

## ЛИНИИ *MEDICAGO LUPULINA* С ОТКЛОНЕНИЯМИ В РАЗВИТИИ ЭФФЕКТИВНОЙ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ

© А.П. Юрков<sup>1,2</sup>, Л.М. Якоби<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Для цитирования: Юрков А.П., Якоби Л.М. Линии *Medicago lupulina* с отклонениями в развитии эффективной арбускулярной микоризы // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 4. — С. 61–74. doi: 10.17816/ecogen16461-74.

Поступила: 09.10.2018

Одобрена: 11.12.2018

Принята: 25.12.2018

✿ Работа направлена на решение актуальной проблемы биологии развития арбускулярной микоризы (АМ). В настоящее время получено множество мутантов на различных растительных модельных объектах по генам, контролирующим стадии развития АМ, тем не менее до сих пор неясны механизмы, контролирующие развитие эффективного АМ-симбиоза. Авторами проведен мутагенез люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.) — нового удобного объекта для молекулярно-генетических исследований. Используемая облигатно микотрофная линия *M. lupulina* обладает ранним и высоким откликом на микоризацию, высокой продуктивностью семян, а также признаками карликовости при росте без АМ на субстратах с низким содержанием доступного для питания растений фосфора, что позволяет визуально выявлять линии с отклонениями в развитии АМ-симбиоза. Проверено 14 режимов мутагенеза этилметансульфонатом. Три способа мутагенеза позволили получить продуктивное потомство М1 с долей жизнеспособных проростков 73,3–86,0 %, а также 1405 растений потомства М2. По результатам анализа популяции мутагенизированных растений М2 (вплоть до поколения М9) отобраны 15 линий: 1 Мус<sup>-</sup>-растение, не образующее АМ; 4 Реп<sup>-</sup>-растения, не образующих АМ, но образующих апрессории; 3 Rmd<sup>-</sup>-растения, образующих низкоактивную неэффективную АМ; 3 Rmd<sup>-</sup>-растения, образующих низкоактивную, но эффективную АМ, и 4 Rmd<sup>++</sup>-растения, образующих эффективную АМ с высокими показателями обилия симбиотических структур (мицелия/арбускул/везикул) в корне.

✿ **Ключевые слова:** арбускулярная микориза; *Medicago lupulina*; *Rhizophagus irregularis*; этилметансульфонат; мутагенез.

## MEDICAGO LUPULINA LINES WITH DEFECTS IN THE DEVELOPMENT OF EFFICIENT ARBUSCULAR MYCORRHIZA

© A.P. Yurkov<sup>1,2</sup>, L.M. Jacobi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Yurkov AP, Jacobi LM. *Medicago lupulina* lines with defects in the development of efficient arbuscular mycorrhiza. *Ecological genetics*. 2018;16(4):61-74. doi: 10.17816/ecogen16461-74.

Received: 09.10.2018

Revised: 11.12.2018

Accepted: 25.12.2018

✿ **Background.** The work is aimed to solve actual problems in biology of arbuscular mycorrhiza (AM). Currently, a lot of mutants had been obtained in various plant model objects with defects in genes controlling AM development, however, the mechanisms controlling development of effective AM symbiosis are still unclear. **Materials and methods.** The authors conducted a mutagenesis in *Medicago lupulina*, a new convenient model plant for molecular-genetic studies. High mycotrophic *M. lupulina* line have early and high response to mycorrhization, high seed production, as well as signs of dwarfism under conditions without of AM and low level of phosphorus available for plants. This method allows visually to identify plant lines with defects in AM symbiosis. **Results.** 14 modes for mutagenesis by ethylmethanesulfonate were conducted. Usage of 3 mutagenesis modes allowed to obtain: productive M1 progeny with high part of viable seedlings (73.3%–86.0%); 1405 plants in M2 progeny. **Conclusion.** According to population analysis for mutant plants in M2 progeny (up to M9 generation) 15 plant lines were selected: one Мус<sup>-</sup> plant line unable to form AM symbiosis, 4 Реп<sup>-</sup> plant lines unable to form AM symbiosis, but characterized by appressoria formation; 3 Rmd<sup>-</sup> plant lines forming low-activity ineffective AM symbiosis; 3 Rmd<sup>-</sup> plant lines forming low-activity effective AM and 4 Rmd<sup>++</sup> plant lines forming effective AM with high abundance of symbiotic structures (mycelium/arbuscules/vesicles) in the roots.

✿ **Keywords:** arbuscular mycorrhiza, *Medicago lupulina*, *Rhizophagus irregularis*, ethylmethanesulfonate, mutagenesis.

### ВВЕДЕНИЕ

Арбускулярная микориза (АМ) является одним из наиболее древних симбиозов в природе: согласно гипотезе формирование симбиоза АМ-грибов с древними

ринофитами обеспечило завоевание растениями суши более 400 млн лет назад [1]. Этот симбиоз широко распространен в растительном мире, согласно последним данным в образовании АМ участвуют грибы подотдела

Glomeromycotina и около 92 % видов наземных растений [2]. АМ значительно усиливает минеральное питание растений, но при этом до 20 % продуктов фотосинтеза поступают в АМ-гриб от растения-хозяина в виде глюкозы [3]. Наиболее существенное влияние АМ оказывает на растение в условиях слабой доступности для питания растений фосфора в почве [4]. Формирование эффективной АМ способствует повышению урожайности целого ряда сельскохозяйственных культур [5]. В связи с этим представляются весьма актуальными фундаментальные исследования и прикладные разработки в направлении создания растительно-микробных систем на основе АМ с повышенным симбиотическим потенциалом — повышенной эффективностью АМ.

Первые мутанты по АМ-симбиозу были получены из коллекции индуцированных мутантов *Pisum sativum* L. с отклонениями в развитии бобоворизобиального симбиоза [6]. Полученные результаты свидетельствуют о наличии общих генов растения-хозяина, контролируемых как ризобиальный, так и микоризный симбиоз [7]. Так, было установлено, что почти половина из 50 не образующих клубеньки мутантов гороха Nod<sup>-</sup>-фенотипа [6, 8, 9] с применением мутагена этилметансульфонатом (ЭМС) полностью устойчивы к заражению АМ-грибами (Myc<sup>-</sup>-фенотип). Показано также, что часть симбиотических мутантов по ризобиальному симбиозу *M. truncatula* Gaertn. [10] и *Phaseolus vulgaris* L. [11] имеют аномалии в развитии АМ. Мутанты на линии J5 с. Джемалонг (*M. truncatula*) по микоризному симбиозу также были найдены среди мутантов по ризобиальному симбиозу [12], полученных с применением гамма-облучения. Были выделены мутанты с Myc<sup>-</sup>Nod<sup>-</sup>, Myc<sup>-/+</sup>Nod<sup>-</sup> и Myc<sup>-/+</sup>Nod<sup>-/+</sup> фенотипами. Таким образом, более продвинутые исследования ризобиального симбиоза способствовали началу и продвижению исследований генетических основ формирования АМ-симбиоза. Тем не менее мутанты с отклонениями в развитии АМ, отобранные из коллекций мутантов по ризобиальному симбиозу, имеют ограниченное применение для изучения механизмов, управляющих активностью и эффективностью АМ. Причина этого заключается в том, что при получении линий для исследования ризобиального симбиоза не проводилась их селекция на чувствительность к дефициту доступного для питания растений фосфора (Рд) в почве и на активность АМ. Исходные линии растений, отобранные для получения мутантов по ризобиальному симбиозу, оказались слабмикотрофными и хорошо адаптированными в условиях низкого уровня Рд в почве. С другой стороны, эти мутанты не являются специфическими по развитию АМ, они уже имеют мутации по ризобиальному симбиозу. В связи с этим вопрос о наличии генов, специфически контролирующих развитие эффективной АМ у бобовых, остался открытым. Понимание механизмов, контролирующих

становление и развитие эффективной АМ, то есть АМ существенно усиливающей параметры роста и развития растения-хозяина, позволит выяснить ее роль в условиях действия стресс-факторов среды: низкого уровня доступного для питания растений фосфора в почве, засухи, засоления, влияния загрязняющих веществ, патогенных микроорганизмов и прочих стрессов биотической и абиотической природы.

