	0,02	0,05	0,14	0,22	0,05	0,17
Возд.-сухая биомасса (стебли + корни)	0,17	0,12	0,08	-0,10	-0,16	0,11	0,06
Средняя высота	-0,03	0,00	0,03	-0,13	-0,18	-0,13	-0,18

Примечание:

0,42², 0,36¹ - коэффициент корреляции значим при $P < 0,01$, $P < 0,05$, соответственно (t -критерий Стьюдента).

Таблица №12

Коэффициенты корреляции (r_{ij}) между показателями продуктивности и микоризообразования п. Павловская (инокуляция *Gl. intraradices*)

	F, %	M, %	m, %	A, %	a, %	B, %	b, %
Кустистость, число стеблей	0,17	0,16	0,31	0,25	0,36 ¹ ± 0,16	0,20	0,25
Возд.-сухая биомасса (стебли + корни)	0,11	0,17	0,28	0,39 ± 0,16	0,35 ± 0,16	0,37 ± 0,16	0,38 ± 0,16
Средняя высота	-0,10	0,02	0,26	0,14	0,23	0,33 ² ± 0,16	0,42 ± 0,16

Таблица №13

Коэффициенты корреляции (r_{ij}) между показателями продуктивности и микоризообразования п. Юнтоловская (инокуляция *Gl. intraradices*)

	F, %	M, %	m, %	A, %	a, %	B, %	b, %
Кустистость, число стеблей	-0,01	0,15	0,29	0,02	-0,04	0,31	0,28
Возд.-сухая биомасса (стебли + корни)	0,09	0,12	0,17	-0,17	-0,32	0,22	0,25
Средняя высота	0,11	0,08	0,07	-0,17	-0,29	0,17	0,22

Таблица №14

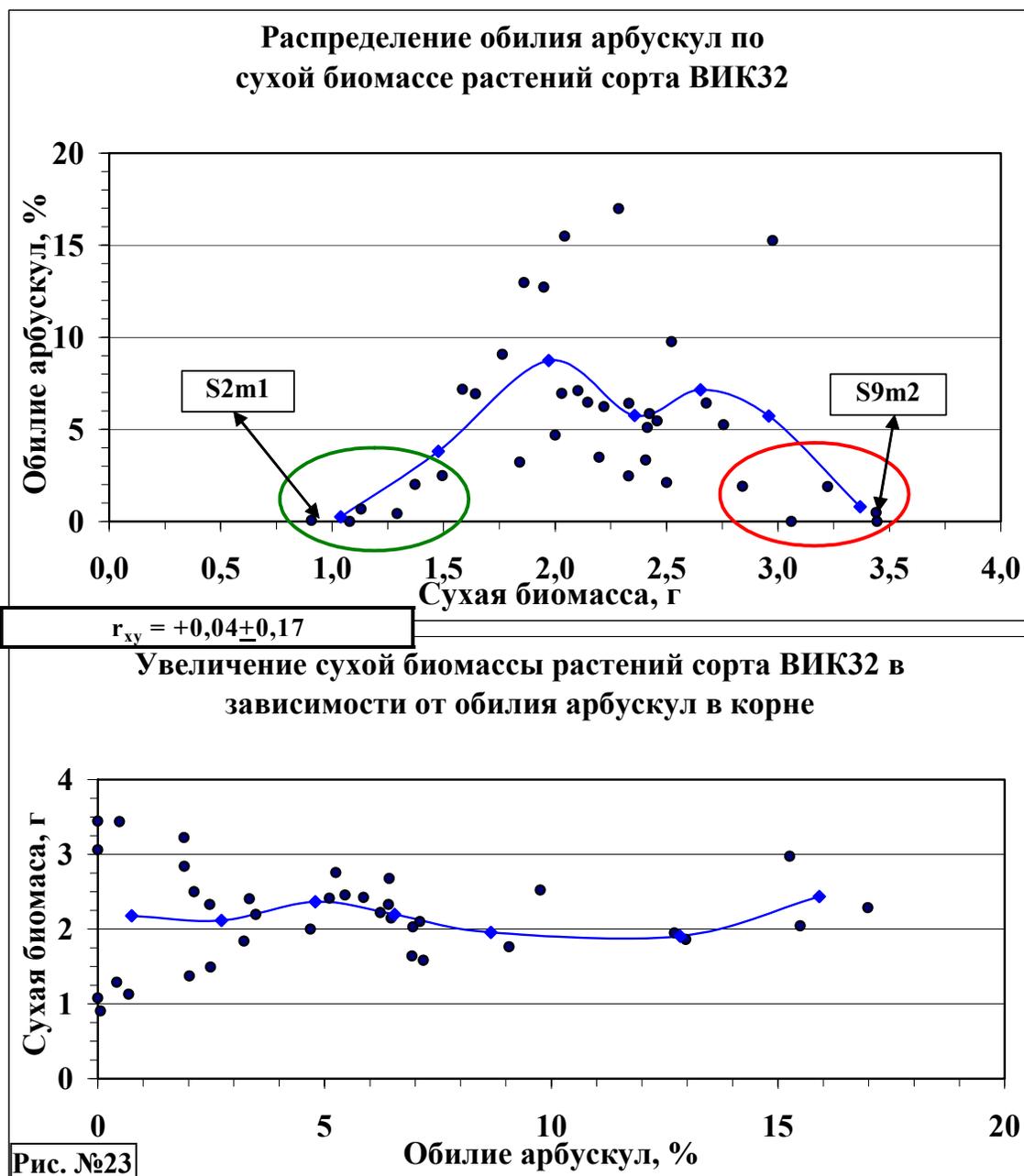
Коэффициенты корреляции (r_{ij}) между показателями продуктивности и микоризообразования с. ВИК32 (инокуляция *Gl. intraradices*)

	F, %	M, %	m, %	A, %	a, %	B, %	b, %
Кустистость, число стеблей	0,02	-0,03	0,00	0,04	0,07	-0,02	-0,01
Возд.-сухая биомасса (стебли + корни)	0,02	-0,10	-0,12	0,04	0,07	-0,24	-0,26
Средняя высота	0,06	0,04	0,04	0,20	0,22	-0,10	-0,22

3.2.4.2. Корреляционные отношения

Отсутствие линейных корреляционных связей между арбускулообразованием и накоплением сухой биомассы у с. Мира, п. Юнтоловская и с. ВИК32 люцерны хмелевидной ставит перед исследователем проблему – как показатели микоризообразования связаны с отзывчивостью на инокуляцию АМ-грибом. Поэтому было решено продолжить поиск взаимосвязи изучаемых параметров.

По результатам исследований определены корреляционные отношения между сухой биомассой и обилием арбускул в корне и построены эмпирические линии регрессии показателей продуктивности на показатели микоризообразования. Криволинейная корреляционная связь по Б.А. Доспехову (1973) выявлена для всех образцов, кроме популяции Павловская, которая характеризуется положительной линейной корреляцией. Так, у с. Мира, п. Юнтоловская и с. ВИК32 (Рис. №23) корреляционные отношения имеют достоверные значения для зависимости обилия арбускул от накопления сухой биомассы. Криволинейность обнаруженной зависимости подтверждена проверкой по *F*-критерию Фишера (согласно Б.А. Доспехову, 1973). Обратной зависимости накопления сухой биомассы от обилия арбускул не выявлено. Как обсуждалось ранее, арбускулы являются местом интенсивного обмена продуктами метаболизма между микоризным грибом и растением (С. Rausch et al., 2001; С. Rausch, М. Bucher, 2002). Возможно, что при метаболическом обмене арбускулы, как приспособление эндомикоризного гриба, в большей степени используются грибом, чем растением-хозяином.



Анализ распределения индивидуальных растений с. ВИК32 по обилию арбускул и биомассе позволил выделить две группы генотипов, характеризующие разную отзывчивость на инокуляцию. Эти группы включают генотипы, контрастные по сухой биомассе, но имеющие одинаково низкое содержание арбускул. Можно предположить, что растения из разных групп имеют разный тип питания. Растения I-ой группы получают питательные вещества из интактных арбускул (биотрофно), а растения II-ой группы – путем разрушения (лизиса) арбускул (некротрофно).

Генотипы описанных групп отобраны для получения контрастных форм (индексы линий: S2m1, S9m2 и др., см. п. 3.3).

3.3. Выделение контрастных по отзывчивости на инокуляцию *Gl. intraradices* генотипов люцерны хмелевидной

Разделы 1 и 2 результатов исследований касались первого этапа исследования симбиотической эффективности АМ. В 3-ем разделе мы приступили к следующему этапу – отбору и анализу контрастных линий люцерны.

3.3.1. Отбор контрастных по продуктивности генотипов из 4-х образцов люцерны хмелевидной

По результатам экспериментов 2003-го года из каждого образца люцерны хмелевидной на фоне АМ отобраны 5 индивидуальных растений с минимальной биомассой и 5 растений – с максимальной биомассой. Проведена их сравнительная оценка. Интегральный анализ указал на среднее превышение показателей продуктивности и микоризообразования у растений с максимальной биомассой по сравнению с растениями с минимальной биомассой.

3.3.2. Анализ отзывчивости на инокуляцию *Gl. intraradices* контрастных по продуктивности генотипов сорта ВИК32

С каждого растения с. ВИК32 собрано по 100-200 семян. Поскольку люцерна хмелевидная – самоопылитель, мы считали полученное потомство автофертильным. Заложены линии от индивидуальных растений, контрастных по биомассе.

В 2004 проведено исследование влияния инокуляции *Gl. intraradices* на отобранные генотипы. Результаты 2-го года испытаний подтвердили облигатно-микотрофный статус яровой формы, т.е. растения без микоризы на почве с низким содержанием доступного фосфора имели признаки карликовости (Рис. №№24-25).

На 35-е сутки после посадки проростков по результатам визуальной оценки выявлены достоверные различия в скорости роста растений, отобранных по минимальной и максимальной биомассе (Рис. №24).

