



© В. Е. Цыганов¹,
В. А. Ворошилова^{1,4}, С. М. Розов²,
А. Ю. Борисов¹, И. А. Тихонович^{1,3}

УДК 575.224.46.044

НОВАЯ СЕРИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ МУТАНТОВ ГОРОХА, ИНДУЦИРОВАННЫХ НА ЛИНИИ SGE

¹ ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН;
² Учреждение РАН Институт цитологии и генетики СО РАН;
³ СПбГУ, кафедра генетики и селекции; ⁴ ООО «Пи Эс Ай», Санкт-Петербург

✿ Проведен химический мутагенез лабораторной линии гороха SGE с использованием этилметансульфоната. При анализе 425 семей (2069 растений) поколения M_2 было отобрано 45 потенциальных симбиотических мутантов, из них 30 мутантов, формирующих неэффективные клубеньки (фенотип Fix^-), 13 мутантов, неспособных формировать клубеньки (фенотип Nod^-) и 2 мутанта, формирующих единичные клубеньки (фенотип $Nod^{+/-}$). Для 1 Nod^- и 5 Fix^- мутантов было показано моногенное наследование и рецессивное проявление мутантных признаков. Для Fix^- мутанта SGE Fix^- -9 показано присутствие дополнительной мутации, приводящей к фенотипу $Nod^{+/-}$. Комплементационный анализ показал, что мутантный фенотип линии SGE Fix^- -5 определяется мутацией в гене *sym33*, линии SGE Fix^- -6 — в гене *sym40*, линии SGE Fix^- -7 — в гене *sym27*, и линии SGE Fix^- -8 — в гене *sym25*.

✿ **Ключевые слова:** химический мутагенез; симбиотические мутанты; симбиотические гены; клубенькообразование, *Pisum sativum* L.

Поступила в редакцию 14.11.2011.
Принята к публикации 29.02.2012

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий генетический контроль формирования азотфиксирующих клубеньков бобовых со стороны растительного генома является предметом углубленного изучения. В 1940–1970 гг. основным методом исследований был поиск полиморфизма по признакам клубенькообразования в природных популяциях бобовых культур, что позволило выявить ряд спонтанных мутаций, приводящих либо к полной неспособности к клубенькообразованию, либо к аномальному развитию клубеньков у таких традиционных бобовых растений как горох, соя, люцерна и других (Борисов и др., 1998). С конца 1970 гг. применение мутагенеза привело к созданию больших коллекций индуцированных мутантов для ряда важных сельскохозяйственных бобовых растений: гороха, люцерны, сои и донника (Борисов и др., 1998; Bhatia et al., 2001).

Генетический анализ позволил выявить серии генов бобовых культур, вовлеченных в контроль различных стадий развития симбиотических клубеньков (Borisov et al., 2004; Борисов и др., 2011). Тем не менее, проблемы, характерные для традиционных бобовых культур, связанные с большим физическим размером геномов и трудностями при разработке эффективных протоколов трансформации, до недавнего времени делали невозможным клонирование выявленных симбиотических генов. В последние 15 лет активно развивается генетика двух модельных бобовых растений: лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen) и диплоидной люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.) (Stougaard, 2001). Оба вида характеризуются небольшими размерами генома и детально отработанными протоколами трансформации (Barker et al., 1990; Handberg, Stougaard, 1992; Udvardi, 2001). За последние годы для этих модельных бобовых были получены большие коллекции мутантов с использованием химического, Т-ДНК- и инсерционного мутагенеза (Stougaard, 2001; Stacey et al., 2006). Использование геномной синтении и микросинтении позволило перейти от клонирования первого симбиотического гена бобовых растений — гена *Nin* (*Nodule inception*) у лядвенца японского (Schäuser et al., 1999) к клонированию серий ортологичных симбиотических генов как у модельных бобовых, так и у традиционных бобовых культур (Борисов и др., 2011; Oldroyd, Downie, 2004; Stacey et al., 2006; Kouchi et al., 2010).

