

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ЮРКОВ Андрей Павлович

**Особенности развития люцерны хмелевидной
с эндомикоризным грибом *Glomus intraradices***

03.00.12 – физиология и биохимия растений
03.00.16 – экология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2009

Работа выполнена в лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, в Биологическом НИИ ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» и на кафедре экологии ГОУ ВПО «Российский государственный гидрометеорологический университет».

Научные руководители:

доктор биологических наук,
доцент

**СЕМЕНОВ Дмитрий
Германович**

доктор биологических наук,
доцент

**ШИШОВА Мария
Федоровна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

**БЫКОВ Олег
Дмитриевич**

кандидат биологических наук

**ТАРАХОВСКАЯ Елена
Роллановна**

Ведущая организация:

**Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН**

Защита состоится «23» апреля 2009 года в 18⁰⁰ часов на заседании объединенного совета ДМ212.232.07 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, ауд. 133.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета.
Для отзывов: факс +7-(812)-7006585.

Автореферат разослан «16» февраля 2009 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Шарова Е.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Симбиозы представляют собой одну из основных форм существования жизни на Земле. Самым распространенным растительно-микробным симбиозом является арбускулярная микориза (АМ). Образование АМ стало ключевым этапом эволюционного развития Биосферы. Именно этому типу симбиоза отводят центральную роль в завоевании растениями суши. Коэволюция партнеров симбиоза привела к повышению их адаптации к переменным условиям внешней биотической и абиотической среды. АМ является основным компонентом существующих биоценозов и образуется большинством наземных растений с эндомикоризными грибами типа *Glomeromycota*. Она оказывает стимулирующее влияние на растения, усиливая метаболические процессы посредством усвоения фосфора, повышая устойчивость растений к корневым патогенам и способствуя усилению взаимодействия растений с азотфиксирующими микроорганизмами.

Несмотря на интенсивные исследования такого полифункционального симбиоза, каким является АМ, до сих пор остаются неясными механизмы образования и развития эффективного АМ-симбиоза в зависимости от физиологического статуса растения-хозяина, что может быть связано с тем, что сорта, используемые в исследованиях развития АМ, часто имеют ослабленную способность к симбиотрофному питанию. Как результат, сорта растений оказались менее отзывчивыми и менее вариабельными при инокуляции АМ-грибами по сравнению с дикорастущими популяциями. Низкая симбиотическая эффективность коммерческих сортов (отсутствие у них ростового отклика) не позволяет выделить контрастные по эффективности растительные линии, следовательно, они не могут быть использованы при исследовании развития АМ. В связи с этим дикорастущие популяции могут представлять собой природный резерв симбиотических генов. По литературным данным в качестве модельных могут быть

использованы популяции люцерны хмелевидной – одного из наиболее высокополиморфных видов рода *Medicago*.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей развития люцерны хмелевидной при формировании арбускулярной микоризы с грибом *Glomus intraradices* в условиях отсутствия иных эндосимбионтов.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать развитие арбускулярной микоризы у люцерны хмелевидной с АМ-грибом *G. intraradices*;

2. Оценить внутривидовой полиморфизм по эффективности симбиоза люцерны хмелевидной с АМ-грибом, отобрать модельные популяции и выделить линии люцерны хмелевидной, контрастные по отзывчивости на инокуляцию грибом арбускулярной микоризы;

3. Выявить особенности развития люцерны хмелевидной с грибом *G. intraradices* по показателям продуктивности, содержания фосфора и интенсивности фотосинтеза, а также охарактеризовать взаимодействие партнеров в виде векторной модели развития симбиоза.

Научная новизна. Установлено, что у всех исследованных популяций люцерны хмелевидной с эндомикоризным грибом *G. intraradices* образуется *арум* тип арбускулярной микоризы. Выявлена способность межклеточного мицелия *G. intraradices* проникать в зону растяжения клеток, вплотную подступая к зоне деления клеток кончика корня, где гриб образует также арбускулы и везикулы.

Впервые такие статистические параметры, как коэффициенты вариации, асимметрии и эксцесса использованы для предварительной оценки внутривидового полиморфизма по показателям эффективности АМ, исследован внутривидовой полиморфизм люцерны хмелевидной по эффективности АМ в условиях отсутствия ризобий. В результате выявлен высокий полиморфизм по эффективности АМ в дикорастущей популяции (п.) Павловская. Впервые показано, что сортопопуляция ВИК32 является

облигатно-микотрофной формой. В настоящей работе отобраны быстроотзывчивая на микоризацию линия люцерны хмелевидной и линии, контрастные по симбиотической эффективности с АМ-грибом *G. intraradices*.

На линиях п. Павловская люцерны хмелевидной впервые установлены взаимосвязи между различными показателями продуктивности, эффективности, содержания макроэлементов и микоризации. Показана оптимизация фосфатного питания растений.

Для люцерны хмелевидной модифицированы спектрометрические индексы отражения листовых пластин, позволяющие проводить неинвазивный анализ активности работы ассимиляционного аппарата растений. Этим методом впервые показан более ранний отклик на микоризацию в сравнении с результатами биохимического анализа.

Впервые проведено обобщение данных взаимодействия партнеров АМ-симбиоза в виде векторной математической модели развития растений люцерны и развития АМ с участием эндомикоризного гриба *G. intraradices*.