Поиск специфических спонтанных мутантов с отклонениями в развитии АМ проведен среди небобовых растений. Впервые о них было сообщено А. Клингер и др. [13]. Авторы выделили спонтанный немикоризируемый мутант кукурузы *Zea mays* L. по отсутствию желтого пигмента, синтезируемого в корнях при нормальном развитии АМ. Аналогичный мутант, который характеризуется резким снижением числа аппрессориев и снижением активности преинфекционного роста гриба, описан на томате *Solanum lycopersicum* L. [14]. Н. Ларкану и др. удалось локализовать *Rmc*-локус на карте генома томата, мутация по которому (*rmc* — reduced mycorrhizal colonization) вызывает снижение микоризной колонизации у томата [15]. С. Редди и др. провели успешный скрининг популяции транспозон-мутагенизированных растений петунии *Petunia × hybrida* hort. ex Vilm. для выявления мутантов с нарушениями в развитии АМ [16]. Результаты исследований на не бобовых растениях [13–16] дали основание предполагать, что гены, специфично отвечающие за развитие эффективной АМ, имеются и у бобовых растений.

Впервые специфический отбор мутантов с отклонениями в развитии АМ по фенотипу бобового растения проведен Д. Моранди и др. в 2009 г. [17]. Для этой цели была использована линия А17 люцерны слабоусеченной с. Джемалонг (*M. truncatula* Gaertn.), исследовано 6000 растений поколения M2 из 300 семей, полученных путем ЭМС-мутагенеза. Корни 3000 растений были исследованы на встречаемость АМ, но по результатам этого анализа (Myc<sup>-</sup>) мутанты выделить не удалось. Однако был получен мутант В9, который отличался от дикого типа значительно более слабым ростом как в условиях микоризации, так и без микоризации, но более высокой встречаемостью АМ: встречаемость АМ — 83 % (против 69 % у линии А17), обилие арбускул в корнях — 71 % (против 51 % у линии А17), но эффективность АМ у линии В9 по показателям продуктивности надземных частей была в 2 раза выше, чем у исходной линии; мутант В9 характеризовался поздней и слабой нодуляцией. Таким образом, впервые был получен мутант *M. truncatula* с фенотипом Myc<sup>++</sup>Nod<sup>-/+</sup> [17]. Тем не менее из приведенных данных видно, что выход симбиотических мутантов был очень низкий (около 0,01 %), что говорит о слабой мутабельности линии А17. Полученные данные свидетельствуют о доминировании автотрофного фосфорного питания над симбиотрофным у линии А17 *M. truncatula*, она не яв-

ляются высокомикотрофным растением, что не позволяет в дальнейшем успешно проводить на ней исследование механизмов развития эффективной АМ.

Первые положительные результаты в направлении селекции сильно микотрофного растения получены А.П. Юрковым и др. при исследовании полиморфизма дикорастущих популяций и малокультуренных сортов люцерны *Medicago lupulina* L. [4, 18, 19]. По результатам этих исследований была отобрана сильно микотрофная яровая люцерна хмелевидная (сортопопуляция ВИК32), из которой в ряду шести поколений была выделена линия MIS-1, характеризующаяся в условиях низкого уровня Рд в почве признаками карликовости (низкорослость, тонкий стебель, низкая продуктивность, отсутствие бокового ветвления, мелкая листовая пластинка) в отсутствие инокуляции АМ-грибом и имеющая нормальный рост при образовании АМ [20]. В условиях инокуляции грибом *R. irregularis* эффективность микоризации по накоплению сухой массы стеблей составила ~3000 %, а по концентрации фосфора в надземной массе — ~150 % в фазу плодоношения. При инокуляции грибом *R. irregularis* (ранее называемый *G. intraradices*) у люцерны хмелевидной образуется микориза *Arum*-типа [19]. Таким образом, являясь облигатным симбиотрофом в условиях низкого уровня Рд в почве, это растение реагирует на наличие или отсутствие АМ. В связи с вышесказанным следует заключить, что применение в качестве растения дикого типа линии MIS-1 позволит вести поиск растительных линий с отклонениями в развитии и симбиотической эффективности АМ по фенотипу растений. Поэтому в задачи настоящего исследования входило проведение ЭМС-мутагенеза сильно микотрофной линии *M. lupulina*, анализ потомства М2-М9 на стабильность наследования симбиотических признаков: низкой/высокой активности АМ, образуемой на люцерне грибом *R. irregularis*, включая оценку встречаемости АМ, выявление сниженного/повышенного обилия арбускул и везикул в корне, определение наличия сниженной либо отсутствия симбиотической эффективности АМ, выраженной в прибавке сырой биомассы надземных частей растений с АМ относительно растений, не инокулированных АМ-грибом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Биологический материал

Микосимбионтом растений выступал штамм RCAM00320 АМ-гриба *Rhizophagus irregularis* (ранее известный как *Glomus intraradices* Shenck & Smith) из коллекции лаборатории № 4 ФГБНУ ВНИИСХМ, показавший высокую эффективность в полевых условиях на множестве сельскохозяйственных культур [5, 21–25]. Поскольку АМ-грибы являются облигатными симбионтами (не растут на средах без растения-хозяина), то поддержание *R. irregularis* проводится в горшечной культуре на накопительной культуре плек-

трантуса южного (*Plectranthus australis* R. Br.; синонимы: *P. verticillatus* (L.f.) Druce, *P. nummularius* Briq.; шведский плющ, от англ. Swedish ivy), — многолетнике со средней активностью микоризации, но низкой симбиотической эффективностью АМ по параметрам продуктивности [26]. Для инокуляции растений использованы микоризованные корни плектрантуса, взятые через 5 мес. от инокуляции. В качестве фитосимбионта при проведении ЭМС-мутагенеза использована полученная авторами сильно микотрофная и быстроотзывчивая на микоризацию линия MIS-1 (сокр. от *M. lupulina* Spring) люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L. var. *vulgaris* Koch), которая была выделена в результате скрининга индивидуальных растений сортопопуляции ВИК32 с последующей проверкой стабильности симбиотических признаков в ряду шести поколений. *M. lupulina* — самоопылитель (автогамия, сопряженная с автотриппингом и клейстогамией) с коротким жизненным циклом (однолетник), диплоид ( $2n = 16$ ), относится к  $C_3$ -растениям, имеет размер генома ~500 Мб, рано созревающее растение с высокой семенной продуктивностью — до 2500 семян с растения. Представленные характеристики позволяют заключить, что данное растение является удобным новым объектом для проведения молекулярно-генетических исследований. При выращивании на почве с низким уровнем Рд без инокуляции АМ-грибом растение имеет признаки карликовости, а в условиях инокуляции — отличается высокой продуктивностью [20]. Это дает возможность использовать показатели роста растений в качестве признаков характеризующих симбиотическую эффективность АМ и вести по ним отбор растительных линий с отклонениями в развитии и эффективности АМ.