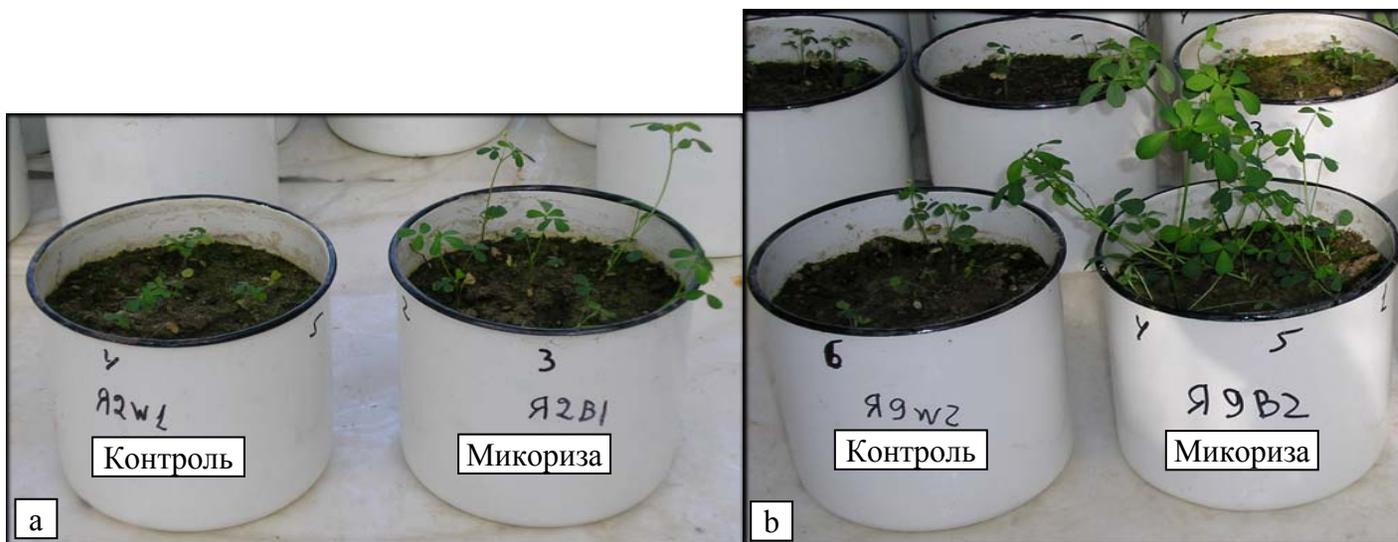


Рис. №24. Учет на 35-е сутки от посева проростков

На Рис. №24.а – растения, отобранные по минимальной биомассе в микоризе (I группа);

На Рис. №24.б – растения, отобранные по максимальной биомассе в микоризе (II группа).

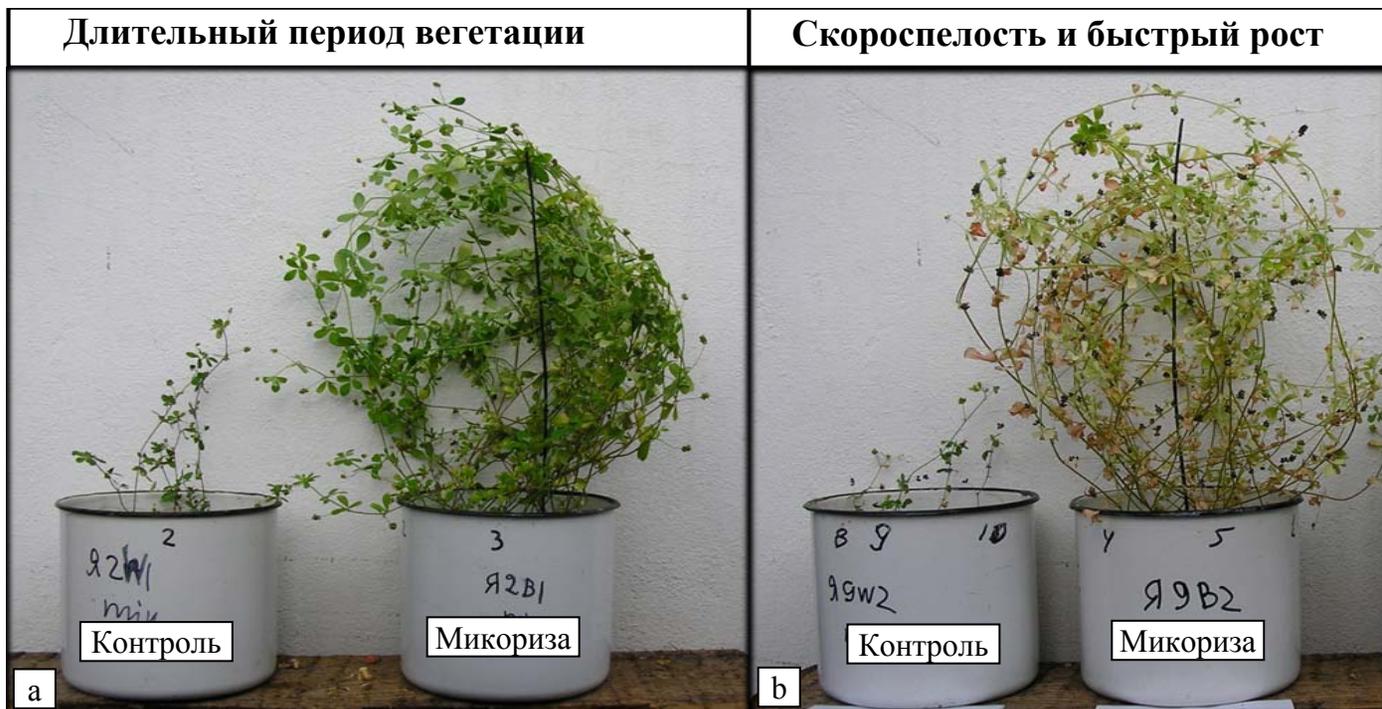


Рис. №25. Учет на 82-е сутки от посева проростков

На Рис. №25.а – растения, отобранные по минимальной биомассе в микоризе (I группа);

На Рис. №25.б – растения, отобранные по максимальной биомассе в микоризе (II группа).

Однако в конце вегетации на 82-е сутки от посадки различия по сухой биомассе были не достоверны (Рис. №25, Табл. №15). Результаты, полученные в условиях этого года, показали, что генотипы I группы (отобранные по минимальной биомассе) являются медленнорастущими, имеют длительный период вегетации, а генотипы II группы (отобранные по максимальной биомассе) являются быстрорастущими и скороспелыми (Рис. №25). Вероятно, что различий по величине сухой биомассы у двух анализируемых контрастных групп растений не наблюдалось вследствие растянутой фазы роста (в связи с погодными условиями лета 2004 г.). Для выявления различий отобранных генотипов необходимы дополнительные опыты с исследованием динамики развития растений этих групп в оптимальных для роста условиях.

Выделены контрастные линии сорта ВИК32 – хорошо отзывчивая на микоризацию линия S9m2 и плохо отзывчивая линия S2m1 (Рис. №25). Достоверные различия ($P < 0,01$) зарегистрированы по срокам созревания и по массе зрелых семян (Рис. №26).

Таблица №15

Влияние инокуляции *Gl. intraradices* на продуктивность контрастных генотипов сорта ВИК32

Генотип	Фаза роста на	Фаза развития на		Надземная сухая биомасса, г	Сухая биомасса (корни), г	Высота главного стебля, см
	26.07.04	26.07.04	30.07.04			
I группа генотипов с низкой отзывчивостью						
S2m1 ¹	3 нл ³	вегетация	начало бутонизации	1,64	0,28	63,2
S2w1 ²	2 нл	вегетация	вегетация	0,09	0,01	13,0
S13m2	3-4 нл	вегетация	бутонизация	1,21	0,17	57,8
S13w2	2 нл	вегетация	вегетация	0,04	0,01	13,7
S10m5	4 нл	вегетация	бутонизация	1,39	0,22	66,2
S10w5	2 нл	вегетация	вегетация	0,04	0,01	10,8
S9m1	4 нл	вегетация	вегетация	1,45	0,23	58,0
S9w1	3 нл	вегетация	вегетация	0,02	0,02	6,2
II группа генотипов с высокой отзывчивостью						
S6m3	5 нл (крупный)	начало бутонизации	цветение	1,50	0,24	57,8
S6w3	2-3 нл	вегетация	начало бутонизации	0,04	0,01	11,0
S6m4	3-4 нл (крупный)	вегетация	бутонизация	1,30	0,29	70,4
S6w4	2-3 нл	вегетация	вегетация	0,06	0,01	12,2
S4m2	4 нл	вегетация	начало цветения	1,59	0,26	60,4
S4w2	3 нл	вегетация	начало бутонизации	0,04	0,01	9,4
S9m2	4-5 нл (крупный)	вегетация	начало бутонизации	1,51	0,24	57,3
S9w2	3 нл	вегетация	бутонизация	0,05	0,01	10,8
НСР ₀₅				0,41	0,06	6,8

Примечание: стерилизация семян проведена 21.06.04, посадка проростков в сосуды - 27.06.04, уборка растений на 83 сутки от посадки - 18.09.04; каждый генотип был изучен в 10-кратной повторности;

S2m1¹ - растения с микоризой; S2w1² - растения без микоризы; 3 нл³ – начало 3-го листа.

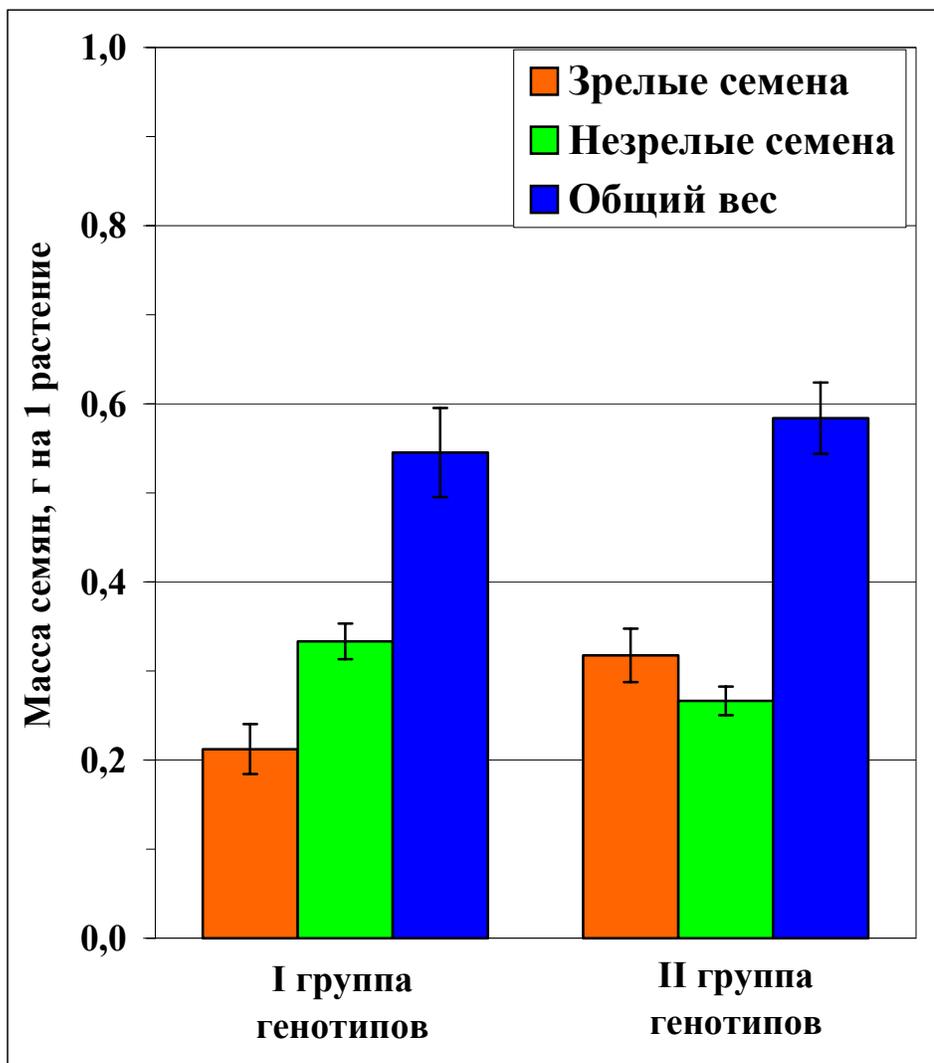


Рис. №26. Средний урожай семян контрастных генотипов яровой люцерны сорта ВИК32.