Практическая значимость. Автором диссертации разработана программа расчета и анализа основных характеристик микоризации “Mycorrhiza 1.0”, адаптированная для работы в ОС Windows XP (УДК 581.557.27: 681.3.06), которая в интерактивном режиме указывает степень завершения микоризации при достижении заданной точности (Yurkov et al., 2006). Программа может быть использована как в российских, так и в зарубежных лабораториях по исследованию АМ.

Выполнен морфотипический анализ популяций люцерны хмелевидной. Результаты могут послужить основой для составления признаковой коллекции люцерны хмелевидной и ее идентификации по морфометрическим показателям на внутривидовом уровне. Контрастные по симбиотической эффективности линии люцерны рекомендованы для выявления генов, задействованных в механизмах регуляции эффективности микоризного симбиоза высших растений и АМ-грибов, а также для изучения

молекулярных механизмов симбиотрофии. Семена полученных линий люцерны хмелевидной, включая линии контрастные по эффективности АМ, переданы в коллекцию ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова. Линии с высоким симбиотическим потенциалом рекомендованы к созданию высокопродуктивных симбиотических систем «растения-микроорганизмы». Использование сортов с высокой симбиотической активностью позволит снизить нормы минеральных удобрений, являющихся существенным антропогенным фактором нарушения экосистем и снижения качества сельскохозяйственной продукции.

Результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе: в курсах лекций по “Общей биологии”, “Геоэкологии” в РГТМУ и в курсе “Симбиогенетика” в СПбГУ.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались на II Международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития” (Москва, 2003); XI Международном конгрессе “Молекулярные растительно-микробные взаимодействия: новые мосты между прошлым и будущим” (СПб., 2003); III съезде ВОГиС “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития” (Москва, 2004); Международной школе-конф. молодых ученых “Биотехнология будущего” (СПб., 2006); III школе-семинаре молодых ученых стран Балтийского региона “Прикладные и фундаментальные аспекты сигнальных процессов, развития и эффективности симбиозов микроорганизмов с корнями” (СПб., 2007); научно-практической конф. СПбГАУ “Научное обеспечение развития АПК в условиях реформирования” (СПб., 2007); XV Конгрессе европейских микологов (СПб., 2007); Международном молодежном научном экологическом форуме стран Балтийского региона “Экобалтика-2008” (СПб., 2008); научно-практической конф. “Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в АПК России” (СПб., 2008); II научно-практической конф. “Перспективы развития инноваций в биологии” (Москва, 2008); Международной конф.

“Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях” (Звенигород, 2008); XIII Санкт-Петербургской Ассамблее молодых ученых и специалистов (СПб., 2008).

Публикации. За время работы над диссертацией опубликованы 17 основных работ, а также 1 статья принята в печать.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка литературы (содержащего 359 источников, из них 315 на иностранном языке) и 39 приложений. Основное содержание работы изложено на 224 страницах, включая 73 рисунка, 36 формул и 12 таблиц.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования является люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L.) – один из наиболее широко распространенных видов, самоопылитель, диплоид. Растение отличается высокой семенной продуктивностью, используется в качестве сидератов и возделывается как пастбищная и кормовая культура. Исследованы озимые популяции Павловская, Юнтоловская и сортопопуляция (сп.) Мира, а также яровая сп. ВИК32. В качестве микосимбионта использован высокоэффективный штамм CIAM8 *Glomus intraradices* Shenck&Smith.

Методы исследования. Для решения поставленных задач был применен комплексный методический подход, включающий следующие общепринятые и новые разработанные методики. Для поддержания чистой культуры эндомикоризного гриба использован современный метод С. Джаниназзи с соавт. (Gianinazzi et al., 2002). Для выращивания растений в симбиозе с грибами АМ при отсутствии иных ризосферных микросимбионтов применен стерильный вегетационный метод (Jacobi et al., 2003; Юрков и др., 2007). Для количественной оценки развития АМ использована методика мацерации и окрашивания корней бобовых растений

с микоризой (Phillips, Nauman, 1970) и метод световой микроскопии (Trouvelot et al., 1986), усовершенствованный автором путем специально разработанной компьютерной программы “Mycorrhiza 1.0” (Yurkov et al., 2006). Площадь листьев рассчитана с использованием программы “ImageTool 3.0”. Содержание азота (N) определялось по методу Кьельдаля на автоматической установке путем титрования, содержание фосфора (P) – колориметрически по методу Труога-Мейера на длине волны (λ) равной 670 нм, содержание калия (K) – на пламенном фотометре. Содержание пигментов оценивалось путем их экстракции 90% ацетоном с последующим фотометрическим анализом: хлорофиллы “a” и “b” – на $\lambda = 663$ и 646 нм, каротиноиды – на $\lambda = 440,5$ нм (Jeffrey, Humphrey, 1975). Суммарное содержание растворимых белков в сухой биомассе определялось фотометрическим методом Брэдфорд на $\lambda = 695$ нм (Bradford, 1976). Содержание рибулезобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (*РУБИСКО*) определено в осадке ацетоновых экстрактов посредством нативного электрофореза (Юзбеков, 1990). Светопоглощительная активность хлорофиллов и каротиноидов оценивалась специально разработанным неинвазивным спектрометрическим методом с применением аппаратуры AvaSpec по стандартным спектрометрическим показателям (Gitelson et al., 2006). Оценка симбиотической эффективности была основана на учете “биологического эффекта”, выраженного в прибавке различных показателей продуктивности (сухой биомассы растений, их кустистости, числа листьев и высоты), а также в прибавке содержания различных макроэлементов – N, P и K в надземных частях и корнях растения (Одум, 1975). Оценка полиморфизма популяций люцерны по эффективности АМ проведена с использованием статистического анализа с расчетом параметров изменчивости и взаимосвязи показателей (Хедрик, 2003). Характеристика развития АМ проведена с использованием разработанной векторной