Использование анализа геномной синтении для клонирования и последующего секвенирования симбиотических генов сельскохозяйственно-важных бобовых культур невозможно без детального генетического анализа коллекций симбиотических мутантов. У гороха на основе 7 различных генотипов различными группами исследователей было индуцировано более 200 независимых мутантов (Borisov et al., 2004). Мутанты данных коллекций были вовлечены в комплементационный анализ, в результате которого было выявлено более 40 генов, вовлеченных в контроль развития азотфиксирующего симбиоза у гороха (Borisov et al., 2004). Важно отметить, что полученные мутанты распределены по группам комплементации неравномерно, имеются как «горячие точки» мутагенеза, так и группы комплементации, представленные только единичными мутациями. Кроме того, для

ряда идентифицированных генов были описаны серии мутаций, полученные только на основе одного определенного исходного генотипа. Вероятно, существует генотипическая специфичность, влияющая на возникновение мутаций в тех или иных симбиотических генах данного генотипа. С другой стороны, большой интерес представляет вопрос об общем количестве генов, вовлеченных в контроль азотфиксирующего симбиоза, которые могут быть выявлены с помощью методов индуцированного мутагенеза. Не смотря на то, что у гороха имеются обширные коллекции симбиотических мутантов, использование различных генотипов пока не дает возможности ответить на эти вопросы. Поэтому проведение дальнейших исследований с применением мутагенеза, направленных на получение новых симбиотических мутантов с использованием ограниченного набора исходных генотипов представляется важной задачей, решение которой позволит выявить общее количество симбиотических генов, а также проверить предположение о существовании генотипической специфичности мутагенеза. В настоящее время программы по мутагенезу не завершены и продолжаются на двух исходных генотипах гороха: Frisson во Франции и SGE в ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. Для обоих генотипов сейчас уже получен большой набор пока еще генетически не охарактеризованных симбиотических мутантов.

Данная статья посвящена описанию новой программы мутагенеза гороха с целью выявления симбиотических мутантов на основе линии SGE, а также генетическому анализу ряда полученных мутантов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал

Для проведения мутагенной обработки была использована лабораторная линия гороха SGE (Kosterin, Rozov, 1993). Она характеризуется средним сроком созревания семян, крупными эффективными клубеньками розового цвета и высокой репродуктивной способностью — до 100 семян с растения.

Методика проведения мутагенеза и отбора мутантов

В качестве мутагена был использован этилметансульфонат. Методика проведения мутагенной обработки была описана нами ранее (Борисов и др., 1994). Для проведения скрининга мутантов семена поколения M_2 были высажены в сосуды с кварцевым песком (8 кг/сосуд) с минеральным питанием без азота (Борисов и др., 1994). Для инокуляции растений клубеньковыми бактериями был использован производственный штамм *Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae* CIAM1026 из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Safropova, Novikova, 1996). Инокуляцию проводи-

ли водной суспензией бактерий при разведении 10^7 – 10^8 клеток на 1 растение.

Поиск мутантов с нарушениями в развитии азотфиксирующих клубеньков проводился на стадии 4-недельных растений по признакам азотного голодания (остановка растений в росте, пожелтение нижних листьев) и при визуальном осмотре корневых систем растений. Отобранные потенциальные мутанты были высажены обратно в субстрат с минеральным питательным раствором, содержащим азот (Борисов и др., 1994) для получения семян M_3 . Также были посажены все родственные растения из семьи, где наблюдалось растение с потенциальной мутацией для получения от них семян M_3 . В дальнейшем эти семена были использованы в качестве материала для повторного поиска мутаций в случаях, если не удавалось получить семена с потенциального мутанта, отобранного при скрининге растений M_2 .