Генотипы I группы – потомство растений с минимальной биомассой на фоне АМ, генотипы II группы – потомство растений с максимальной биомассой.

3.3.3. Выделение немикоризуемой формы из популяции Павловская

В 2004 году был запланирован и проведен опыт на п. Павловская, которая оказалась наиболее полиморфной по результатам 2003-го года. В результате отобрана линия P5m3, обладающая минимальной биомассой (0,15 г) на момент уборки на 88-е сутки от посадки проростков (Табл. №16).

Таблица №16

Показатели продуктивности и микоризообразования линии P5m3 и средние по популяции Павловская

Генотип	Средняя высота, см	Кустистость, количество стеблей	Сухая биомасса (стебли + корни), г	Встречаемость микоризной инфекции, %
P5m3	3,5	1	0,15	0,0
Среднее по популяции	5,9 ± 0,8	6,3 ± 0,4	0,95 ± 0,14	65,6 ± 8,0

P5m3 – единственная линия, растения которой, как оказалось, *неспособны* к формированию симбиоза с грибом *Glomus intraradices* (Табл. №16). По результатам экспериментов 2004-го года потомство данного растения также не микоризуется *Gl. intraradices* (10-кратная повторность).

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования АМ по настоящее время проводятся на мутантах бобовых, отобранных по прерыванию стадий клубенькообразования. Такой подход позволил выявить первые гены, клонировать их, начать молекулярный анализ АМ. Но он позволяет выходить только на общие стадии развития АМ и клубеньков. Практическая ценность таких мутантов тоже ограничена. С их помощью до сих пор не удалось изучить механизмы формирования высокоэффективного симбиоза. Мутанты по симбиотической эффективности получены не были. Таким образом, современные исследования симбиоза высших растений и эндомикоризных грибов показали необходимость поиска новых объектов для изучения механизмов, контролирующей эффективность арбускулярной микоризы.

Настоящее исследование – это первый шаг к решению поставленной проблемы. Возможно, с. ВИК32 люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*), который по результатам исследования является облигатно-микотрофной формой, станет новой удобной растительной моделью для изучения микоризы (см. Рис. №27).

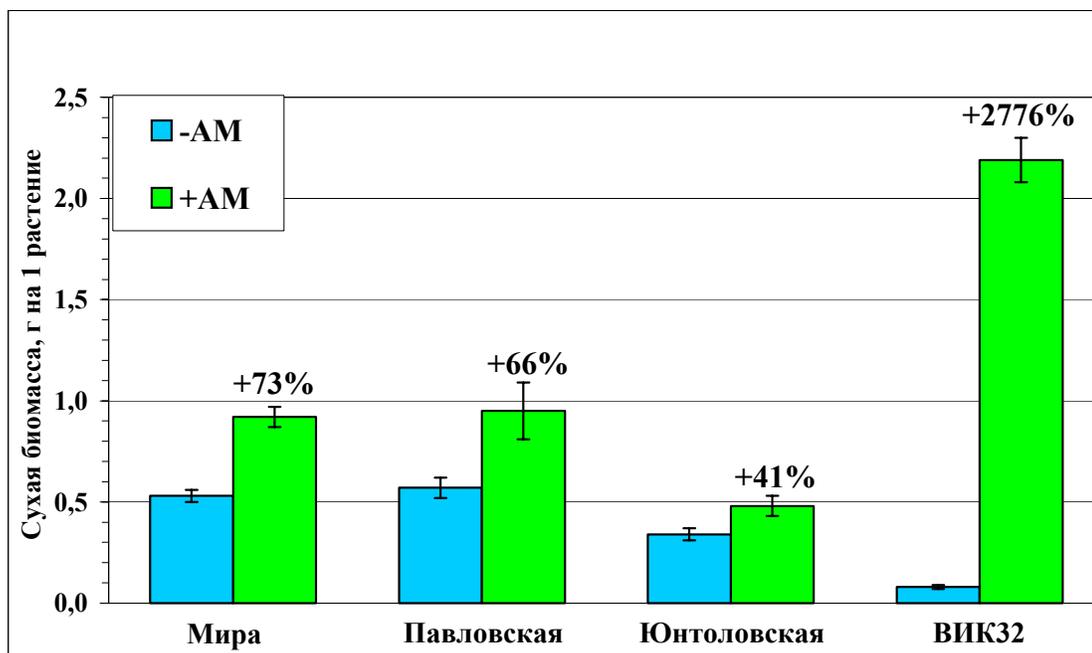


Рис. №27. Сухая биомасса растений люцерны хмелевидной.

Это растение не способно без участия АМ адаптироваться к низко фосфорным условиям почвы, что и определяет их карликовость в контрольном варианте

(растения без АМ) (Рис. №16). Кроме того, это единственный образец, обладающий общей закономерностью изменения коэффициентов вариации в микоризе по сравнению с контролем. Они снижаются как по кустистости, так и по высоте и сухой биомассе (Рис. №№17-19). Это означает, что АМ оптимизирует рост этой формы люцерны хмелевидной.

Отметим общую закономерность для всех исследуемых образцов люцерны: микориза реализует генетический потенциал исследуемых образцов люцерны по показателям продуктивности (Табл. №6).

Важным результатом исследований структуры микоризы сорта ВИК32 следует считать следующее заключение: растения имеют низкое обилие арбускул (п. 3.1.1, Табл. №5) и при этом способны адаптироваться к низкому содержанию доступного для их питания фосфора в почве при микоризации (п. 3.1.2, Рис. №16). Отметим, что, согласно исследованиям ряда авторов (I. Jakobsen, 1999; J. F. Marsh, M. Schultze, 2001; C. Rausch et al., 2001; M. Hahn, K. Mendgen, 2001; C. Rausch, M. Bucher, 2002; M.J. Harrison, et al., 2002), арбускулы играют ключевую роль в совместном метаболизме микоризного гриба и растения-хозяина. Исходя из вышесказанного, можно оформить выводы по исследованию структуры микоризы сорта ВИК32 в виде трех гипотез:

а) Эндомикоризный гриб (*Glomus intraradices*) является необходимым для растений с. ВИК32 только на ранних этапах становления симбиоза согласно гипотезе М. Tsimilli-Michael, R.J. Strasser о запуске механизма микоризы (М. Tsimilli-Michael, R.J. Strasser, 2002). Такая гипотеза подтверждается данными электронной микроскопии Р. Bonfante-Fasolo, А. Fontana (1985): клетки с арбускулами находятся в активном состоянии (четко различаются ядро, митохондрии и пр. органеллы), хроматин находится в диффузном состоянии, что свидетельствует о его высокой транскрипционной активности. Клетки без арбускул по тем же данным практически полностью заполнены вакуолью и неактивны. Р. Bonfante-Fasolo, А. Fontana делают вывод о том, что арбускулы гриба активируют/запускают метаболические процессы в клетке растения-хозяина. Для

подтверждения данной гипотезы необходимо проведение исследований отзывчивости яровой люцерны – с. ВИК32 на микоризацию разными штаммами эндомикоризных грибов.

б) Растения яровой люцерны, обладающие низкой биомассой, получают питательные вещества из интактных арбускул (биотрофно), а растения, обладающие высокой биомассой, – путем разрушения (лизиса) арбускул (некротрофно) (Рис. №23).

в) Арбускулы в корнях растений с. ВИК32 не являются основными органеллами, через которые происходит транспорт питательных веществ из гриба в растение.

Каждая гипотеза требует проверки и проведения отдельных исследований, однако каждая из них имеет право на существование до момента опровержения.

По совокупным результатам анализа коэффициентов вариации, асимметрии и эксцесса составлена таблица наличия/отсутствия внутрипопуляционного полиморфизма по симбиотической эффективности (Табл. №17).

Анализ литературных данных показал, что исследования внутрипопуляционного полиморфизма по эффективности симбиоза проводились на бобово-ризобиальном симбиозе (В.И. Сметанин, В.К. Шумный, 1982), но не проводились на арбускулярной микоризе. В настоящем исследовании впервые описан полиморфизм люцерны хмелевидной по эффективности АМ симбиоза в отсутствии инокуляции ризобиальными бактериями.

Таблица №17

Выявление полиморфизма по отзывчивости на инокуляцию *Glomus intraradices* образцов люцерны хмелевидной различного происхождения

Статистический параметр	Высота		Кустистость		Биомасса	
	-АМ	+АМ	-АМ	+АМ	-АМ	+АМ
	Сорт Мира					
$C_v, \%$	29 ¹	61	38	21	39	39
As	2,6	1,5	-0,8	-0,3	0,0	0,9
Ex	10,3	4,4	-0,2	-0,3	-0,5	0,2
	Популяция Павловская					
$C_v, \%$	43	78	61	39	53	89
As	1,3	1,7	0,5	-0,3	0,7	1,6
Ex	1,6	2,0	-0,8	-0,7	-0,3	1,4
	Популяция Юнтоловская					
$C_v, \%$	39	65	53	39	58	57
As	0,4	1,4	0,4	0,2	0,4	1,4
Ex	-1,0	1,7	-1,1	-0,7	-0,9	1,8
	Сорт ВИК32					
$C_v, \%$	32	10	47	12	60	29
As	0,5	0,0	1,6	-0,8	1,8	0,0
Ex	0,6	-0,6	2,5	0,9	5,7	-0,6

Примечание: см. Табл. №6.

29¹ - значения, выделенные красным цветом указывают на наличие внутривидового полиморфизма люцерны хмелевидной (достоверные различия контроля и опыта).