математической модели, предложенной для микросимбионтов Н.И. Воробьевым (Калько и др., 2006). При анализе влияния АМ на структуру дикорастущих популяций люцерны использован метод визуальной оценки морфотипов (Дзюбенко и др., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ микоризации различных форм люцерны хмелевидной. Дана качественная и количественная оценка развития АМ у растений 4^х популяций люцерны. Показано, что растения люцерны хмелевидной формируют *арум* тип АМ с грибом *G. intraradices*. Результаты микроскопического анализа выявили различия в развитии микоризы яровой и озимых форм люцерны хмелевидной, которые, по-видимому, связаны с различным циклом развития растений однолетней (яровой) и малолетней (озимой) люцерны (табл. 1).

Таблица 1. Показатели микоризации люцерны хмелевидной при инокуляции шт. CIAM8 *Glomus intraradices* (88° сут от посева)

Исследуемая популяция	Встречаемость микоризной инфекции, %	Обилие арбускул		Обилие везикул	
		в корне, %	в микоризе, %	в корне, %	в микоризе, %
Мира (озимая)	78,6 ± 5,2	21,3 ± 5,2	49,9 ± 6,3	3,8 ± 2,4	9,5 ± 3,7
Павловская (озимая)	65,6 ± 8,0	7,4 ± 4,4	33,6 ± 8,0	1,5 ± 2,1	6,1 ± 4,0
Юнтоловская (озимая)	66,9 ± 8,0	21,7 ± 7,0	64,0 ± 8,1	2,2 ± 2,5	6,8 ± 4,2
ВИК32 (яровая)	91,9 ± 4,5	5,5 ± 3,8	8,8 ± 4,7	30,1 ± 7,6	52,1 ± 8,3

Вегетация озимой люцерны в конце первого года сопровождается активным образованием арбускул *de novo*, а плодоношение яровой – завершением развития АМ, что определяется (1) малым обилием арбускул (принимающих участие в обмене веществ между партнерами), (2) высоким обилием везикул (принимающих участие в запасании веществ АМ-грибом) и (3) хорошо развитым внутри- и внекорневым мицелием.

Внутрипопуляционный полиморфизм по симбиотической эффективности люцерны хмелевидной с грибом *G. intraradices*. Впервые проведена оценка внутрипопуляционного полиморфизма люцерны хмелевидной по эффективности АМ-симбиоза в отсутствие инокуляции ризобиями. Растения как яровой, так и озимой люцерны были хорошо отзывчивы на инокуляцию АМ-грибом (рис. 1). По результатам анализа продуктивности отобрана высокоотзывчивая яровая сп. ВИК32 как облигатно-микотрофная форма в условиях низкого содержания доступного фосфора в почве – экологически облигатная сортопопуляция.

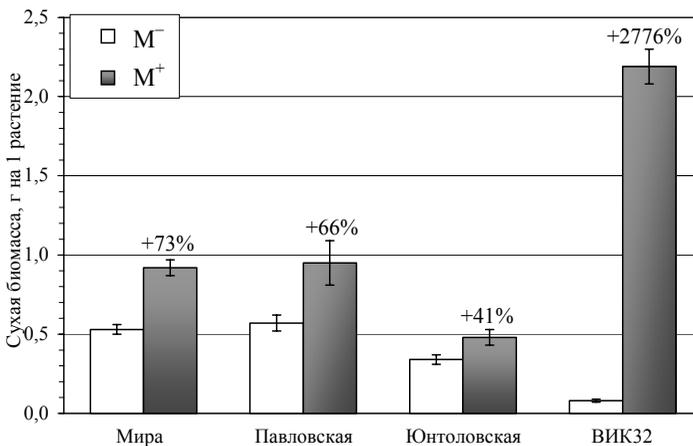


Рис. 1. Сухая биомасса растений люцерны хмелевидной (на 88^е сут)

На рис. М⁺ и М⁻ – растения с/без АМ, соответственно.

Контрольные растения (без микоризы) сп. ВИК32 в условиях низкого уровня доступного фосфора в почве имеют признаки карликовости: слаборазвитую корневую систему, измельченный лист, укороченный стебель и отсутствие кущения. Люцерна хмелевидная относится к С₃-растениям характерным для средних широт, среди которых такие облигатные формы встречаются редко.

Статистический анализ показателей продуктивности показал, что как озимая, так и яровая люцерна характеризуется внутривидовым полиморфизмом по симбиотической эффективности растений с грибом *G. intraradices*. Этот факт установлен на основании выявленных достоверных изменений статистических параметров изменчивости показателей продуктивности растений с микоризой в сравнении с контрольными растениями (табл. 2).