### Мутагенез этилметансульфонатом

Общая схема проведения мутагенеза представлена на рис. 1. Выбрано несколько режимов обработки ЭМС по следующим параметрам: обрабатываемый материал (в частности, влажные набухшие семена получены путем предварительной скарификации в серной кислоте); четыре различные концентрации ЭМС; различная длительность обработки. Определяли всхожесть семян и жизнеспособность проростков. Полноценные проростки для получения семян М2 высаживали в сосуды со стерилизованной хорошо окультуренной почвой с высоким содержанием макро- и микроэлементов, содержание Рд — среднее (172 мг Рд/кг почвы). На третьем этапе (см. рис. 1) проводилось выращивание потомства М2 на селективном субстрате с низким Рд (очень низким — по Кирсанову; 39 мг Рд/кг) для отбора мутантов с отклонениями в формировании и развитии АМ. Характеристика условий опыта представлена в статье А.П. Юркова и др. [20]. Эксперимент по отбору растительных линий проведен в стерилизованном ультрафиолетовом световом боксе с неактивной вентиляцией

для предотвращения спонтанного заражения ризобиями и другими симбиотическими микроорганизмами. Режим смены дня и ночи: 18 и 6 ч при температуре +24–26 °С, световой поток — ~1400 лм, полив растений в стаканах проведен из расчета 60 % от полной влагоемкости субстрата весом — 200 г/растение. В качестве контроля высаживали проростки исходной линии MIS-1 — wt (дикого типа, от англ. *wild type*) с инокуляцией и без инокуляции АМ-грибом. На 60-е сут от посадки и инокуляции в фазу цветения оценивали встречаемость АМ, наличие арбускул и везикул у потомства M2, отклик на микоризацию. Проведен морфологический анализ и отбор растительных линий в M2 по следующим критериям:

1) отклонения в развитии надземных частей (признаки карликовости, наличие укороченных/удлиненных междоузлий, наличие хлорофилльных мутантов с отклонениями в С-метаболизме — желтых листовых пластинок и стебля, наличие бесхлорофилльных мутантов — белых семядолей);

2) наличие линий, неспособных к развитию АМ-симбиоза (встречаемость АМ равна нулю) либо имеющих сниженную встречаемость АМ относительно wt; отбирали часть корней растения, оставляя его на доразрастание для получения семян.

На четвертом этапе (см. рис. 1) селекционированные на третьем этапе предполагаемые мутанты с отклонениями в развитии и эффективности АМ пересаживали в сосуды со стерилизованной хорошо окультуренной дерново-подзолистой почвой со средним уровнем Рд для получения урожая семян M3 (аналогично этапу 2; см. рис. 1).

На следующих этапах работы проведена проверка стабильности наследования признаков в ряду поколений до M9 для предполагаемых мутантов (биологическая повторность >15) и до 12 поколения для исходной линии wt в условиях низкого Рд в субстрате (аналогично этапу 3; см. рис. 1), определена встречаемость АМ и эффективность АМ, рассчитанная по сырому весу надземных частей по формуле:

$$\Theta = ([+AM] - [-AM]) / [-AM],$$

где +АМ и –АМ — значения продуктивности (сырого веса надземных частей растений) в вариантах с АМ и без АМ, соответственно. Пробоподготовка корней для оценки параметров микоризации выполнена по методу мацерации и окрашивания, разработанному Дж.М. Филипс и Д.С. Хейман с применением трипанового синего [27]. Ранее было показано, что иные методы окрашивания структур *R. irregularis* являются менее контрастными и избирательными на корнях *M. lupulina* [20]. Параметры микоризации определены



Рис. 1. Схема отбора линий с отклонениями в развитии АМ, полученных в результате ЭМС-мутагенеза сильно микотрофной линии *Medicago lupulina*. Рд — показатель уровня доступного для питания фосфора в субстрате,  $\Theta$  — эффективность АМ, рассчитанная по сырому весу надземных частей,  $F$  — встречаемость АМ,  $\uparrow$  и  $\downarrow$  — высокое/низкое значение показателей «Рд»,  $\Theta$  и  $F$  соответственно

Fig. 1. Scheme for selection of lines with defects in AM development obtained by EMS11 mutagenesis in strongly mycotrophic line *Medicago lupulina*. Pi — low level of available phosphorus in the substrate,  $E$  — AM efficiency, calculated in terms of wet weight of aboveground plant parts (shoots and leaves),  $F$  — AM frequency,  $\uparrow$  and  $\downarrow$  — high or low values of Pi,  $E$  and  $F$ , respectively

методом световой микроскопии [28] и с применением разработанной А.П. Юрковым и др. компьютерной программы [29].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен ЭМС-мутагенез сухих, набухших семян и надземных частей растущих растений люцерны хмелевидной. Применены 14 режимов обработки ЭМС (табл. 1), из которых установлены 7 режимов, обеспечивающих получение жизнеспособных проростков М1 (режимы I–V, X и XII), из них 4 режима позволили получить продуктивное потомство у растений М1 (II, III, IV, XII).

С одной стороны, в условиях низкого уровня Рд в субстрате АМ является жизненно необходима для развития растений сильно микотрофной линии MIS-1. С другой стороны, получение углеводов — продуктов фотосинтеза растения-хозяина жизненно необходимо для развития АМ-гриба *R. irregularis*. В связи с этим в анализе потомства М2 было важно выявить:

1) растения с отклонениями в образовании АМ (в частности наличие для заданного режима мутагенеза растений неспособных к образованию АМ);

2) растения с отклонениями в работе фотосинтетического аппарата (в частности наличие для заданного режима мутагенеза растений, обладающих желтым цветом листовой пластинки либо вообще неспособных к фотосинтезу — формирование белых семядолей с остановкой роста на данной фазе развития).

Растения М2, полученные при II, III, IV, XII режимах ЭМС-мутагенеза, были изучены по данным признакам при выращивании на субстрате с низким Рд. В результате исследования:

1) при режимах III, IV и XII выявлены предполагаемые мутанты, не образующие АМ;

2) II, III, IV, XII режимы обработки приводили к появлению предполагаемых хлорофилльных мутантов с желтым или белым цветом листовых пластинок (табл. 1).