Морфотипический анализ популяций люцерны хмелевидной (*M. lupulina* L.) выполнен впервые. Результаты послужат основой:

- для составления признаковой коллекции люцерны хмелевидной;
- для идентификации по морфометрическим показателям на внутривидовом уровне во ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова.

Для популяции Павловская выявлена достоверная положительная корреляционная связь между обилием арбукул/везикул с показателями продуктивности ($P < 0,05$, $P < 0,01$, Табл. №12). Для п. Юнтоловская и сортов Мира и ВИК32 не выявлено достоверных корреляций ($P > 0,05$). Это указывает на то, что у популяции Павловская шел более активный обмен веществ между микоризным

грибом и растением через арбускулы в клетках кортекса, чем у остальных образцов. Но для того, чтобы подтвердить или опровергнуть это предположение, необходимо проведение дополнительного исследования динамики микоризообразования.

Согласно данным ряда авторов дикорастущие популяции растений более переменчивы по активности симбиоза с микроорганизмами, чем сорта (N.A. Provorov, B.V. Simarov, 1990; A. Martensson, I. Rydberg, 1996; Л.М. Якоби и др., 2000). Результаты настоящего исследования подтверждают данный факт. Высоко полиморфная (Рис. №19) дикорастущая популяция Павловская, как природный резервуар симбиотических генов, представляет собой интересный материал для проведения молекулярно-генетических исследований эффективности АМ.

По результатам анализа литературных источников не обнаружено ни одного исследования, направленного на отбор контрастных по отзывчивости на инокуляцию АМГ генотипов растений люцерны. В настоящем исследовании отобраны контрастные линии сорта ВИК32 (S9m2 и S2m1, Рис. №28) и линия P5m3 (Табл. №16) популяции Павловская, неспособная формировать микоризу. Анализ таких линий может дать качественно новую информацию о механизмах регуляции эффективности арбускулярной микоризы.

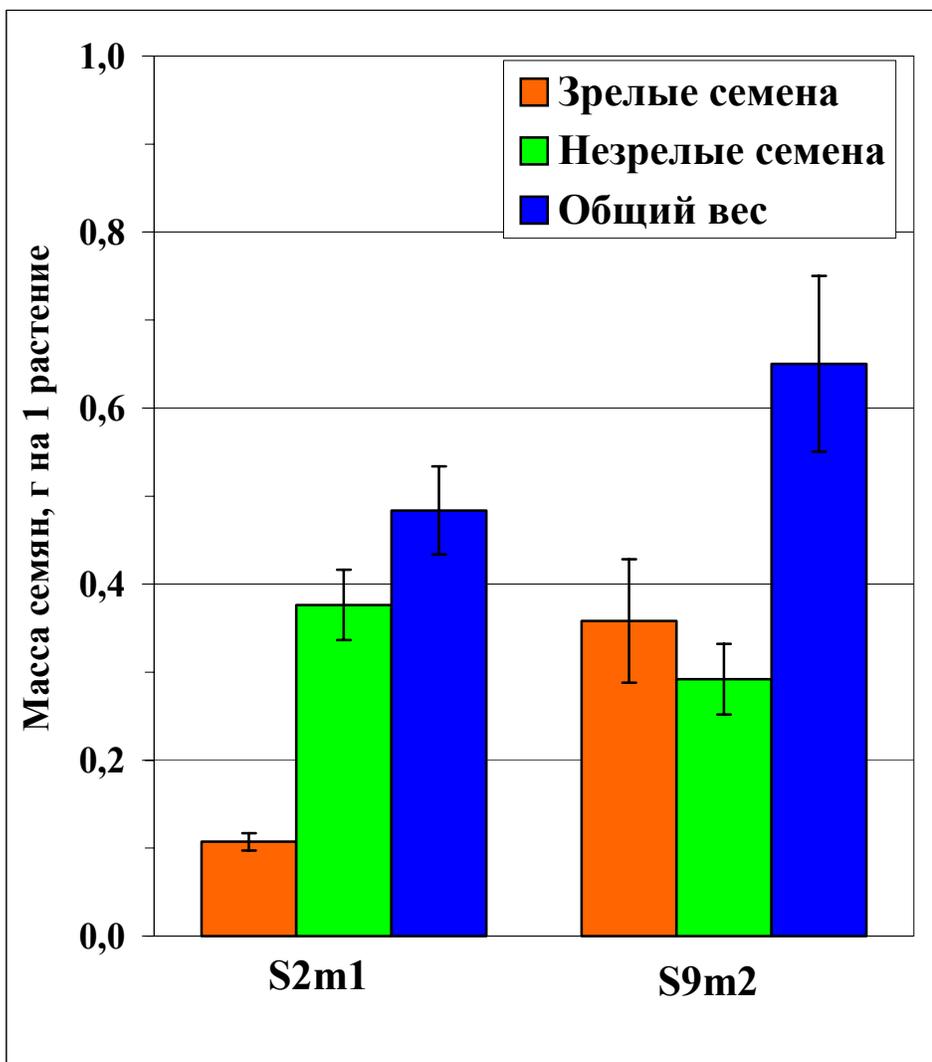


Рис. №28. Урожай семян контрастных генотипов яровой люцерны сорта ВИК32.

Таким образом, суммируя полученные результаты отметим, что наиболее удобными моделями для исследования эффективности АМ представляются: дикорастущая популяция Павловская, как наиболее полиморфная, и примитивный сорт ВИК32, как облигатно-микотрофная форма.

Научная значимость проведенных исследований состоит в том, что впервые контрастные по отзывчивости на микоризацию линии люцерны хмелевидной (S2m1 и S9m2 – из с. ВИК32, а также P5m3 – из п. Павловская) будут использованы для выявления генов, задействованных в механизмах регуляции эффективности микоризного симбиоза высших растений и арбускулярных грибов, а в перспективе – для изучения молекулярных механизмов симбиотрофии.

Практическая значимость полученных результатов заключается в том, что получены контрастные генотипы. Популяция Павловская является высоко полиморфной, т.е. из нее можно будет выделить наиболее отзывчивые на инокуляцию АМГ линии. Эта популяция представляет интерес для селекции, направленной на повышение симбиотической эффективности. Высоко отзывчивые на микоризацию генотипы могут быть использованы для создания высокопродуктивных симбиотических систем «растения-микроорганизмы». Внедрение сортов с высокой симбиотической активностью позволит снизить нормы минеральных удобрений и сделать производство сельскохозяйственной продукции экологически безопасным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Арбускулярная микориза – это важная форма растительно-микробных взаимодействий. Ее генетические исследования в настоящее время ограничены. Цель нашей работы направлена на решение одной из фундаментальных проблем биологии микоризы – проблемы, связанной с поиском модельных объектов для изучения генетических и молекулярных механизмов, контролирующих эффективность микоризного симбиоза. В результате проделанной работы мы выявили различия между формами люцерны хмелевидной разного происхождения по эффективности симбиоза с грибом *Glomus intraradices*. Среди проанализированных образцов была отобрана облигатно-микотрофная форма люцерны – сорт ВИК32, для которой характерна карликовость растений без АМ на фоне низкого фосфора. Выявлен и описан внутривидовой полиморфизм по эффективности симбиоза люцерны хмелевидной с грибом *Gl. intraradices*. Проанализирована морфотипическая структура озимых форм. Наибольшей вариабельностью по результатам исследований обладает популяция Павловская, для которой действие микоризы выявлено как по изменениям статистических параметров ($Cv/As/Ex$) показателей продуктивности, так и по изменению встречаемости морфотипов в популяции. Кроме того, для данного образца выявлена достоверная положительная корреляционная связь между накоплением сухой биомассы и обилием арбускул. В результате второго эксперимента были отобраны контрастные по отзывчивости на инокуляцию *Gl. intraradices* линии сорта ВИК32: высоко отзывчивая линия S9m2 и слабо отзывчивая линия S2m1. Для них выявлены различия по срокам созревания и по массе зрелых семян. По результатам двухлетних испытаний из популяции Павловская отобрана линия P5m3, неспособная к формированию арбускулярной микоризы.

Полученные результаты открывают возможности для выявления и молекулярного анализа новых симбиотических генов, в том числе и для изучения контроля симбиотической эффективности и создания материала для селекции растений.

Дальнейшие исследования могут включать два направления:

1. Генетические исследования линий с. ВИК32 – S9m2 (с высокой отзывчивостью) и S2m1 (с низкой отзывчивостью). Проведение скрещиваний низко отзывчивых с высоко отзывчивыми линиями люцерны хмелевидной. Это позволит изучить возможность выявления менделирующих генов, контролирующих эффективность микоризного симбиоза.

2. Генетические исследования линий п. Павловская. Проведение скрещиваний немикоризируемой Мус⁻ линии P5m3 с микоризируемой линией. Перед проведением скрещиваний необходимо проверить, сохраняется ли фенотип Мус⁻ линии P5m3 при инокуляции различными штаммами эндомикоризных грибов. Вероятно, следует также проверить и фенотип линии по отношению к симбиозу с ризобиями (Nod-фенотип). Исследования такой природной формы могут расширить наше понимание механизмов формирования эффективного симбиоза.

Отметим, что все исследования АМ-симбиоза строятся на мутантах по бобово-ризобиальному симбиозу (A.Yu. Borisov et al., 1992; V. Gianinazzi-Pearson, 1996, 1997). Поэтому гены, экспрессируемые в АМ, являются генами, задействованными и в бобово-ризобиальном симбиозе. Таким образом, возникла проблема выявления специфических генов, контролирующих образование и развитие АМ. В этом плане представляют интерес исследования на небобовых растениях: кукурузе, томате и пр. (A. Klingner et al., 1995; C. Cordier et al., 1998). Однако настоящее исследование природной формы с Мус⁻ фенотипом будет первой попыткой независимого анализа симбиотических генов арбускулярной микоризы бобовых от анализа *Sym*-генов, задействованных в симбиозе растений с ризобиями.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружены различия между формами люцерны хмелевидной разного происхождения по эффективности симбиоза с грибом *Glomus intraradices*. Отобрана облигатно-микотрофная форма люцерны – сорт ВИК32.

2. Выявлен внутривидовой полиморфизм по эффективности симбиоза люцерны хмелевидной с грибом *Gl. intraradices*. Наиболее вариабельной является популяция Павловская. Для данного образца выявлена достоверная положительная корреляционная связь между накоплением сухой биомассы и обилием арбускул.

3. Отобраны контрастные по отзывчивости на инокуляцию *Gl. intraradices* линии сорта ВИК32: высоко отзывчивая линия S9m2 и слабо отзывчивая линия S2m1. Из популяции Павловская отобрана линия P5m3, неспособная к формированию арбускулярной микоризы.