Таблица 2. Статистические параметры отзывчивости на инокуляцию *Glomus intraradices* образцов люцерны

Статистический параметр	Высота растения		Кустистость		Сухая масса	
	M ⁻	M ⁺	M ⁻	M ⁺	M ⁻	M ⁺
	Сортопопуляция Мира					
C _v , %	29	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
	Дикорастущая 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
	Дикорастущая 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
	Сортопопуляция 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: M⁺ и M⁻ – растения с/без АМ, соответственно. C_v, As и Ex – коэффициенты вариации, асимметрии и эксцесса, соответственно. Значения в ячейках, выделенных серым цветом, указывают на наличие внутривидового полиморфизма люцерны хмелевидной (достоверные различия контроля и опыта).

По результатам наряду с яровой сп. ВИК32 отобрана п. Павловская, которая обладала наибольшей вариабельностью биомассы растений с АМ (коэффициент вариации равен 89%). Более того, показано достоверное

($P < 0,05$) влияние АМ на ее морфотипическую структуру, в то время как у остальных популяций такого действия АМ не наблюдалось.

Наличие у популяций люцерны хмелевидной полиморфизма по симбиотической эффективности АМ (табл. 2) позволило нам на следующем этапе работы отобрать растительные линии, контрастные как по скорости отклика (линии яровой сп. ВИК32), так и по его интенсивности, т.е. по эффективности АМ (линии озимой п. Павловская). Таким образом, п. Павловская была использована для исследования развития низко- и высокопродуктивных линий люцерны в условиях микоризации (глава 3), а быстроотзывчивая линия яровой люцерны (линия S9m2) – для исследования развития эффективного симбиоза люцерны с АМ-грибом (глава 4).

Микроскопический анализ корней яровой люцерны показал, что линии с высокой продуктивностью в фазу плодоношения имеют критически малое обилие арбускул в корне (в среднем $\sim 5\%$), а продуктивные линии озимых форм, которые характеризуются намного более слабой отзывчивостью, имели в 6 раз более высокое обилие этих структур ($\sim 30\%$), что не согласуется с общепризнанной гипотезой о ключевой роли арбускул в обменных процессах между партнерами АМ-симбиоза и позволяет предположить наличие альтернативного механизма с участием внутрикорневого мицелия.

Сравнительный анализ симбиотической эффективности различных линий п. Павловская со штаммом CIAM8 *G. intraradices*. Проведен анализ развития 45 линий п. Павловская с грибом АМ. Было показано, что при высокой эффективности (до 950%), рассчитанной по сухой массе растения, уровень содержания фосфора повышался в среднем для популяции в 2,3 раза, а в пересчете на одно растение – в 6,2 раза. Тем не менее, нами не было выявлено значимой корреляции между содержанием фосфора в растении и эффективностью по накоплению биомассы. Статистический анализ выявил более низкую вариабельность в содержании

фосфора в растениях с АМ по сравнению с контрольными (без АМ). В совокупности с отсутствием корреляций эти данные косвенно свидетельствуют в пользу того, что АМ оптимизирует фосфатное питание растений, повышая содержание этого энергетически важного элемента до уровня оптимального для развития растений (одинаково как у симбиотически низкоэффективных, так и у высокоэффективных). Это указывает на то, что фосфатное питание растений с участием АМ находится под жестким контролем растения.

Содержание другого не менее важного макроэлемента – азота в микоризных растениях было достоверно ниже, чем в растениях без АМ. В результате симбиотическая эффективность, рассчитанная по ассимиляции азота растениями люцерны п. Павловская была отрицательной. Следовательно, без азотфиксаторов АМ не способна усилить азотный метаболизм растений вне зависимости от того, является ли растительная линия симбиотически эффективной по показателям продуктивности или нет.

Средняя прибавка по калию была близка к нулевой ($6,5 \pm 0,4\%$). Возможно, это определило отсутствие корреляций между эффективностью АМ, рассчитанной по биомассе и по ассимиляции К. Высокая вариабельность (коэффициенты вариации составили $>100\%$), а также низкая эффективность по содержанию К указывают на отсутствие жесткого контроля его ассимиляции со стороны АМ у люцерны хмелевидной.

Результаты статистического и корреляционного анализа содержания макроэлементов в растениях п. Павловская свидетельствуют в пользу того, что отбор высокоэффективных линий необходимо проводить только по показателям эффективности, рассчитанным по их продуктивности (сухая масса и др.), но не по показателю содержания Р, т.к. они будут одинаково высоко эффективными по этому показателю. Среди 45 испытанных линий получены контрастные по симбиотической эффективности АМ линии (3 низкоэффективные – P1w2, P2m1, P7m5, а также 3 высокоэффективные –

P5m4, P2m3, P3w5). Высокоэффективные линии люцерны рекомендованы к применению в сельском хозяйстве в качестве сидерата и пастбищной культуры, а также при восстановлении нарушенных земель.

Другим важным аспектом корреляционного анализа является наличие отрицательных связей обилия арбускул с эффективностью АМ (r составили до $-0,46$) при положительной связи эффективности с обилием везикул (r составили до $0,49$), что подтверждает ранее высказанное предположение, что арбускулы не являются ключевыми симбиотическими структурами, опосредующими транспорт питательных веществ из гриба в растение.