Таблица 1

Режимы обработки при проведении мутагенеза *Medicago lupulina* с применением этилметансульфоната

Table 1

### Processing modes for *Medicago lupulina* mutagenesis by ethylmethanesulfonate

Вариант мутагенеза	Режим обработки растений мутагеном			Доля жизнеспособных проростков М1, %	Наличие продуктивного потомства у М1	Число проанализированных растений М2	Доля линий с желтыми листьями, %	Доля растений, не образующих АМ, %
	обрабатываемый биоматериал	ЭМС, %	время обработки, мин					
I	сухие семена	0,25	1200	63,3*	нет	0	0	0
II	набухшие семена	0,25	165	63,3*	есть	43	2,33	0
III	сухие семена	0,25	345	76,7*	есть	607	1,15	0,16
IV	сухие семена	0,50	360	73,3*	есть	72	2,78	1,39
V	сухие семена	1,00	360	70,0*	нет	0	0	0
VI	набухшие семена	0,50	165	32,0	нет	0	0	0
VII	сухие семена	0,50	1200	10,0	нет	0	0	0
VIII	набухшие семена	1,00	165	32,0	нет	0	0	0
IX	сухие семена	0,20	1820	40,0	нет	0	0	0
X	сухие семена	0,20	1200	76,0*	нет	0	0	0
XI	сухие семена	0,20	3210	21,0	нет	0	0	0
XII	сухие семена	0,20	600	86,0*	есть	581	0,52	0,69
XIII	НЧ растений	0,20	420	целое растение	есть	40	0	0
XIV	НЧ растений	0,20	540	целое растение	есть	62	0	0

Общее число полученных растений М2: 1405

*Примечание.* Серым выделены режимы, включенные в анализ наследования в М2–М9; растения поколения М2, полученные в трех вариантах обработки — III, IV и XII, являются наиболее продуктивными для дальнейшего выделения мутантов с отклонениями в развитии АМ; звездочкой отмечены варианты с высоким выходом жизнеспособных проростков и без отклонений в росте растений М1; НЧ — надземные части.

По результатам фенотипического анализа 20 растений семьи П-4, в котором морфологические мутанты по отклонениям в развитии АМ не выделялись, было сделано заключение о неэффективности II режима обработки. На основании вышесказанного следует полагать, что оптимальными режимами ЭМС-мутагенеза, обеспечивающими семенную продуктивность растений, являются: режим III — сухие семена замачивали в 0,25 % растворе ЭМС в течение 5 ч 45 мин, режим IV — сухие семена замачивали в 0,5 % растворе ЭМС в течение 6 ч и режим XII — сухие семена замачивали в 0,2 % ЭМС в течение 10 ч. Для выделения симбиотических мутантов на селекционную среду было высажено 665 растений М2 из 8 семей, в том числе: 1) III-1 — 82 шт.; 2) III-8 — 265 шт.; 3) IV-5 — 74 шт.; 4) XII-2 — 23 шт.; 5) XII-5 — 107 шт.;

6) XII-6 — 37 шт.; 7) XII-17 — 42 шт.; 8) XII-32 — 35 шт. Фенотипический анализ надземных частей растений М2 показал наличие различных морфологических предполагаемых мутантов: с признаками карликовости, измененным цветом листовых пластин и стеблей, длиной междоузлий, формой листовой пластины и стебля. Анализ корней на встречаемость АМ позволил установить, что часть отобранных морфологических мутантов, имеющих признаки карликовости, можно отнести к симбиотическим мутантам. Предполагаемые мутанты с исключительными фенотипическими признаками (табл. 2) были пересажены на хорошо окультуренную почву для получения урожая семян (см. этап 3 на рис. 1). В дальнейшем была проведена проверка наследуемости приобретенных признаков у отобранных линий в ряду поколений (до 9-го включительно).

Таблица 2

**Морфология растений и фенотип АМ у дикого типа *Medicago lupulina* и линий с отклонениями в развитии АМ-симбиоза**

Table 2

**Morphology of plants and AM phenotype in *Medicago lupulina* wild type lines and lines with defects in development of AM symbiosis**

Индекс линии	Уровень фосфора в почве	Морфологическая характеристика растительных линий	Встречаемость АМ (F), %	Эффективность, рассчитанная по свежему весу НЧ, %	Фенотип арбускулярной микоризы	Индекс фенотипа
Исходная линия (wt)	Низкий	Стебель длинный зеленый, листовые пластинки крупные и средние зеленые, боковое ветвление развито, вторичное кущение — 2 стебля, у стареющих листьев прожилки, черешки и нижняя поверхность имеют антоциановую окраску (wt-контроль). В условиях без АМ: карликовость, листовая пластинка мелкая темно-зеленая, черешок листа укороченный бурый, стебель тонкий сухой буро-зеленый без бокового ветвления (wt-контроль). Стабильность наследования в ряду 1–12 поколений	65,7 ± 3,6	251,5 ± 27,3	Межклеточный мицелий, арбускулы и везикулы; микориза <i>Arum</i> -типа	Myc <sup>+</sup>
	Высокий	Куст высокий, листовые пластинки крупные и средние зеленые, стебли зеленые, боковое ветвление развито, облиственность средняя, вторичное кущение развито, у стареющих листьев прожилки, черешки и нижняя поверхность имеют антоциановую окраску. В условиях без АМ развитие аналогично варианту с АМ. При инокуляции клубеньковыми бактериями образует как белые, так и розовые азотфиксирующие клубеньки	н. о.	н. о.		

Продолжение табл. 2 (Table 2 continued)

Индекс линии	Уровень фосфора в почве	Морфологическая характеристика растительных линий	Встречаемость АМ (F), %	Эффективность, рассчитанная по свежему весу НЧ, %	Фенотип арбускулярной микоризы	Индекс фенотипа
III-1-18-27	Низкий	Карликовость, листовая пластинка очень мелкая темно-зеленая, стебель тонкий буро-зеленый, боковое ветвление не развито; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	$37,5 \pm 3,8$	Менее 20 % (не достоверная)	Неактивная АМ с аморфными и дистрофными арбускулами, внутрикорневой мицелий часто без везикул	Rmd <sup>-</sup>
	Высокий	Высота куста на уровне wt контроля, листовая пластинка средняя темно-зеленая, стебель буро-зеленый, ветвление единичное, облиственность слабая. При инокуляции клубеньковыми бактериями образует как белые, так и розовые азотфиксирующие клубеньки	н. о.	н. о.		
III-1-19-7	Низкий	Гиперкарликовость, округлый лист — желтый, листовая пластинка мелкая темно-зеленая, у молодых листьев — желтая, черешок и прожилки листа желтые, стебель белый, боковое ветвление отсутствует; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	$8,0 \pm 1,2$	Эффективность АМ отсутствует	Внутрикорневой мицелий и арбускулы аморфные, везикулы редкие, интенсивность микоризации низкая	Rmd <sup>-</sup>
	Высокий	Куст (10 стеблей), высота куста ниже wt-контроля, листовая пластинка мелкая зеленая, у молодых листьев — желтая, прожилки и стебли белые, черешки листьев на боковых ветвях укорочены	н. о.	н. о.		
III-8-20-23	Низкий	Карликовость, листовая пластинка зеленая, мелкая, стебель тонкий светло-зеленый в верхней части и бурый внизу, боковое ветвление — единичное; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	0	Эффективность АМ отсутствует	Структуры АМ не обнаружены, аппрессории имеются	Rep <sup>-</sup>
	Высокий	Высота куста на уровне wt-контроля, листовая пластинка желтовато-зеленая. При инокуляции клубеньковыми бактериями не формирует клубеньки, формируются утолщения на корнях — возможно, примордии	н. о.	н. о.		
III-8-22-13	Низкий	Листовая пластинка у молодых листьев желто-зеленая, стебли высокие, вторичное кущение — 2 стебля; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	$68,3 \pm 3,4$	Менее 100 % (достоверная)	Встречаемость микоризы высокая, арбускулы крупные, везикулы средние	Rmd <sup>++</sup>
	Высокий	Куст на уровне wt-контроля, листовая пластинка средняя желто-зеленая, у молодых листьев — светло-желтая, редко старые листья имеют антоциановый окрас, боковое ветвление частое	н. о.	н. о.		