Студент:

Юрков А.П.

Научный руководитель:

Якоби Л.М.

Куратор:

Проворов Н.А.

Список публикаций автора

1. Юрков А.П., Якоби Л.М., Дзюбенко Н.И., Румянцева М.Л. Полиморфизм люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) по эффективности симбиоза с эндомикоризным грибом *Glomus intraradices*. Тез. докл. II Московского международного Конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития". Часть 1. Москва, 14-18 ноября. 2003а. С. 239.
2. Yurkov A.P., Jacobi L.M., Dzyubenko N.I., Roumiantseva M.L. Polymorphism of black medic (*Medicago lupulina*) for the efficiency of the symbiosis with endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*// Abstr. In Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development: Proceedings of the II Moscow International Congress International Congress (10-14 November 2003, Moscow, Russia). Moscow: P&I JSC «Maxima», D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 2003b. – Part I. P. 240.
3. Jacobi, L., Yurkov, A., Popov, A., Donskikh, N., Kozhemyakov, A. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi on the perennial legume grasses at the high phosphorus level in soil// Abstr. In XIth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions: New bridges between Past and Future. St.-P., Russia. July 18-26. 2003. p. 338.
4. Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В., Румянцева М.Л. Полиморфизм двух яровых форм люцерны по эффективности микоризного симбиоза в условиях низкого содержания доступного фосфора в почве// Тез. докл. III съезда ВОГиС "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития". Том I. Москва, 6-12 июня 2004а. С. 467.
5. Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В., Дзюбенко Н.И., Румянцева М.Л. Полиморфизм озимых форм люцерны хмелевидной по эффективности микоризного симбиоза и отбор генотипов с высокой симбиотической активностью// Тез. докл. III съезда ВОГиС "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития". Том I. Москва, 6-12 июня 2004б. С. 468.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1973. – 338 с.
2. Каратыгин И.В. Коэволюция грибов и растений: экологические и филогенетические последствия// Ботанический журнал. – 1990. – Л.: Наука. – Т. 75, №8. – С. 1049-1060.
3. Каратыгин И.В. Коэволюция грибов и растений// Труды Ботанического института РАН. – Л., 1993. – Т.1, №9. – С. 1-118.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
5. Маршунова Г.Н., Якоби Л.М. Принципы отбора эффективных культур эндомикоризных грибов// Микроорганизмы в сельском хозяйстве/ Тезисы докладов Республиканской конференции. – Кишинев, 1988. – С. 166-168.
6. Муромцев Г.С. Методы исследования грибов, образующих с растениями микоризу арбускулярно-визикулярного типа/ Под ред. Г.С. Муромцева. – СПб.: ВНИИСХМ, 1992. – 44 с.
7. Одум Ю. Основы экологии/ Под ред. Н.П. Наумова. Пер. с англ. изд. – М.: Мир, 1975. – 502 с.
8. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе// Журнал общей биологии. – 2001. – Т. 62, №6. – С. 472-495.
9. Проворов Н.А. Соотношение симбиотрофного и автотрофного питания азотом у бобовых растений: генетико-селекционные аспекты// Физиология растений. – 1996. – Т. 43, №1. – С. 127-135.
10. Проворов Н.А., Симаров Б.В., Зарецкая А.Н. и др. Изменчивость культурных видов люцерны по способности к симбиотической азотфиксации// Сельскохозяйственная биология. – 1987. – №6. – С. 29-32.
11. Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм растений в степной зоне// Микориза и другие формы консортивных отношений в природе/ Республиканский сборник научных трудов. – Пермь, 1978. – С. 7-18.
12. Серебровский А.С. Генетический анализ. – М.: Наука, 1970. – 344 с.
13. Сметанин В.И., Шумный В.К. Структура популяций люцерны (*Medicago sativa* L.) по уровню азотфиксации// Сиб. вестн. с.-х. науки. – 1982. №6 (72). – С. 38-43.

14. Степанова Г.В. Хозяйственное использование люцерны хмелевидной// Селекция и семеноводство. – 1998. – №3. – С. 18-20.
15. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий// Экологич. генетика. – 2004. – Т.1, №0. – С. 36-46.
16. Утемова Л.Д. Влияние везикулярно-арбускулярной микоризы на рост и развитие злаков, выращенных на фоне труднорастворимых фосфатов// Микориза и др. формы консортив. связей в природе. – Пермь, 1989. – С. 49-54.
17. Хедрик Ф. Генетика популяций. – М.: Техносфера, 2003. – 592 с.
18. Юрков А.П., Якоби Л.М., Дзюбенко Н.И. и др. Полиморфизм люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) по эффективности симбиоза с эндомикоризным грибом *Glomus intraradices*// Тезисы докладов участников II Московского международного Конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития". – М., 14-18 ноября, 2003. – С. 239.
19. Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В. и др. Полиморфизм озимых форм люцерны хмелевидной по эффективности микоризного симбиоза и отбор генотипов с высокой симбиотической активностью// Тезисы докладов участников III съезда ВОГиС "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития". – М., 6-12 июня, 2004b. – Т.1. – С. 468.
20. Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В. и др. Полиморфизм двух яровых форм люцерны по эффективности микоризного симбиоза в условиях низкого содержания доступного фосфора в почве// Тезисы докладов участников III съезда ВОГиС "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития"– М., 6-12 июня, 2004а. – Т.1. – С. 467.
21. Якоби Л.М., Кукалев А.С., Ушаков К.В. и др. Полиморфизм форм гороха посевного по эффективности симбиоза с эндомикоризным грибом *Glomus sp.* в условиях инокуляции ризобиями// Сельскохозяйственная биология. – 2000. – №3. – С. 94-102.
22. Allen M.F. The Ecology of Mycorrhizae. – Cambridge: Cambridge University Press, 1991. – 184 p.

23. Allen M.F., Moore T.S.Jr., Christensen M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae: I. Cytokinin increases in the host plant// Can. J. Bot. – 1980. – V.58. – P. 371-374.
24. Allen M.F., Moore T.S.Jr., Christensen M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant// Can. J. Bot. – 1982. – V.60, N4. – P. 468-471.
25. Bago B., Pfeffer P.E., Douds D.D.Jr. et al. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy// Plant Physiology. – 1999. – V.121. – P. 263–271, www.plantphysiol.org.
26. Bago B., Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas// Plant Physiology. – 2000. – V.124. – P. 949–957, www.plantphysiol.org.
27. Barker S.J., Tagu D., Delp G. Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses// Plant Physiology. – 1998. – V.116. – P. 1201–1207.
28. Bethlenfalvay G.J. Mycorrhizae and crop productivity// Mycorrhizae in sustainable agriculture. – Madison: Amer. Soc. Agronomy Press, 1992. – N54. – P. 1-28.
29. Bolan, N.S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants// Plant and Soil. – 1991. – V.134. – P. 189-207.
30. Bolan N.S., Robson A.D., Barrow N.J. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the availability of iron phosphates to plants// Plant and Soil. – 1987. – V.99, N2-3. – P. 401-410.
31. Bonfante-Fasolo P., Fontana A. VAM fungi in *Ginkgo biloba* roots: their interactions at cellular level// Symbiosis. – 1985. – V.1. – P. 53-67.
32. Bonfante-Fasolo P. Some ultrastructural features of the vesicular-arbuscular mycorrhiza in the grapevine// Symbiosis. – Vitis, 1978. – V.17. – P. 386-395.
33. Borisov A.Y., Jacobi L.M., Lebsky V.K. et al. Pea (*Pisum sativum* L.) genetic system controlling development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza// New Approches and Techniques in Breeding Sustainable Fodder

- Cropes and Amenity Grasses. – S.-Peterburg, Russia: VIR Publishers, 2000. – P. 231-236.
34. Borisov A.Y., Morzhina E.V., Kulikova O.A. et al. New symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) affecting either nodule initiation and symbiosome development// Symbiosis. - 1992. – V.14. – P. 297-313.
35. Burleigh S.H., Cavagnaro T., Jakobsen I. Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition// J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53, N374. – P. 1593-1601.
36. Cordier C., Pozo M.J., Barea J.M. et al. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phitophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus// Molecular Plant-Microbial Interactions. – 1998. – V.11. – P. 1017-1028.
37. Caron M. 1989. Potential use of mycorrhizae in control of soilborne diseases// Can. J. Plant Pathol. 11: 177-179.
38. Danneberg G., Latus C., Zimmer W. et al. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.)// J. Plant Physiol. – 1992. – V.141 – P. 33-39.
39. De Wit, Huang R.-Sh., Smith W.K. et al. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth, water relations, and leaf orientation in *Leucaena leucocephala* (Lam.)// New Phytol. – 1985. – V.99, N2. – P. 229-243.
40. Dehne H.W. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens// Phytopathology. – 1982. – V.72. – P. 1115-1119.
41. Diop T.A., Krasova-Wade T., Diallo A. et al. *Solanum* cultivar responses to arbuscular mycorrhizal fungi: growth and mineral status// African J. Biotech. – 2003. – V.2, N11. – P. 429-433, <http://www.academicjournals.org/AJB>
42. Dissing-Neilsen J. The effects of VAM on growth and uptake of nutrients in lucerne// Ecol. And Appl. Aspects Ecto- and Endomycorrhizal Assoc./ Abstr. 2nd Eur. Symp. Mycorrhizal, 5-9 Aug., 1988. – Praha, 1989. – P. 99-102.

43. Duc G., Trouvelot A., Gianinazzi-Pearson V. et al. First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc^-) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.)// *Plant Sci.* – 1989. – V.60. – P. 215-222.
44. Endre G., Kereszt A., Kevei Z. et al. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development// *Nature.* – 2002. – V.417, N27. – P. 962-966.
45. Franken P., Gianinazzi-Pearson V. Construction of genomic phage libraries of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Scutellospora castanea* and isolation of ribosomal RNA genes// *Mycorrhiza.* – 1996. – V.6. – P. 167-173.
46. Gadkar, V., David-Schwartz, R., Kunik, T. et al. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition// *Plant Physiol.* – 2001. – V.127. – P. 1493-1499.
47. Gianinazzi, S., Schüepp, H. Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. – Basel: Birkhäuser. – 1994. – 413 p.
48. Gianinazzi S., Schüepp, Barea J.M. et al. Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts. – Basel: Birkhäuser. – 2002. – 340 p.
49. Gianinazzi-Pearson V. Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. – Berlin: Springer-Verlag. – 1997. – P. 321-324.
50. Gianinazzi-Pearson V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis// *Plant Cell.* – 1996. – V.8. – P. 1871-1883.
51. Giovannetti M., Sbrana C. Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi// *Mycorrhiza* – 1998. – V.8. – P. 123-130.
52. Gollotte A., Brechenmacher L., Weidmann S. et al. Plant genes involved in arbuscular mycorrhizal formation and functioning// *Mycorrhizal Technology in Agriculture. From Genes to Bioproducts.* – Switzerland: Birkhäuser Verlag. – 2002. – P. 87-103.
53. Hahn M., Mendgen, K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant–fungus interfaces// *Current Opinion in Plant Biology.* – 2001. – V.4. – P. 322–327.
54. Hardie K. The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizal plants// *New Phytol.* – 1985. – V.101. – P. 677-684.