Динамика показателей микоризации, продуктивности и интенсивности фотосинтеза быстрорастущей линии S9m2 сп. ВИК32. К 7^м суткам от посева АМ-гриб проникает в кортекс корня, проходя через внешние ризодермальные клетки растения-хозяина. Гриб проникает в зону растяжения клеток кончика корня, вплотную подступая к зоне деления. Дифференциация корней растения-хозяина тесно скоординирована с развитием симбиотических структур гриба: 1) при появлении первых боковых корней у растений происходило проникновение гриба в корни и развитие внутрикорневого мицелия; 2) при образовании вторичных боковых корней наблюдалось активное развитие арбускул (единичные арбускулы обнаружены на 12^о сут развития растения). К 14^м сут от посева одновременно с ростом числа арбускул выявлен процесс формирования везикул гриба в межклетниках корней растения-хозяина. Таким образом, уже на начальном этапе развития растения (к 14^м сут) формируются все основные структуры АМ. Важной тенденцией оказалось падение всех семи показателей микоризации с началом фазы стеблевания микоризованных растений (28^о сут), а затем – их повышение с началом фазы ветвления (35^о сут). Это свидетельствует в пользу того, что растение жестко контролирует развитие АМ, снижая ее встречаемость в процессе смены фаз развития “розетка” →

“начало стеблевания” → “стеблевание”, а затем повышая ее в процессе смены фаз “начало ветвления” → “ветвление” → “начало цветения”.

С выходом растений люцерны в фазу плодоношения количество арбускул снижается, т.е. их разрушение преобладает над новообразованием. Вероятно, “старые” арбускулы уже не способны принимать активное участие в питании растений в фазу плодоношения. На основании результатов можно предположить, что яровая люцерна может иметь альтернативный механизм транспорта фосфатов, в котором главную роль могут играть не арбускулы, а развитые внутрикорневые гифы гриба, толщина которых сопоставима с толщиной внекорневого мицелия и в 3-4 раза больше, чем в корнях растений п. Павловская.

Становление и развитие АМ привело к усилению фосфатного питания растений. Этот отклик наблюдается уже к 14 сут от посева – растения с АМ характеризуются более высоким содержанием фосфора как в надземных частях, так и в корнях. Усиление фосфатного питания растений, по-видимому, посредством усиления углеводного метаболизма привело к росту показателей работы ассимиляционного аппарата растений люцерны, выращенных на почве с низким уровнем фосфора. На рис. 2 показано, что с развитием растений прибавка по содержанию хлорофилла “а” у растений с АМ в сравнении с контрольными к 28^м сут (на фазе стеблевания) достигла 75%, по содержанию хлорофилла “b” – более 50%, по суммарному содержанию каротиноидов – более 100%, по содержанию *РУБИСКО* – более 40%. Эти данные свидетельствуют о том, что АМ привела к повышению показателей ассимиляционного аппарата растений люцерны, что, в свою очередь, определило (1) быстрое и интенсивное развитие листьев (их числа и площади) в условиях низкого уровня фосфора в почве, (2) усиление накопления биомассы и (3) ускорение фазы развития микоризованных растений в сравнении с контрольными.

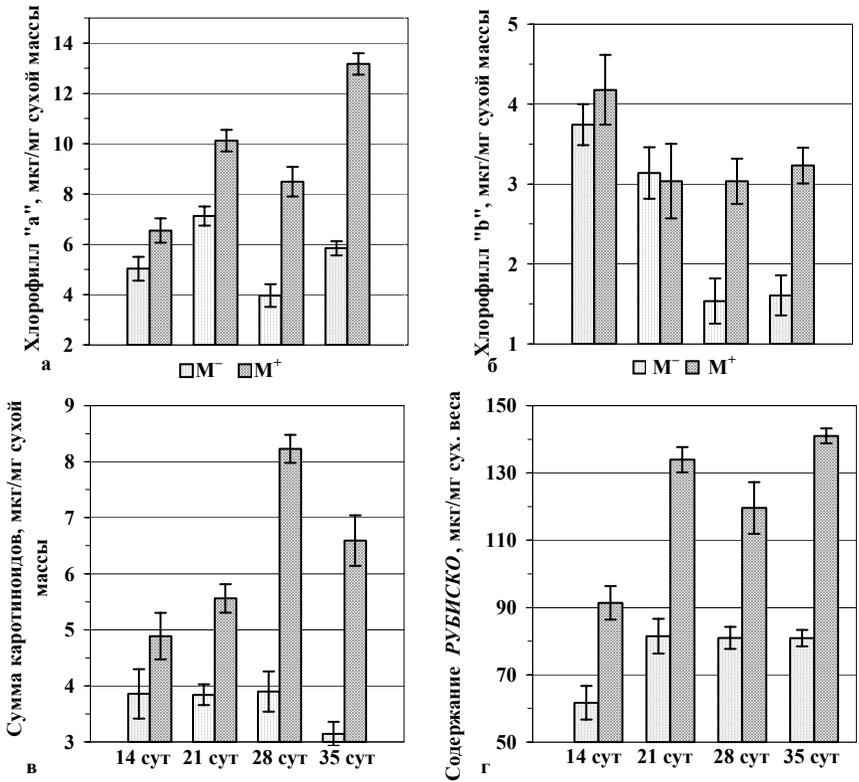


Рис. 2. Содержание хлорофилла "а" (а), хлорофилла "б" (б), каротиноидов (в) и РУБИСКО (г) в листовых пластинках растений линии S9m2

M⁺ и M⁻ – растения с/без микоризы, соответственно.