Продолжение табл. 2 (Table 2 continued)

Индекс линии	Уровень фосфора в почве	Морфологическая характеристика растительных линий	Встречаемость АМ (F), %	Эффективность, рассчитанная по свежему весу НЧ, %	Фенотип арбускулярной микоризы	Индекс фенотипа
III-8-33-9	Низкий	Куст (5–8 стеблей), листовая пластинка мелкая зеленая, высокая облиственность, черешок длинный, укороченные междоузлия, позднеспелый, сильно развитая корневая система; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	$55,8 \pm 5,2$	Менее 200 % (достоверная)	Арбускулы плотные, везикул много	Rmd <sup>++</sup>
	Высокий	Куст (18–20 стеблей), ниже wt-контроля, стелющиеся стебли, листовая пластинка средняя зеленая, высокая облиственность, позднеспелый, укореняющиеся отводки, сильно развитая корневая система	н.о.	н.о.		
IV-5-6-25	Низкий	Отдельные зрелые листья с антоциановой окраской; стабильность наследования в ряду 3–9 поколений	$53,0 \pm 3,9$	Менее 100 % (достоверная)	Встречаемость микоризы высокая, арбускулы крупные, везикул больше, чем у wt	Rmd <sup>++</sup>
	Высокий	Куст выше wt-контроля, отдельные зрелые листья с антоциановой окраской, сильно развито боковое ветвление, обильное плодоношение	н.о.	н.о.		
IV-5-6-15	Низкий	Крупные зеленые листья, слабо укороченные междоузлия; стабильность наследования в ряду 3–9 поколений	$40,1 \pm 4,3$	Менее 100 % (достоверная)	Интенсивность микоризации высокая, арбускулы крупные, везикул больше, чем у wt	Rmd <sup>++</sup>
	Высокий	Куст (5 стеблей) выше wt-контроля, у зрелых и засыхающих листьев нет антоциановой окраски, сильно развито боковое ветвление, обильное плодоношение	н.о.	н.о.		
XII-2-18-4-5-1	Низкий	Листовые пластинки средние и мелкие зеленые скрученные, стебель тонкий зеленый извилистый, боковое ветвление слабо выражено, среднеспелое; стабильность наследования в ряду 6–9 поколений	$32,8 \pm 3,3$	Менее 100 % (достоверная)	Медленное развитие эффективной АМ, редуцированные аморфные арбускулы и мицелий, везикул нет	Rmd <sup>-</sup>
	Высокий	Куст ниже wt-контроля, листовые пластинки средние и мелкие зеленые скрученные, стебли зеленые извилистые. При инокуляции клубеньковыми бактериями образует розовые азотфиксирующие клубеньки	н.о.	н.о.		

Продолжение табл. 2 (Table 2 continued)

Индекс линии	Уровень фосфора в почве	Морфологическая характеристика растительных линий	Встречаемость АМ (F), %	Эффективность, рассчитанная по свежему весу НЧ, %	Фенотип арбускулярной микоризы	Индекс фенотипа
XII-5-66-8	Низкий	Листовые пластинки средние желто-зеленые, стебель желто-зеленый, боковое ветвление слабо выражено, среднеспелое; стабильность наследования в ряду 3–9 поколений	$21,0 \pm 4,7$	Менее 20 % (не достоверная)	Низкая встречаемость АМ, арбускулы плотные, развитие везикул нормальное	Rmd <sup>-</sup>
	Высокий	Куст (10 стеблей) на уровне wt-контроля, стебли и листья желто-зеленые, боковое ветвление развито, плодородие на уровне wt-контроля	н. о.	н. о.		
XII-6-5-11-1-7-5	Низкий	Удлиненные междоузлия, стебель тонкий, удлинённый, слабооблиственный, боковое ветвление не развито; стабильность наследования в ряду 7–9 поколений	$10,1 \pm 2,3$	Менее 200 % (достоверная)	Интенсивность микоризации низкая, мицелий и арбускулы аморфные, везикулы тонкостенные, редкие	Rmd <sup>-</sup>
	Высокий	Высота куста ниже wt-контроля, листовые пластинки средние и мелкие, стебли тонкие с удлиненными междоузлиями, боковые ветви простые и с множественным вторичным ветвлением	н. о.	н. о.		
XII-6-5-34	Низкий	Гиперкарликовость, листовая пластинка очень мелкая темно-зеленая, стебель тонкий, боковое ветвление не развито; стабильность наследования в ряду 3–9 поколений	0	Эффективность АМ отсутствует	Структуры АМ не обнаружены, аппрессориев нет	Muc <sup>-</sup>
	Высокий	Куст низкорослый, компактный, листовая пластинка средняя, зеленая, стебель буро-зеленый, боковое ветвление развито слабо	н. о.	н. о.		
XII-17-12-14	Низкий	Низкорослое, междоузлия укорочены, вторичное кущение развито, стебель толстый, лист крупный зеленый; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	$46,9 \pm 3,6$	Менее 100 % (достоверная)	Встречаемость АМ сниженная, АМ зрелая, везикул и арбускул много	Rmd <sup>-</sup>
	Высокий	Куст низкорослый, компактный, хорошо облиственен, междоузлия укороченные; позднеспелое	н. о.	н. о.		
XII-32-3-10	Низкий	Карликовость, листовая пластинка средняя и мелкая зеленая, низкорослое (ниже исходной линии при выращивании без АМ), боковое ветвление — среднее; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	0	Эффективность АМ отсутствует	Структуры АМ не обнаружены, аппрессории имеются	Pen <sup>-</sup>
	Высокий	Куст ниже wt-контроля, листовая пластинка средняя, зеленая, стебель сочный, боковое ветвление развито слабо. При инокуляции клубеньковыми бактериями не формирует клубеньки, редко формируются утолщения на корнях — возможно, примордии	н. о.	н. о.		

Окончание табл. 2 (Table 2 continued)

Индекс линии	Уровень фосфора в почве	Морфологическая характеристика растительных линий	Встречаемость АМ (F), %	Эффективность, рассчитанная по свежему весу НЧ, %	Фенотип арбускулярной микоризы	Индекс фенотипа
ХП-32-5-50	Низкий	Карликовость, листовая пластинка мелкая темно-зеленая, высота на уровне исходной линии без АМ, бокового ветвления нет или слабое; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	0	Эффективность АМ отсутствует	Структуры АМ не обнаружены, аппрессории имеются	Rep <sup>-</sup>
	Высокий	Куст ниже wt-контроля, листовые пластинки средние и мелкие темно-зеленые, боковое ветвление не развито или слабое. При инокуляции клубеньковыми бактериями не формирует клубеньки	н. о.	н. о.		
ХП-32-6-45	Низкий	Карликовость, листовая пластинка очень мелкая темно-зеленая, стебель тонкий буро-зеленый по высоте на уровне исходной линии без АМ, боковое ветвление слабое, вторичное кущение — 3 стебля; стабильность наследования в ряду 2–9 поколений	0	Эффективность АМ отсутствует	Структуры АМ не обнаружены, аппрессории имеются	Rep <sup>-</sup>
	Высокий	Высота куста ниже wt-контроля без АМ, листовая пластинка мелкая зеленая, стебель тонкий зеленый, боковое ветвление очень частое. При инокуляции клубеньковыми бактериями не формирует клубеньки	н. о.	н. о.		