55. Harley J.L., Harley E.L. A check-list of mycorrhiza in the British flora// *New Phytology*. – 1987. – V.105. – P. 1–102.
56. Harrison M.J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association// *Trends in Plant Science*. – 1997. – V.2, N2. – P. 54-60.
57. Harrison M.J., Dewbre G.R., Liu J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi// *The Plant Cell*. – 2002. – V.14. – P. 2413-2429.
58. van der Heijden M.G.A., Boller T., Wiemken A. et al. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure// *Ecology*. – 1998. – V.79. – P. 2082-2091.
59. Hetrick B.A., Wilson G.W.T., Todd T.C. Differential responses of C₃ and C₄ grasses to mycorrhizal symbiosis, phosphorus fertilization, and soil microorganisms// *Can. J. Bot.* – 1990. – V.68, N3. – P. 461-467.
60. Jacobi L.M., Petrova O.S., Tsyganov V.E. et al. Effect of mutations in the pea genes *Sym33* and *Sym40*. I. Arbuscular mycorrhiza formation and function// *Mycorrhiza*. 2003a. – V.13. – P. 3-7.
61. Jacobi L., Yurkov A., Popov A. et al. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi on the perennial legume grasses at the high phosphorus level in soil// *Abstr. XIth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions: New bridges between Past and Future*. – St.-Petersburg, Russia, July 18-26, 2003. – P. 338.
62. Jacobi L.M., Zubcova L.A., Barmicheva E.M. et al. Effect of mutations in the pea genes *Sym33* and *Sym40*. II. Dynamics of arbuscule development and turnover// *Mycorrhiza*. – 2003b. – V.13. – P. 9-16.
63. Jakobsen I. Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhiza// *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology, and biotechnology*. 2nd ed. – Berlin: Springer, 1999. – P. 305-332.
64. Jakobsen I., Joner E.J., Larsen J. Hyphal phosphorus transport, a keystone to mycorrhizal enhancement of plant growth// *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. – Basel: Birkhauser Verlag, 1994. – P. 133–146.

65. Kahiluoto H. How to measure the effectiveness of mycorrhiza// Lantbr. Akad. Tidskr. – 1998. – V.137, N7. – P. 119-120.
66. Kjöllér R., Rosendahl S. The presence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* influences enzymatic activities of the root pathogen *Aphanomyces euteiches* in pea roots// Mycorrhiza. – 1996. – V.6. – P. 487–491.
67. Klingner A., Bothe H., Wray V. et al. Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization// Phytochemistry – 1995. – V.38. – P. 53-55.
68. Krusell L., Madsen L.H., Sato S. et al. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase// Nature. – 2002. – V.420, N6914. P. 422.
69. Lambert D.H., Baker D.E., Cole Jr.H. The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper, and other elements// Soil Sci. Soc. Amer. J. – 1979. – V.73, N5. – P. 976-980.
70. Lévy J., Bres C., Geurts R. et al. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses// Science. – 2004. – V.303. – P. 1361-1364.
71. Limpens E., Franken C., Smit P. et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection// Science. – 2003. – V.302, N5645. – P. 630-633.
72. Linderman R.G. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: The mycorrhizosphere effect// Phytopathology. – 1988. – V.78. – P. 366-371.
73. Linderman R.G. Part I. Role of VAM Fungi in Biocontrol// Mycorrhizae and Plant Health/ Role of Mycorrhizae in Biocontrol. – St. Paul: APS Press, 1994. – P. 345.
74. Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals// Nature. – 2003. – V.425, N695. – P. 637-640.
75. Malloch, D.W., Pirozynski, K.A., Raven, P.H. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1980. – V.77. – P. 2113-2118.

76. Marsh J. F., Schultze M. Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants// *New Phytol.* – 2001. – V.150. – P. 525–532, www.newphytologist.com.
77. Martenonson A., Rydberg I. Variability among pea varieties for infection with arbuscular mycorrhizal fungi// *Swedish J. Agric. Res.* – 1994. – V.24. – P. 13-19.
78. Miller R.M., Jastrow J.D. The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation// *Mycorrhizal functioning.* – N.Y.: Chapman and Hall. – 1992. – P. 438-467.
79. Mitra R.M., Gleason C.A., Edwards A. et al. From The Cover: A Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V.101, N13. – P. 4701-4705.
80. Mosse B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. In soil given additional phosphate// *New Phytol.* – 1973. – V.72. – P. 127-136.
81. Mosse B. The influence of soil type and Endogone strain on the growth of mycorrhizal plants in phosphate deficient soils// *Rev. Ecol. Biol. Soc.* – 1972. – V.9. – P. 529-537.
82. Mosse B. Vesicular-arbuscular mycorrhiza: an extreme form of fungal adaptation// *Symbiot. Assoc.* – Cambridge: Univ. Press, 1963. – P. 12-21.
83. Mosse B., Stribley D.P., Le Tacon F. Ecology of Mycorrhizae and Mycorrhizal Fungi// *Microbiol. Ecol.* – 1981. – V.5. – P. 136-210.
84. Newsham K.K., Fitter A.H., Watkinson A.R. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field// *J. Ecol.* – 1995. – V.83. – P. 991-1000.
85. Nishimura R., Hayashi M., Wu G.J. et al. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development// *Nature.* – 2002. – V.420, N6914. – P. 426-429.
86. Olsson P.A., Aarle I.M., Allaway W.G. et al. Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures// *Plant Physiol.* – 2002. – V.130. – P. 1162–1171, www.plantphysiol.org.

87. Paradi I., Bratek Z., Lang F. Influence of Arbuscular Mycorrhiza and Phosphorus Supply on Polyamine Content, Growth and Photosynthesis of *Plantago lanceolata*// *Biologia Plantarum*. – 2003. – V.46, N4. – P. 563-569.
88. Pfeffer P.E., Douds Jr.D.D., Bécard G. et al. Carbon Uptake and the Metabolism and Transport of Lipids in an Arbuscular Mycorrhiza// *Plant Physiol*. – 1999. – V.120. – P. 587–598, www.plantphysiol.org.
89. Phillips J.M., Hayman D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection// *Transact. British Mycor. Soc.* – 1970. – V.55. – P. 158-161.
90. Pirozynski K.A., Malloch D.W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism// *BioSystems*. – 1975. – V.6. – P. 153-164.
91. Plenchette C., Furlan V., Fortin J.A. Responses of endomycorrhizal plants grown in a calcined montmorillonite clay to different levels of soluble phosphorus. I. Effect on growth and mycorrhizal development// *Can. J. Bot.* – 1983. – V.61. – P. 1377-1383.
92. Powell C.N.I. Effect of phosphate fertilisers on the production of mycorrhizal inoculum in soil// *N.Z.J. Agr. Res.* – 1980. – N23. – P. 219-223.
93. Provorov N.A., Simarov B.V. Genetic variation in alfalfa, sweet clover and fenugreek for the activity of symbiosis with *Rhizobium meliloti*// *Plant Breeding*. – 1990. – V.105. – P. 300-310.
94. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B. et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // *Nature*. – 2003. – V.425, N6958. – P. 585-592.
95. Rambelli A. The rhizosphere of mycorrhizae// *Ectomycorrhizae*. N.Y.: Academic Press, 1973. – P. 299-343.
96. Rausch C., Bucher M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants// *Planta*. – 2002. – V.216. – P. 23–37.
97. Rausch C., Daram P., Brunner S. et al. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato// *Nature*. – 2001. – V.414, N22. – P. 462-466, www.nature.com.

98. Read D.J. An ecological point of view on arbuscular mycorrhiza research// Mycorrhizal Technology in Agriculture. From Genes to Bioproducts. Eds. S. Gianinazzi, H. Schüepp, J.M. Barea, K. Haselwandter. – Basel: Birkhäuser Verlag, 2002. – P. 129-137.
99. Redecker D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots// Mycorrhiza. – 2000. – V.10. – P. 73–80.
100. Remy W., Taylor T.N., Hass H. et al. Four hundredmillion-year-old vesicular arbuscular mycorrhizas. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1994. – V.91. – P. 11841–11843.
101. Renker C., Heinrichs J., Kaldorf M. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field// Mycorrhiza. – 2003. – V.13. – P. 191–198.
102. Sagan M., Morandi D., Tarengi E. et al. Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after X-ray mutagenesis// Plant Sci. – 1995. – V.111. – P. 63–71.
103. Sanders I.R., Clapp J.P., Wiemken A. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems – a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis// New Phytol. – 1996. – V.133. – P. 123-134.
104. Schachtman D.P., Read R.J., Ayling S.M. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell// Plant Physiol. – 1998. – V.116. – P. 447-453.
105. Schüßler A., Scwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution// Mycol. Res. – 2001. – V.105, N12. – P. 1413-1421.
106. Schenck N.C. Pérez Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 2nd Edition. – Gainesville: INVAM, University of Florida, 1988. – 241 p.
107. Shirtliffe S.J., Vessey J.K. A nodulation (Nod⁺/Fix⁻) mutant of *Phaseolus vulgaris* L. has nodule like structures lacking peripheral vascular bundles (Pbv⁻)

- and is resistant to mycorrhizal infection (Myc⁻)// *Plant Sci.* – 1996. – V.118. – P. 209–220.
108. Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S. et al. Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase// *Science.* – 2003. – V.299, N5603. – P. 109-112.
109. Simon L., Bousquet J., Levesque R.C. et al. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants// *Nature.* – 1993. – V.363. – P. 67–69.
110. Siqueira J.O., Marcio R.L., Sidney L.S. Fungos micorrhizicos arbusculares// *Biotecnologia Ciencia and Desenvolvimento.* – 2002. – N25. – P. 12-21.
111. Smith S.E., Read D.R. *Mycorrhizal Symbiosis* (2nd edition). San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press. – 1997. – 605 p.
112. Smith S.E., Smith F.A. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport// *New Phytol.* – 1990. – V.114. – P. 1–38.
113. Smith S.E., Smith F. A., Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses// *Plant Physiol.* – 2003. – V.133. – P. 16–20, www.plantphysiol.org.
114. Stracke S., Kistner C., Yoshida S. et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis// *Nature.* – 2002. – V.47, N27. – P. 959-962.
115. Szczyglowski K., Amyot L. Symbiosis, Inventiveness by Recruitment?// *Plant Physiol.* – 2003. - V.131. - P. 935–940, www.plantphysiol.org/cgi/.
116. Theodorou M.E., Plaxton W.C. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation// *Plant Physiol.* – 1993. – V.101. – P. 339–344.
117. Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle// *Physiological and Genetical Aspects of*