Наряду с биохимическими методами исследования фотосинтетического аппарата использован современный неинвазивный оптический метод анализа *in vivo*. С его помощью рассчитаны несколько модифицированных для люцерны хмелевидной спектрофотометрических индексов, из которых наиболее чувствительным и точным оказался 2^й хлорофильный показатель $ChlNDI_{m2}$ (рис. 3), характеризующий физиологическую активность хлорофилла "а" в реакционном центре

светособирающего комплекса (ССК). Отклик по этому индексу выявлен уже на 10-е сут от посева, что соответствует фазе становления АМ – закладке аппрессориев и проникновению в эпидермальные клетки корня, формированию первых арбускул и везикул. Молодое растение, по-видимому, не может являться полноценным партнером симбиоза до тех пор, пока его листья не обеспечат интенсивный синтез углеводов. Это коррелирует со значительным увеличением площади листовых пластинок у растений с АМ к 21^м сут от посева. Именно к этому моменту наблюдается наибольшее увеличение значения хлорофилльного индекса.

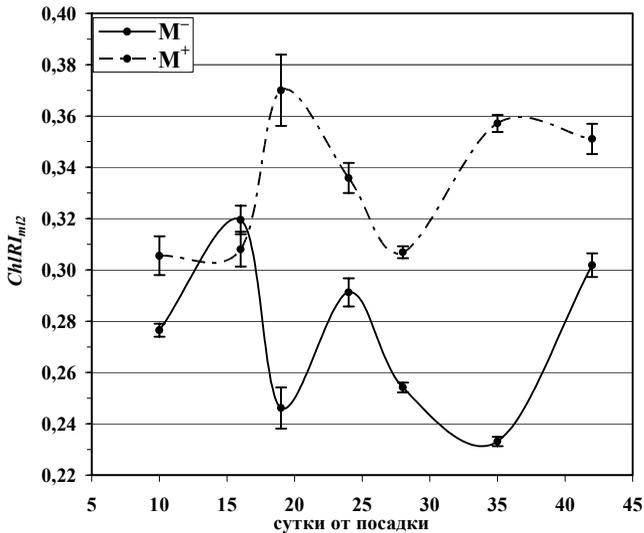


Рис. 3. Динамика 2^{го} хлорофилльного показателя отражения – $ChlRI_{m12}$.

M^+ и M^- – растения с/без микоризы, соответственно.

Таким образом, результаты как биохимического, так и неинвазивного спектрофотометрического исследования свидетельствуют о том, что микоризация способствует усилению работы фотосинтетического аппарата растений люцерны, которое привело к дальнейшей адаптации растений с АМ к низкому уровню фосфора в почве.

Моделирование развития растений и АМ, образуемой *G. intraradices* на быстроотзывчивой линии сп. ВИК32. Векторная математическая модель взаимодействия партнеров симбиоза впервые применена для оценки развития АМ люцерны (рис. 4). Модель позволила выявить общие закономерности, связывающие рост и развитие микоризованных растений с процессами микоризации. Угол наклона вектора характеризует фазу развития АМ, а его длина – прибавку в содержании фосфора в растении относительно немикоризованного контроля (Рис. 4). В основу модели заложена закономерная смена 4 основных фаз развития АМ, характерных для развития сп. ВИК32 яровой люцерны хмелевидной с АМ-грибом *G. intraradices*: фаза I. “развитие внутрикорневого мицелия” → фаза II. “развитие внутрикорневых гиф и арбускул” → фаза III. “развитие внутрикорневых гиф, арбускул и везикул” → фаза IV. “развитие внутрикорневых гиф и везикул”.

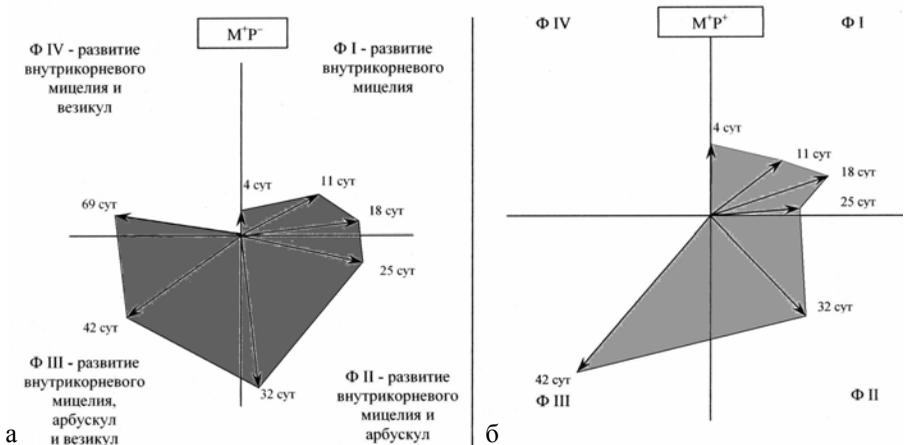


Рис. 4. Векторная математическая модель развития симбиоза сп. ВИК32 *M. lupulina* и штамма CIAM8 *G. intraradices*

M^+P^- и M^+P^+ – растения с АМ, выращенные на почве с низким (а) и средним (б) содержанием фосфора, соответственно. Ф I-IV – фаза и ее номер.