*Примечание.* Представлены данные по активности и эффективности АМ для линий *M. lupulina* с грибом *R. irregularis* на 50 суток от посадки; н. о. — значение не определено; значения низкий и средний уровень Рд представлены в разделе «Материалы и методы». Фенотипы АМ: 1) Мус<sup>+</sup> (*mycorrhiza development*) — развитие АМ у wt; 2) Мус<sup>-</sup> — структур АМ не обнаружено; 3) Реп<sup>-</sup> (penetration in root cortex) — аппрессории не формируют инфицирующих гиф; 4) Rmd<sup>-</sup> (rate of mycorrhiza development, или Мус<sup>+/-</sup>-фенотип) — сниженная скорость развития АМ и низкая/отсутствие АМ-эффективности; 5) Rmd<sup>++</sup> — повышенная скорость развития АМ и достоверная АМ-эффективность.

Среди мутагенизированных растений поколения М2 была показана достоверная стабильность наследования дефектных признаков в ряду поколений до М9 у 2,3 % растительных линий. Растения имеют следующие фенотипические признаки.

1. Получено одно Мус<sup>-</sup>-растение, не образующее АМ. ХП-6-5-34 — гиперкарлик с очень мелкой темно-зеленой листовой пластинкой, практически нежизнеспособный.

2. Получены четыре Реп<sup>-</sup>-растения, не образующих АМ, но образующих аппрессории. III-8-20-23 — карлик с мелкой зеленой листовой пластинкой, не образует симбиоза с клубеньковыми бактериями *Sinorhizobium meliloti*. ХП-32-3-10 — карлик с средне-мелкой зеленой листовой пластинкой, не образует симбиоза с клубеньковыми бактериями. ХП-32-5-50 — карлик с мелкой темно-зеленой листовой пластинкой, не образует симбиоза с клубеньковыми бактериями. ХП-32-6-45 — карлик с очень мелкой темно-зеленой листовой пластинкой, не образует симбиоза с клубеньковыми бактериями.

ХП-32-6-45 — карлик с очень мелкой темно-зеленой листовой пластинкой, не образует симбиоза с клубеньковыми бактериями.

3. Получены три Rmd<sup>-</sup>-растения, образующих низкоактивную неэффективную АМ. III-1-19-7 — гиперкарлик с мелкой темно-зеленой листовой пластинкой. ХП-5-66-8 — листовые пластинки средние желтозеленые, стебель желто-зеленый. III-1-18-27 — карлик с очень мелкой темно-зеленой пластинкой, характеризуется Arb<sup>+/-</sup>-фенотипом со сниженным обилием арбускул (от reduced abundance of arbuscules, фенотип цит. по [30]).

4. Получены три Rmd<sup>-</sup>-растения, образующих низкоактивную, но эффективную АМ. ХП-6-5-11-1-7-5 — удлиненные междоузлия, стебель тонкий. ХП-2-18-4-5-1 — листовые пластинки мелкие и средние скрученные, стебель извилистый, при инокуляции клубеньковыми бактери-

ями образует розовые азотфиксирующие клубеньки. XII-17-12-14 — укороченные междоузлия, листья крупные зеленые.

5. Получены четыре Rmd<sup>++</sup>-растения, образующих эффективную АМ с высокими показателями обилия симбиотических структур (мицелия/арбускул/везикул) в корне. III-8-22-13 — листовая пластинка средняя у молодых листьев желто-зеленая, стебли высокие. III-8-33-9 — высокая кустистость, листовая пластинка мелкая зеленая, укороченные междоузлия. IV-5-6-25 — часть зрелых листьев с антациановой окраской. IV-5-6-15 — листовая пластинка крупная зеленая, слабо укороченные междоузлия. Линии III-8-22-13 и III-8-33-9 имеют повышенное обилие арбускул — Arb<sup>++</sup>-фенотип от increased abundance of arbuscules, наследуемость Arb<sup>++</sup>-фенотипа оценивается. Линии IV-5-6-15 и IV-5-6-25 имеют повышенное обилие везикул — Ves<sup>++</sup>-фенотип от increased abundance of vesicles, наследуемость Ves<sup>++</sup>-фенотипа оценивается. Представленные фенотипы надземных частей характерны для растений, выращенных в условиях низкого Рд в субстрате.

Результаты показали, что у всех линий с отклонениями в развитии АМ, пересаженных на хорошо окультуренную почву со средним уровнем Рд, признаков карликовости не наблюдалось. Очевидно, в этих условиях у них преобладал автотрофный способ фосфорного питания. У линий с удлинненными или укороченными междоузлиями, с извилистыми листовыми пластинами, сильно развитой кустистостью, с желто-зеленой окраской листовых пластин, с пятнами антоциана или отсутствием видимых признаков антоциана, с белым стеблем развивается типичная АМ, но с замедлением (Rmd<sup>-</sup>-фенотип) или ускорением (Rmd<sup>++</sup>-фенотип), по сравнению с wt-контролем. Вероятно, у этих линий имеет место изменение гормонального статуса, влияющее на интенсивность образования АМ. Так, например, об изменении уровня ряда гормонов у морфологических мутантов гороха сообщается в работе К.К. Сидоровой [31]. В свою очередь, гормональный статус растения существенно влияет на развитие АМ, что было показано в исследованиях, проведенных на горохе [32] и томатах [33].

Отметим, что селектированная нами линия III-1-18-27 при инокуляции клубеньковыми бактериями *S. meliloti* образует как белые, так и розовые азотфиксирующие клубеньки, то есть имеет специфические отклонения в развитии эффективной АМ, но не имеет отклонений в развитии эффективного бобоворизобиального симбиоза. Специфические мутации по АМ-симбиозу с *R. irregularis* без отклонений в развитии бобоворизобиального симбиоза (с *Mesorhizobium loti*) впервые были получены на трех ЭМС-мутантах *Lotus japonicus* [34], однако проверка стабильности наследования признаков в работе [34] была проведена только до поколения М3–М4.

При проведении настоящего исследования получены данные, свидетельствующие о значительной мутабель-