- Mycorrhizae. Eds. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. – Paris: INRA-Press, 1986. – P. 217-221.
118. Tsimilli-Michael M., Strasser R.J. Mycorrhization as a stress adaptation procedure. In: *Mycorrhizal Technology in Agriculture. From Genes to Bioproducts*. Edited by Gianinazzi S., Schüepp H., Barea J.M., Haselwandter K. – Basel: Birkhäuser Verlag, 2002. – P. 199-210.
119. Vancura V., Orozco M.O., Grauova O. et al. Properties of bacteria in the hyphosphere of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus// *Agric., Ecosystems Environ.* – 1989. – V.29. – P. 421-427.
120. Wegel E., Schauser L., Sandal N. et al. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection// *MPMI.* – 1998. – V.11, N9. – P. 933–936.
121. Zhu Y.-G., Cavagnaro T.R., Smith S.E. et al. Backseat driving? Accessing phosphate beyond the rhizosphere-depletion zone// *Trends Plant Sci.* – 2001. – V.6. – P. 194–195.
122. <http://www.invam.caf.wvu.edu>.
123. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Glomus>.
124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>.
125. http://www.psu.ru/db_plant/medicago_lupulina.html.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Проверка достоверности различий средних значений показателей продуктивности люцерны в вариантах с инокуляцией АМГ и без АМ

Образец	Число степеней свободы, k	Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира	124	2,33 ± 0,08	6,17 ± 0,48	3,79 ± 0,18	8,24 ± 0,22	0,53 ± 0,03	0,92 ± 0,05
Павловская	67	2,12 ± 0,16	5,91 ± 0,77	3,12 ± 0,32	6,31 ± 0,41	0,57 ± 0,05	0,95 ± 0,14
Юнтоловская	66	1,77 ± 0,12	4,19 ± 0,46	2,33 ± 0,22	4,51 ± 0,30	0,34 ± 0,03	0,48 ± 0,05
ВИК32	92	15,66 ± 0,66	53,44 ± 0,85	1,43 ± 0,09	3,83 ± 0,07	0,08 ± 0,01	2,19 ± 0,11

Фактическое значение коэффициента Стьюдента - $t_{\text{факт}}$

Образец	Число степеней свободы, k	Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира	124	7,89		15,66		6,69	
Павловская	67	4,82		6,13		2,56	
Юнтоловская	66	5,04		5,94		2,42	
ВИК32	92	35,17		20,69		19,83	

Проверка достоверности различий средних значений "контроль-опыт"

Образец	Число степеней свободы, k	Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира	124	P<0,001		P<0,001		P<0,001	
Павловская	67	P<0,001		P<0,001		P<0,05	
Юнтоловская	66	P<0,001		P<0,001		P<0,05	
ВИК32	92	P<0,001		P<0,001		P<0,001	

Проверка достоверности различий средних значений показателей продуктивности люцерны в вариантах с инокуляцией АМГ и без АМ

Образец	Число степеней свободы, k	Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира	124	2,33 ± 0,08	6,17 ± 0,48	3,79 ± 0,18	8,24 ± 0,22	0,53 ± 0,03	0,92 ± 0,05
Павловская	67	2,12 ± 0,16	5,91 ± 0,77	3,12 ± 0,32	6,31 ± 0,41	0,57 ± 0,05	0,95 ± 0,14
Юнтоловская	66	1,77 ± 0,12	4,19 ± 0,46	2,33 ± 0,22	4,51 ± 0,30	0,34 ± 0,03	0,48 ± 0,05
ВИК32	92	15,66 ± 0,66	53,44 ± 0,85	1,43 ± 0,09	3,83 ± 0,07	0,08 ± 0,01	2,19 ± 0,11

Фактическое значение коэффициента Стьюдента - $t_{\text{факт}}$

Сравниваемые образцы	Число степеней свободы, k	Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира - Павл	97/98	1,17	0,29	1,82	4,15	-0,69	-0,20
Мира - Юнтол	96/98	3,88	2,97	5,18	10,09	4,15	6,49
Мира - ВИК32	119/99	-20,04	-48,53	11,75	18,97	14,84	-10,79
Павл - Юнтол	67/70	1,74	1,92	2,04	3,55	3,78	3,19
Павл - ВИК32	92/71	-19,92	-41,51	5,08	5,94	9,81	-7,04
Юнтол - ВИК32	91/71	-20,69	-50,99	3,86	2,23	7,55	-14,75

Проверка достоверности различий средних значений показателей продуктивности 4-х форм *Medicago lupulina*

Сравниваемые образцы	Число степеней свободы, k	Средняя высота, см		Кустистость, число стеблей		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни), г	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира - Павл	97/98	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,001	P>0,05	P>0,05
Мира - Юнтол	96/98	P<0,001	P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
Мира - ВИК32	119/99	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
Павл - Юнтол	67/70	P>0,05	P>0,05	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,01
Павл - ВИК32	92/71	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
Юнтол - ВИК32	91/71	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,001

Коэффициенты вариации (в %) показателей продуктивности люцерны в вариантах с инокуляцией АМГ и без АМ

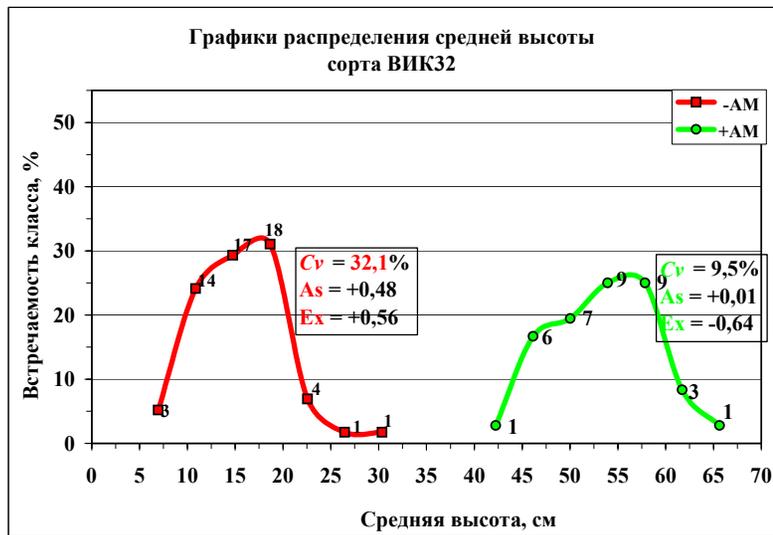
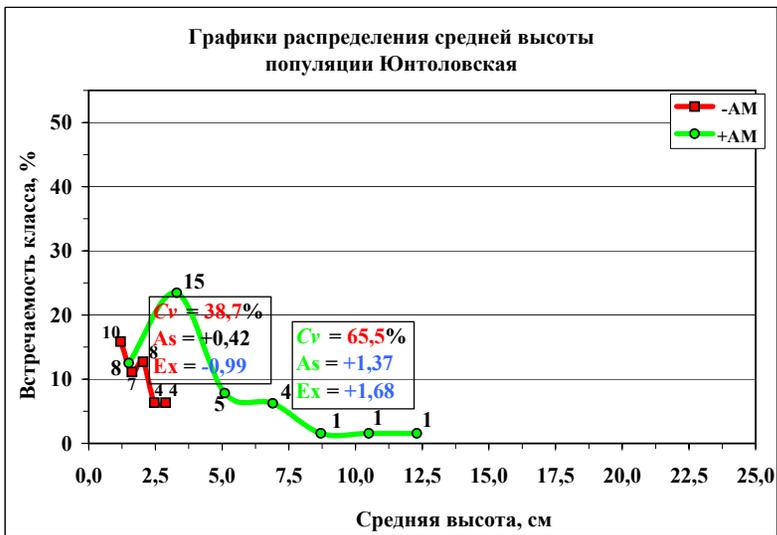
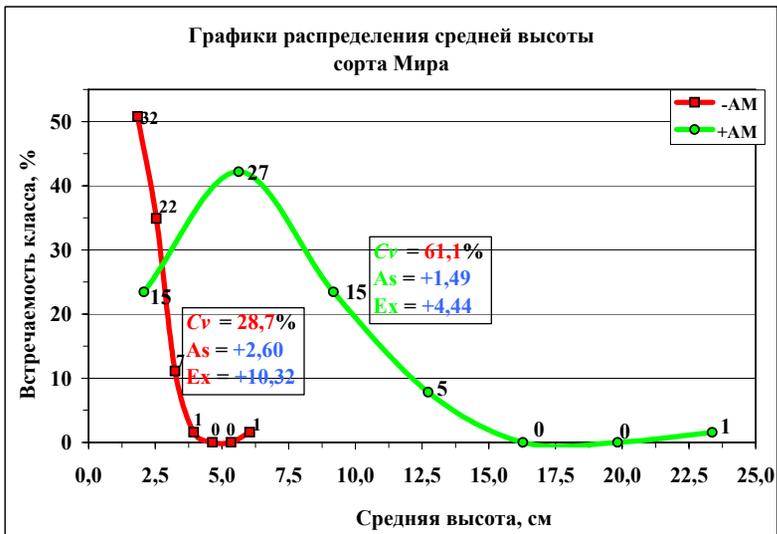
	Число степеней свободы, k	Средняя высота		Кустистость		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни)	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира	124	28,7 ± 2,6	61,1 ± 5,4	37,6 ± 3,4	21,4 ± 1,9	39,1 ± 3,5	39,4 ± 3,5
Павловская	67	42,7 ± 5,2	77,5 ± 9,3	60,5 ± 7,3	38,6 ± 4,6	53,1 ± 6,4	89,0 ± 10,6
Юнтоловская	66	38,7 ± 4,8	65,5 ± 7,8	53,2 ± 6,6	38,9 ± 4,6	58,2 ± 7,2	56,7 ± 6,8
ВИК32	92	32,1 ± 3,0	9,5 ± 1,1	47,4 ± 4,4	11,7 ± 1,4	59,9 ± 5,5	29,2 ± 3,4