Для растений, выращенных на почве со средним содержанием фосфора, характерна задержка фаз развития АМ в сравнении с растениями, выращенными на почве с низким его уровнем, также они характеризовались и снижением поступления фосфора в растение на фазе “начало стеблевания”. Таким образом, математический анализ показал, что на 25° сут при выходе в фазу “стеблевания” растения люцерны на почве с добавлением фосфора (M^+P^+) испытывают стресс, в результате которого снижается поступление фосфатов в растение. В то же время действие АМ на растения в условиях низкого уровня фосфора в почве (M^+P^-) определяет более равномерное их развитие. По-видимому, растение-хозяин при повышении содержания фосфора в почве до достаточного для его питания уровня способно ограничивать развитие АМ-гриба в корне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали, что все исследованные популяции люцерны хмелевидной формируют *арум* тип АМ с грибом *Glomus intraradices*. Выявлены различия в структуре АМ озимой и яровой люцерны хмелевидной. Озимые характеризуются меньшим обилием везикул и большим обилием арбускул, чем яровая люцерна (на поздних стадиях онтогенеза). Это указывает на связь между фазами развития АМ-симбиоза и фазами развития растения-хозяина. Анализ динамики показателей микоризации и векторная модель развития АМ-симбиоза, разработанная на заключительном этапе работы, подтвердили это предположение.

Показано, что как яровая, так и озимая люцерна хмелевидная обладают внутрипопуляционным полиморфизмом по симбиотической эффективности АМ (рис. 5, п. 1). Наиболее полиморфными оказались озимая п. Павловская и облигатномикотрофная в условиях низкого уровня фосфора в почве яровая сп. ВИК32. Анализ 45 линий п. Павловская (рис. 5, п. 2) выявил контрастные по симбиотической эффективности АМ линии: низко- и высокоэффективные.

Показано оптимизирующее действие АМ на фосфорное питание растений обеих групп. Высокоэффективные линии рекомендованы для селекции высокопродуктивных симбиотически активных сортов, которые могут быть использованы в качестве сидератов, пастбищной, кормовой культуры, а также при проведении экологически рациональной рекультивации земель.



Рис. 5. Проведенные исследования симбиоза люцерны хмелевидной с эндомикоризным грибом *G. intraradices*

На быстроотзывчивой на микоризацию линии S9m2 яровой люцерны проведено исследование развития эффективного АМ-симбиоза (рис. 5, п.3). Проникновение гриба АМ в кортекс корня зарегистрировано на 7^е сут от посева. Микоризация привела к интенсификации поступления фосфатов в растения. Как следствие, уже на 10-е сутки от посева во время становления АМ выявлен отклик по хлорофильному показателю $ChlNDI_{ml2}$, характеризующему физиологическую активность хлорофилла “а” в реакционном центре ССК. Комплексный анализ динамики содержания пигментов, а также изменения содержания *РУБИСКО* в листовых пластинах показал, что АМ способствует усилению работы ассимиляционного аппарата растений сразу после развития основных ее структур: внутрикорневого мицелия, арбускул и везикул. Положительные прибавки по площади листовой поверхности и сухой массе растений характеризуют оптимизирующее влияние АМ на рост и развитие растений. Разработанная векторная модель развития симбиоза сп. ВИК32 *M. lupulina* со штаммом СИАМ8 *G. intraradices* позволила выявить второй физиологический отклик растения-хозяина на 21-28 сут. Этот отклик характеризовался снижением поступления симбиогенного фосфора в растение на фазе “начало стеблевания” в условиях среднего содержания фосфора в почве (рис. 4).

Результаты векторного математического моделирования развития АМ позволили оценить развитие растений экологически облигатно-микотрофной популяции люцерны хмелевидной с грибом *G. intraradices*. В совокупности с данными по динамике показателей микоризации результаты указывают на то, что растение-хозяин контролирует количество симбиотических структур – арбускул, везикул и внутрикорневых гиф. Изменения физиологических параметров растения и микобионта происходят на этапе становления микоризного симбиоза, а также на этапе смены фазы “розетки” на фазу “стеблевание” у растений сп. ВИК32 яровой люцерны хмелевидной.