ности исследуемой линии *M. lupulina* при использовании ЭМС-мутагенеза. Выход линий М2 с отклонениями в развитии АМ в зависимости от режима обработки мутагеном (III, IV и XII) составил 1,4, 2,7 и 3,3 % соответственно; наиболее эффективным был режим XII (табл. 1, 2). Для сравнения, например, выход индуцированных симбиотических мутантов *P. sativum* по ризобиальному симбиозу при ЭМС-мутагенезе был значительно ниже и составил от 0,02 до 1,1 % в зависимости от сорта и режима обработки мутагеном [6, 10, 30, 35–42]. Из их числа менее половины мутантов имели отклонения по микоризному симбиозу. Таким образом, можно констатировать, что методика по получению мутантов с отклонениями в развитии и симбиотической эффективности АМ, разработанная авторами, является весьма результативной и может найти применение и на других растениях, обладающих высоким откликом на инокуляцию АМ-грибом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В качестве модельного объекта для получения мутантов, индуцированных с помощью ЭМС-мутагенеза, предложена новая высокомикотрофная линия MLS-1 *Medicago lupulina*, имеющая признаки карликовости в отсутствие АМ в условиях низкого уровня Рд в субстрате. Разработана эффективная система отбора мутантов из популяции мутагенизированных растений. Получены 15 растительных линий, из которых четыре являются предполагаемыми симбиотическими мутантами — имеют нарушения в развитии АМ, остальные 11 линий имеют отклонения в сторону ускорения или замедления развития АМ, наследуемые до поколения М9. Отметим, что получение симбиотических мутантов с отклонениями в развитии эффективной АМ у облигатно микотрофного растения осуществляется впервые. Исходная линия, а также полученные на ней линии с отклонениями в развитии АМ послужат решению фундаментальных проблем биологии, связанных с изучением механизмов функционирования эффективного АМ-симбиоза с применением как молекулярно-генетических, так и физиолого-биохимических и микробиологических методов. Полученные результаты также будут способствовать продвижению оценке метаболома и транскриптома *M. lupulina*, которые начаты авторами работы в рамках объединенных исследований с лабораториями и кафедрами ФГБНУ ВНИИСХМ, СПбГУ и БИН РАН. Результаты исследования могут найти применение в селекции люцерны на повышение симбиотического потенциала и повышение продуктивности растений в условиях дефицита доступного для питания растений фосфора в почве.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа А.П. Юркова поддержана грантом РФФИ-а № 18-016-00220, работа Л.М. Якоби поддержана грантом СПбГУ № 1.37.534.2016. Часть работы выполне-

на в рамках государственного задания 0664-2018-0022 на оборудовании ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Авторы благодарят д-ра биол. наук Н.А. Проворова, д-ра биол. наук М.Ф. Шишову и канд. биол. наук В.А. Жукова за плодотворное обсуждение полученных результатов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(25):11841-11843. doi: 10.1073/pnas.91.25.11841.
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 2016;108(5):1028-46. doi: 10.3852/16-042.
- Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. Cambridge (UK): Academic Press, Cambridge; 2008.
- Юрков А.П., Якоби Л.М., Дзюбенко Н.И., и др. Полиморфизм популяции Павловская люцерны хмелевидной по показателям продуктивности, микорризации и эффективности симбиоза с *Glomus intraradices* // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — Т. 46. — № 3. — С. 65–70. [Yurkov AP, Yakobi LM, Dzyubenko NI, et al. Black medic pavlovskaya population is polymorphic for productivity, mycorrhization and symbiotic efficiency with *Glomus intraradices*. *Selskokhoziaistvennaia Biol*. 2011;46(3):65-70. (In Russ.)]
- Юрков А.П., Лактионов Ю.В., Кожемяков А.П., и др. Анализ симбиотической эффективности бактериальных и грибных препаратов на кормовых культурах по данным урожайности семян // Кормопроизводство. — 2017. — № 3. — С. 16–21. [Yurkov AP, Laktionov YV, Kozhemyakov AP, et al. Symbiotic efficiency of bacterial and fungal preparations for forage crops according to seed harvest. *Kormoproizvodstvo*. 2017;(3):16-21. (In Russ.)]
- Duc G, Messenger A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. *Plant Sci*. 1989;60(2):207-213. doi: 10.1016/0168-9452(89)90168-4.
- Borisov A, Vasil'chikov AG, Voroshilova VA, et al. Regulatory genes of garden pea (*Pisum sativum* L.) controlling the development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza: a review of basic and applied aspects. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2007;43(3):265-271. doi: 10.1134/S0003683807030027.
- Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinani S, et al. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas V. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytol*. 1991;117(1):61-76. doi: 10.1111/j.1469-8137.1991.tb00945.x.
- Balaji B, Ba AM, LaRue TA, et al. *Pisum sativum* L. mutants insensitive to nodulation are also insensitive to invasion *in vitro* by mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Plant Sci*. 1994;102(2):195-203. doi: 10.1016/0168-9452(94)90038-8.
- Sagan M, Morandi D, Tarengi E, et al. Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after  $\gamma$ -ray mutagenesis. *Plant Sci*. 1995;111(1):63-71. doi: 10.1016/0168-9452(95)04229-N.
- Shizliffe SJ, Vessey JK. A nodulation (Nod<sup>+</sup>/Fix<sup>-</sup>) mutant of *Phaseolus vulgaris* L. has nodulelike structures lacking peripheral vascular bundles (Pvb<sup>-</sup>) and is resistant to mycorrhizal infection (Myc<sup>-</sup>). *Plant Sci*. 1996;118(2):209-220. doi: 10.1016/0168-9452(96)04427-5.
- Morandi D, Prado E, Sagan M, Duc G. Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* (Gaertn.) mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza*. 2005;15(4):283-289. doi: 10.1007/s00572-004-0331-4.
- Klingner A, Bothe H, Wray V. Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization. *Phytochemistry*. 1995;38(1):53-55. doi: 10.1016/0031-9422(94)00538-5.
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, et al. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phitophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *MPMI*. 1998;11(10):1017-1028. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.10.1017.
- Larkan NJ, Smith SE, Barker SJ. Position of the reduced mycorrhizal colonization (*Rmc*) locus on the tomato genome map. *Mycorrhiza*. 2007;17(4):311-318. doi: 10.1007/s00572-007-0106-9.
- Reddy DMRS, Schorderet M, Feller U, Reinhardt D. A petunia mutant affected in intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant J*. 2007;51(5):739-750. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03175.x.
- Morandi D, le Signor C, Gianinazzi-Pearson V, Duc G. A *Medicago truncatula* mutant hyper-responsive to mycorrhiza and defective for nodulation. *Mycorrhiza*. 2009;19(6):435-441. doi: 10.1007/s00572-009-0242-5.
- Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В., и др. Эффективность инокуляции форм люцерны хмелевидной грибом арбускулярной микорризы *Glomus intraradices* и внутривидовая изменчивость растений по показателям продуктивности и микорризообразования // Сельскохозяйственная биология. — 2007. — Т. 42. — № 5. — С. 67–74. [Yurkov AP, Yakobi LM, Stepanova GV, et al. Inoculation efficiency of *Glomus intraradices* and intrapopulation variability