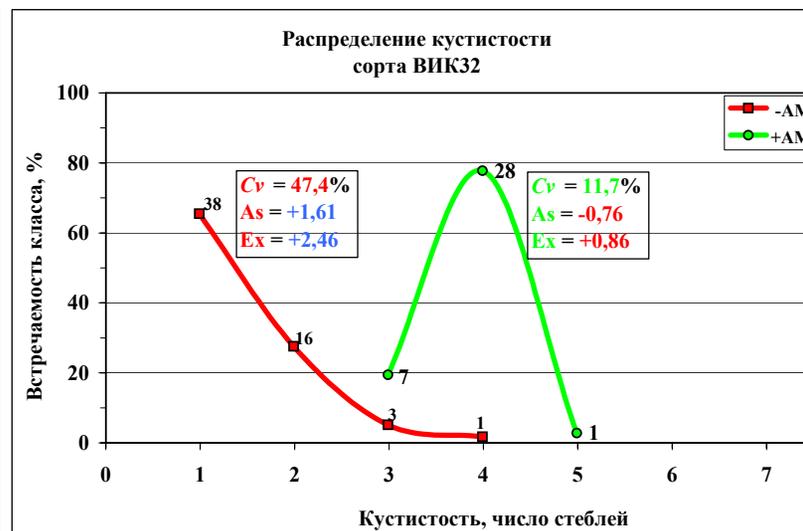
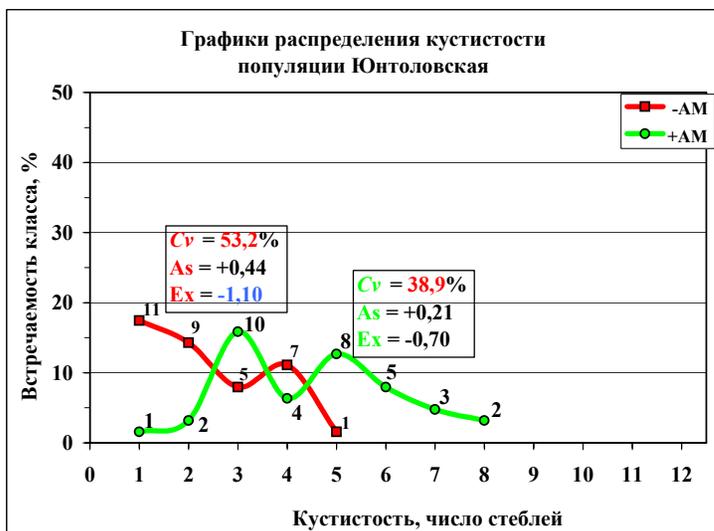
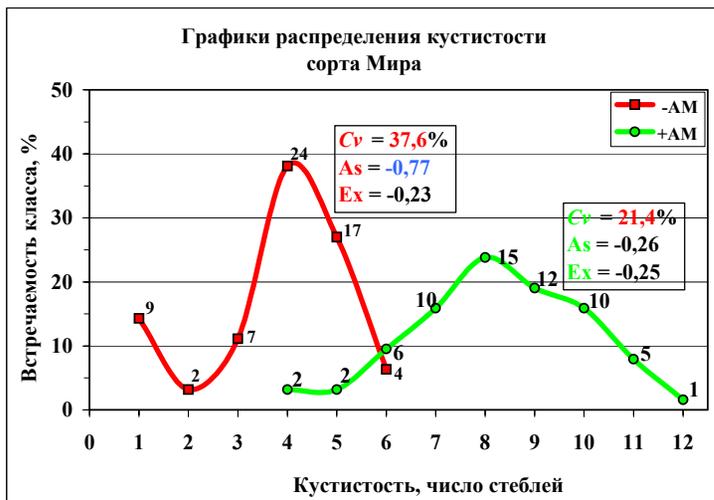
Фактическое значение коэффициента Стьюдента - $t_{\text{факт}}$

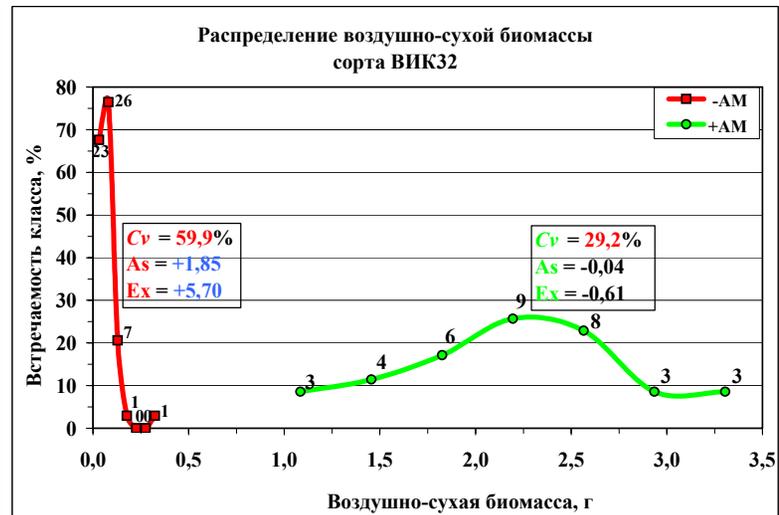
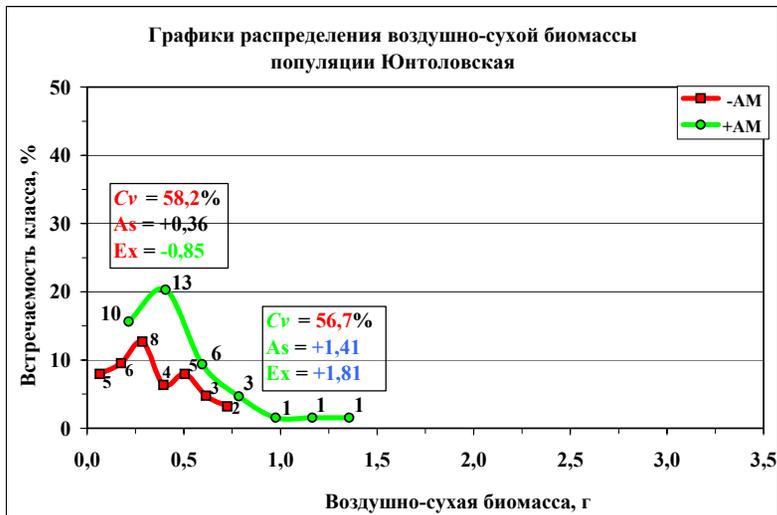
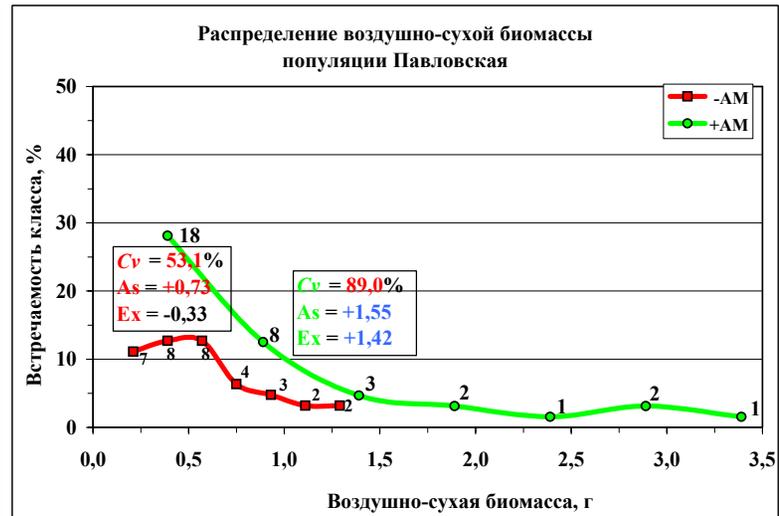
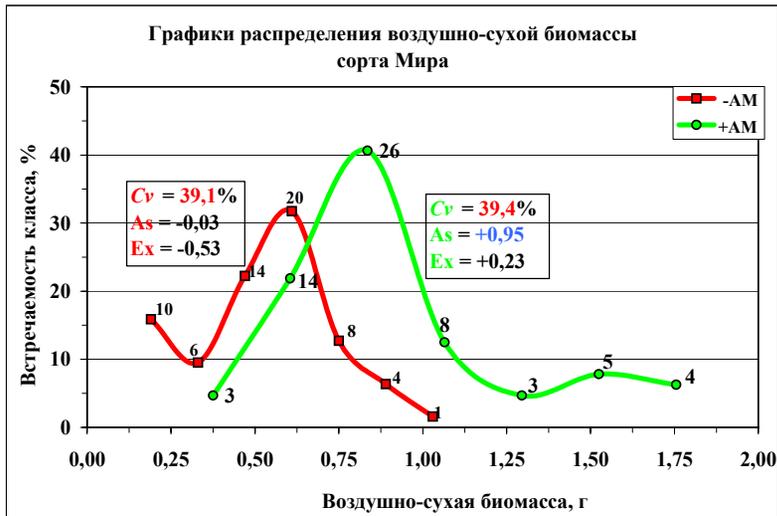
	Число степеней свободы, k	Средняя высота		Кустистость		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни)	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира	124	5,41		-4,16		0,06	
Павловская	67	3,27		-2,54		2,90	
Юнтоловская	66	2,93		-1,78		-0,15	
ВИК32	92	-7,16		-7,82		-4,75	

Проверка достоверности различий коэффициентов вариации "контроль-опыт"

	Число степеней свободы, k	Средняя высота		Кустистость		Воздушно-сухая биомасса (стебли + корни)	
		Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)	Контроль (-АМ)	Опыт (+АМ)
Мира	124	P<0,001		P<0,001		P>0,05	
Павловская	67	P<0,01		P<0,05		P<0,01	
Юнтоловская	66	P<0,01		P>0,05		P>0,05	
ВИК32	92	P<0,001		P<0,001		P<0,001	







БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному сотруднику ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии научному руководителю магистерской работы Якоби Л.М. за обучение методикам проведения вегетационных опытов, оценки микоризообразования, а также помощь в проведении экспериментов.

Автор выражает искреннюю благодарность старшему научному сотруднику СПбГУ куратору кандидату биологических наук Проворову Н.А. за подробное прочтение дипломной работы и плодотворную дискуссию.

Автор благодарит профессора кафедры Лутову Л.А., секретаря кафедры Бузовкину И.С., Барабанову Л.В. и других преподавателей кафедры генетики и селекции СПбГУ за высокий уровень обучения, оказанное внимание и предоставленные консультации.

Особую благодарность выражаю заместителю директора ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова доктору биологических наук Дзюбенко Н.И. и ведущему научному сотруднику ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса кандидату сельскохозяйственных наук Степановой Г.В. за предоставленный семенной материал для исследований.

Выражаю свою благодарность сотрудникам ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии и БиНИИ СПбГУ за оказанную помощь в исследованиях.