ВЫВОДЫ

1. Люцерна хмелевидная с грибом *G. intraradices* формирует *арум* тип АМ. Гриб проникает в зону растяжения клеток кончика корня, что свидетельствует об интенсивном развитии симбиотических отношений между люцерной и грибом АМ.
2. Яровая люцерна в фазе плодоношения характеризуется зрелой АМ: малым обилием арбускул и высоким обилием везикул. Развитие АМ у озимой люцерны сопровождается активным образованием арбускул *de novo*. Растения как яровой, так и озимой люцерны хорошо отзывчивы на инокуляцию *G. intraradices*.
3. Выявлен внутрипопуляционный полиморфизм люцерны хмелевидной по эффективности АМ с применением статистических параметров изменчивости показателей продуктивности растений.
4. У озимой люцерны выявлены различные фенотипы, характеризующиеся широким спектром симбиотической эффективности с грибом *G. intraradices*, у яровой люцерны выявлены быстро- и медленноотзывчивые линии.
5. Развитие арбускулярной микоризы приводит к накоплению фосфора в тканях как надземных частей, так и корней люцерны. Выявлено соответствие сроков микоризации и первичного накопления фосфатов.
6. Симбиотическое развитие люцерны хмелевидной с грибом *G. intraradices* приводит к усилению активности ассимиляционного аппарата растений, заключающейся в увеличении количества пигментов, их физиологической активности (хлорофильный показатель $ChlNDI_{ml2}$) и в накоплении *РУБИСКО*.
7. Разработана модель становления АМ. Выявлены взаимосвязи между развитием партнеров симбиоза, доказывающие физиологическую эффективность симбиотической пары *G. intraradices* и люцерны хмелевидной.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Юрков А.П.**, Якоби Л.М., Степанова Г.В., Дзюбенко Н.И., Проворов Н.А., Кожемяков А.П., Завалин А.А. Эффективность инокуляции форм люцерны хмелевидной грибом арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* и внутривидовая изменчивость растений по показателям продуктивности и микоризообразования // **Сельскохозяйственная биология**. 2007, №5. С. 67-74.
2. **Юрков А.П.**, Семенов Д.Г., Якоби Л.М., Кожемяков А.П., Шишова М.Ф. Оценка динамики содержания хлорофиллов в листьях люцерны хмелевидной при микоризообразовании // **Естественные и технические науки**. 2008, № 6(38). С. 58-64.
3. **Юрков А.П.**, Семенов Д.Г. Неинвазивное спектрофотометрическое исследование фотосинтетической эффективности арбускулярной микоризы люцерны хмелевидной // Ученые Записки РГГМУ. 2008, №7. С. 101-110.
4. **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* // II Межд. конгресс “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. Ч. 1. М., 2003. С. 239. English issue – P. 240.
5. Jacobi L.M., **Yurkov A.P.**, Popov A.A., Donskikh N.A., Kozhemyakov A.P. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi on the perennial legume grasses at the high phosphorus level in soil // XI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions: New bridges between Past and Future. St.-P., 2003. P. 338.
6. **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 // III съезд ВОГиС “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития”. Т. 1. М., 2004. С. 467.

7. **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 // III съезд ВОГиС “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития”. Т. 1. М., 2004. С. 468.
8. Якоби Л.М., Белоброва С.Н., Качкин А.А., Попов А.А., **Юрков А.П.**, Кожемяков А.П. Арбускулярная микориза и ее использование в качестве средства для повышения продуктивности сельскохозяйственных растений // II Всеросс. съезд по защите растений “Фитосанитарное оздоровление экосистем”. Т. 2. СПб., 2005. С. 202.
9. **Yurkov A.P.**, Jacobi L.M., Kojemyakov A.P., Semenov D.G. Black medic as a model plant to study of arbuscular mycorrhiza efficiency // International Symp. “EU–Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme”. St.-P., 2006. P. 96-98.
10. **Юрков А.П.**, Якоби Л.М., Кожемяков А.П., Семенов Д.Г. Люцерна хмелевидная как объект для изучения эффективности арбускулярной микоризы // Межд. симп. “ЕС–Россия: перспективы сотрудничества в области биотехнологии в 7^й Рамочной Программе”. СПб., 2006. С. 103-105.
11. **Yurkov A.P.**, Jacobi L.M., Kojemyakov A.P., Dzyubenko N.I. Symbiotic efficiency of black medic (*Medicago lupulina* L.) and arbuscular – mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*): approaches to study of mechanism and selection // Postgraduate Course “Applied and Fundamental Aspects of Responses, Signalling and Developmental Process in the Root-Microbe Systems”. St.-P., 2007. P. 66.
12. **Yurkov A.P.**, Jacobi L.M., Kojemyakov A.P., Dzyubenko N.I. Study of symbiotic efficiency in black medic (*Medicago lupulina*) with arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* // XV Congress of European Mycologists. P. 7. St.-P., 2007. P. 236.

13. Дзюбенко Н.И., Кожемяков А.П., Якоби Л.М., **Юрков А.П.** Влияние инокуляции грибом арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* на морфотипическую структуру популяций люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) // Научно-практическая конф. СПбГАУ “Научное обеспечение развития АПК в условиях реформирования”. Ч. 1. СПб., 2007. С. 101-104.
14. **Yurkov A.P.**, Semenov D.G. Photometrical approach to the problem of estimation of pigment activity in plant cells: update technique for black medic // International Youth Science Environmental Forum “Ecobaltica-2008”. St.-P., 2008. P. 160-163.
15. Завалин А.А., **Юрков А.П.**, Якоби Л.М., Кожемяков А.П., Соколенко В.А. Оптимизация питания сельскохозяйственных растений путем формирования растительно-микробных систем: растения – грибы арбускулярной микоризы – клубеньковые бактерии – ризосферные микроорганизмы и создание на этой основе высокоэффективных биопрепаратов // Всеросс. конф. “Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в АПК России”. СПб., 2008. С. 5-6.
16. **Юрков А.П.**, Якоби Л.М. Разработка технологического применения микоризного биопрепарата с экзогенной обработкой регуляторами роста по результатам исследования физиологии симбиотического взаимодействия растения хозяина *Medicago lupulina* с грибом *Glomus intraradices* // II научно-практическая конф. “Перспективы развития инноваций в биологии”. М., 2008. С. 123-126.
17. **Юрков А.П.** Выявление динамики симбиоза люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.) с эндомикоризным грибом *Glomus intraradices* // XIII Ассамблея молодых ученых и специалистов. СПб., 2008. С. 51.

Работа поддержана грантами РФФИ (офи № 06-04-08268 и офи-ц № 08-04-13744), CRDF ST-012 и грантом Комитета по науке и высшей школе (диплом Правительства Санкт-Петербурга серии ПСП № 080440).