- in plants of *Medicago lupulina* L. on productivity and forming of mycorrhiza. *Selskokhoziaistvoennai Biol.* 2007;42(5):67-74. (In Russ.)
19. Юрков А.П., Якоби Л.М., Кожемяков А.П., Шишова М.Ф. Влияние арбускулярной микоризы на рост и развитие быстроразвиваемой на микорризацию линии люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.) // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. — 2009. — № 2. — С. 138–144. [Yurkov AP, Yakobi LM, Kozhemyakov AP, Shishova MF. Influence of arbuscular mycorrhiza on growth and development of black medic (*Medicago lupulina* L.) plant line with high response to mycorrhization. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 3, Biologiya.* 2009;(2):138-144. (In Russ.)]
  20. Yurkova AP, Jacobi LM, Gapeeva NE, et al. Development of Arbuscular Mycorrhiza in Highly Responsive and Mycotrophic Host Plant-Black Medick (*Medicago lupulina* L.). *Ontogenez.* 2015;46(5):313-326. doi: 10.1134/S1062360415050082.
  21. Юрков А.П., Степанова Г.В., Якоби Л.М., и др. Продуктивность яровой и озимой пшеницы при использовании гриба арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* в условиях дефицита влаги // Кормопроизводство. — 2012. — № 11. — С. 18–20. [Yurkov AP, Stepanova GV, Yakobi LM, et al. Productivity of spring and winter wheat in drought conditions dependent on the application of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Kormoproizvodstvo.* 2012;(11):18-20. (In Russ.)]
  22. Кирпичников Н.А., Завалин А.А., Волков А.А., и др. Эффективность фосфорных удобрений на периодически известкуемой почве при обработке семян ячменя и клевера биопрепаратами // Агрохимия. — 2012. — № 11. — С. 16–27. [Kirpichnikov NA, Zavalin AA, Volkov AA, et al. Effect of Phosphorus Fertilizers, Lime Materials, and Biopreparations on Barley and Clover Plants in a Mixed Plantation. *Agrokhimiya.* 2012;(11):16-27. (In Russ.)]
  23. Юрков А.П., Якоби Л.М., Юрченко Е.Г., и др. Оптимизация почвенно-биотического комплекса виноградных школок на основе обработки грибами арбускулярной микоризы // Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ. — 2013. — Т. 3. — С. 116–121. [Yurkov AP, Yakobi LM, Yurchenko EG, et al. Optimization of soil-biotic complex of vine nursery on the basis of treatment of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nauchnye trudy GNU SKZNIISiV.* 2013;3:116-121. (In Russ.)]
  24. Сергалиев Н.Х., Юрков А.П., Тлепов А.С., и др. Влияние гриба арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* на продуктивность яровой твердой пшеницы на темно-каштановой почве в условиях сухостепной зоны Приуралья // Новости науки Казахстана. — 2013. — № 3. — С. 149–154. [Sergaliev NKh, Yurkov AP, Tlepov AS, et al. Vliyaniye griba arbuskulyarnoy mikorizy *Glomus intraradices* na produktivnost' yarovoy tverdoy pshenitsy na temno-kashtanovoy pochve v usloviyakh sukhostepnoy zony Priural'ya. *Novosti nauki Kazakhstana.* 2013;(3):149-154. (In Russ.)]
  25. Ефимова И.Л., Юрков А.П. Новые приемы агроэкологии для повышения качества посадочного материала яблони // Труды Кубанского ГАУ. — 2015. — № 55. — С. 73–77. [Efimova IL, Yurkov AP. Novye priemy agroekologii dlya povysheniya kachestva posadochnogo materiala yabloni. *Trudy Kubanskogo GAU.* 2015;(55):73-77. (In Russ.)]
  26. Юрков А.П., Шишова М.Ф., Семенов Д.Г. Особенности развития люцерны хмелевидной с эндомикоризным грибом. — Саарбрюкен: LAP, 2010. [Yurkov AP, Shishova MF, Semenov DG. Osobennosti razvitiya lyutserny khmelevidnoy s endomikoriznym gribom. Saarbrücken: LAP; 2010. (In Russ.)]
  27. Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transact British Mycor Soc.* 1970;55(1):158-161. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3.
  28. Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes ayant une signification fonctionnelle. In: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Ed. by V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi. Paris; 1986.
  29. Воробьев Н.И., Юрков А.П., Проворов Н.А. Программа вычисления индексов микоризации корней растений. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016612112. Зарегистрирована 12.02.2016. — М., 2016. [Vorob'ev NI, Yurkov AP, Provorov NA. Programma vychisleniya indeksov mikorizatsii korney rasteniy. Svidetel'stvo o gosudarstvennoy registratsii programmy dlya EVM № 2016612112. Zaregistrirovana 12.02.2016. Moscow; 2016. (In Russ.)]
  30. Shtark OY, Sulima AS, Zhernakov AI, et al. Arbuscular mycorrhiza development in pea (*Pisum sativum* L.) mutants impaired in five early nodulation genes including putative orthologs of *NSP1* and *NSP2*. *Symbiosis.* 2016;68(1-3):129-144. doi: 10.1007/s13199-016-0382-2.
  31. Сидорова К.К. Исследование естественной мутабельности мутантов растений на примере *Pisum sativum* L. // Информационный вестник ВОГиС. — 2008. — Т. 12. — № 1–2. — С. 180–185. [Sidорова КК. A study of natural mutability in plants: a case of *Pisum Sativum* l. *Informatsionnyy vestnik VOGiS.* 2008;12(1-2):180-185. (In Russ.)]
  32. El Ghachtouli N, Martin-Tanguy J, Paynot M, et al. First report of inhibition of arbuscular mycorrhizal in-

- fection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. *FEBS Letters*. 1996;385(3):189-192. doi: 10.1016/0014-5793(96)00379-1.
33. Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, et al. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytol*. 2007;175(3):554-564. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02107.x.
34. Kojima T, Saito K, Oba H, et al. Isolation and phenotypic characterization of *Lotus japonicus* mutants specifically defective in arbuscular mycorrhizal formation. *Plant Cell Physiol*. 2014;55(5):928-941. doi: 10.1093/pcp/pcu024.
35. Duc G, Trouvelot A, Gianinazzi-Pearson V, et al. First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc<sup>-</sup>) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Sci*. 1989;60(2):215-222. doi: 10.1016/0168-9452(89)90169-6.
36. Sagan M, Duc G. *Sym28* and *sym29*, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). *Symbiosis*. 1996;20:229-245.
37. Engvild K. Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea, *Pisum sativum* L. *Theor Appl Genet*. 1987;74(6):711-713. doi: 10.1007/BF00247546.
38. Kneen BE, LaRue TA. Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweetclover (*Melilotus alba annua*). *Plant Sci*. 1988;58(2):177-182. doi: 10.1016/0168-9452(88)90007-6.
39. Jacobsen E. Modification of symbiotic interaction of pea (*Pisum sativum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* by induced mutations. *Plant Soil*. 1984;82(3):427-438. doi: 10.1007/BF02184280.
40. Jacobsen E, Feenstra WJ. A new pea mutant with efficient nodulation in the presence of nitrate. *Plant Sci Lett*. 1984;33(3):337-344. doi: 10.1016/0304-4211(84)90025-7.
41. Borisov AY, Morzina EV, Kulikova OA, et al. New symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) affecting either nodule initiation or symbiosome development. *Symbiosis*. 1992;14:297-313.
42. Tsyganov VE, Borisov AY, Rozov SM, et al. New symbiotic mutants of pea obtained after mutagenesis of laboratory line SGE. *Pisum Genet*. 1994;26:36-37.

✿ Информация об авторах

**Андрей Павлович Юрков** — канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории № 4, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург; научный сотрудник кафедры физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. SPIN: 9909-4280. E-mail: yurkovandrey@yandex.ru.

**Лидия Михайловна Якоби** — научный сотрудник лаборатории № 4, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург; научный сотрудник кафедры физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. SPIN: 3384-4130. E-mail: lidija-jacobi@yandex.ru.

✿ Information about the authors

**Andrey P. Yurkov** — Candidate of Biology, Assistant Professor, Senior Researcher, Laboratory No 4, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia; Research Scientist, Dept. of Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 9909-4280. E-mail: yurkovandrey@yandex.ru.

**Lidija M. Jacobi** — Research Scientist, Laboratory No 4, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia; Research Scientist, Dept. of Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 3384-4130. E-mail: lidija-jacobi@yandex.ru.