Генетический анализ

Для выяснения генетической детерминации мутантных фенотипов были использованы классические методы гибридологического и комплементационного анализов. При проведении комплементационного анализа Fix^- мутантов в качестве тестерных линий были использованы Fix^- мутанты из коллекции ГНУ ВНИИСХМ (<http://www.arriam.spb.ru/rus/lab9/collections.html>), представляющие все идентифицированные к настоящему времени гены, контролируемые поздние стадии развития клубеньков: *sym13* (*E135f*) (индуцирована на сорте Sparkle) (Kneen et al., 1990), *sym23* (P59), *sym24* (P60), *sym25* (P61), *sym27* (P12) (индуцированы на сорте Frisson) (Sagan et al., 1993), *sym31* (индуцирована на лабораторной линии Sprint-2) (Borisov et al., 1992), *sym33* (SGE Fix^- -2), *sym40* (SGE Fix^- -1) (индуцированы на лабораторной линии SGE) (Tsyganov et al., 1994), *sym32* (RisFixL), *sym41* (RisFixA) и *sym42* (RisFixV) (индуцированы на сорте Finale) (Engvild, 1987). Для проведения тестов на аллелизм каждый выявленный мутант, вовлеченный в комплементационный анализ, был реципрокно скрещен со всеми тестерными линиями. Результаты тестов на аллелизм получали при анализе растений поколения F_1 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение симбиотических мутантов

В ходе скрининга мутантов по симбиотическим признакам было проанализировано 425 семей (2069 растений) поколения M_2 . При визуальном осмотре корневых систем растений было выявлено, что большинство растений формировали крупные розовые клубеньки, характерные для исходной линии SGE. В то же время наблюдались растения с различными отклонениями от фенотипа клубеньков исходной линии. Были выявлены 13 потенциальных мутантов, неспособных формировать клубеньки (фенотип Nod^-) и 2 потенциальных мутанта, формирующих единичные клубеньки

Таблица 1

Характеристика симбиотических мутантов, полученных ЭМС-мутационезом на линии SGE

№	№ семьи в M2	Количество растений в семье M ₂ без аномалий клубеньков	Количество потенциальных мутантов в семье M ₂ , фенотип их клубеньков	Получены ли семена M3	Анализ родственных растений в поколении M ₃	Фенотип клубеньков в M ₃	Название мутантной линии, созданной после селекции сегреганта с мутантным фенотипом из F ₂ от скрещивания мутанта с исходной линией	Ген
1	18	3	1, мелкие розовые	нет	мутация выявлена	утерян	—	—
2	51	10	1, белые	нет	мутация выявлена	утерян	—	—
3	103	3	3, белые с ямкой на кончике	да	—	малочисленные белые с ямкой	SGEFix ⁻ –5	<i>sym33</i>
4	114	4	1, белые	нет	мутация выявлена	утерян	—	—
5	151	4	1, белые	нет	мутация выявлена	утерян	—	—
6	164	3	1, бледно-розовые	нет	мутация не выявлена	—	—	—
7	192	4	1, розово-зеленые	да	—	розово-зеленые	SGEFix ⁻ –9	—
8	205	3	2, розово-зеленые	да	—	многочисленные мелкие белые и 10–15 крупных розовых	—	—
9	211	5	1, розово-зеленые	нет	мутация не выявлена	—	—	—
10	215	2	1, розово-зеленые	да	—	розовые	—	—
11	219	2	2, розово-зеленые	да	—	розовые	—	—
12	237	6	1, белые	да	мутация выявлена	утерян	—	—
13	240	2	1, розово-зеленые	нет	мутация выявлена	утерян	—	—
14	241	7	2, белые	нет	—	розовые	—	—
15	243	10	1, бледно-розовые	нет	мутация не выявлена	—	—	—
16	247	3	1, ярко-зеленые	да	—	утерян	—	—
17	249	18	1, мелкие и крупные белые	да	—	мелкие и крупные белые и бледно-розовые	SGEFix ⁻ –6	<i>sym40</i>
19	252	3	1, ярко-зеленые	да	—	розовые и ярко-зеленые	—	—
19	258	14	1, розово-зеленые	да	мутация не выявлена	утерян	—	—
20	268	4	1, розово-зеленые	да	—	бело-зеленые	SGEFix ⁻ –8	<i>sym25</i>

окончание таблицы на стр. 22

Таблица 1 (окончание)

№	№ семьи в M_2	Количество растений в семье M_2 , без аномалий клубеньков	Количество потенциальных мутантов в семье M_2 , фенотип их клубеньков	Получены ли семена M_3	Анализ родственных растений в поколении M_3	Фенотип клубеньков в M_3	Название мутантной линии, созданной после селекции сегреганта с мутантным фенотипом из F_2 от скрещивания мутанта с исходной линией	Ген
21	275	4	2, розово-зеленые	да	—	утерян	—	—
22	276	9	1, розово-зеленые	да	—	розовые	—	—
23	279	15	3, бело-зеленые	да	—	бело-зеленые	—	—
24	282	14	1, бело-зеленые	нет	мутация выявлена	утерян	—	—
25	305	11	1, розово-зеленые	да	—	розовые	—	—
26	317	12	1, розово-зеленые	да	мутация не выявлена	утерян	—	—
27	330	20	1, несколько белых	да	—	нет клубеньков	SGENod ⁻ —9	—
28	359	6	2, розово-зеленые	да	—	розово-зеленые	—	—
29	385	16	1, розово-зеленые	да	мутация не выявлена	утерян	—	—
30	403	6	2, розово-зеленые	да	—	розово-зеленые	SGEFix ⁻ —7	<i>sym27</i>
31	32	7	1, нет клубеньков	да	—	нет клубеньков	—	—
32	33	5	1, нет клубеньков	нет	—	—	—	—
33	73	1	1, нет клубеньков	нет	—	—	—	—
34	86	5	1 несколько клубеньков	да	—	несколько клубеньков	—	—
35	104	4	1, нет клубеньков	да	мутация выявлена	утерян	—	—
36	148	5	1, нет клубеньков	да	—	нет клубеньков	—	—
37	158	8	1 несколько клубеньков	да	—	несколько клубеньков	—	—
38	183	3	1, нет клубеньков	да	мутация выявлена	утерян	—	—
39	212	4	2, нет клубеньков	да	мутация выявлена	нет клубеньков	—	—
40	290	13	1, нет клубеньков	да	—	нет клубеньков	—	—
41	293	9	1, нет клубеньков	нет	мутация выявлена	нет клубеньков	—	—
42	328	13	2, нет клубеньков	да	—	утерян	—	—
43	341	6	1, нет клубеньков	да	—	утерян	—	—
44	352	8	1, нет клубеньков	да	мутация выявлена	утерян	—	—
45	357	5	1, нет клубеньков	да	мутация выявлена	нет клубеньков	—	—

(фенотип $Nod^{+/-}$) (табл. 1). Кроме того, были обнаружены 30 потенциальных мутантов, формирующих неэффективные клубеньки (фенотип Fix^{-}). Последний класс мутантов был представлен растениями с различными аномалиями в окраске клубеньков (табл. 1). Не от всех выявленных потенциальных мутантов M_2 были получены семена M_3 . Поэтому дальнейший скрининг мутантов, от которых не удалось получить семена M_3 , был продолжен для растений M_3 , полученных от родственными потенциальным мутантам растений.

Большинство выявленных потенциальных мутантов были размножены до поколения M_5 , после чего был проведен повторный анализ фенотипов формируемых на корнях растений клубеньков (табл. 1). Некоторые потенциальные мутанты не подтвердили мутантный фенотип — это линии SGE-215, SGE-219, SGE-241, SGE-276, SGE-305. Для первоначально выделенного по признакам Fix^{-} мутанта SGE-330 позднее был показан фенотип Nod^{-} .

Гибридологический анализ

В гибридологический анализ были вовлечены потомки потенциальных мутантов из семей M_2 — мутантные растения поколения M_3 , показавшие стабильность проявления мутантного фенотипа в ряду 3 поколений.

Для мутанта SGE-330 было показано моногенное наследование и рецессивное проявление признака неспособности к клубенькообразованию (табл. 2).

Для Fix^{-} мутантов SGE-103, SGE-249, SGE-268 и SGE-403 было показано моногенное наследование и рецессивное проявление признака формирования неэффективных симбиотических клубеньков (табл. 3). У мутанта SGE-192 были выявлены 2 мутации в двух не сцепленных симбиотических генах, одна из которых определяет образование уменьшенного количества клубеньков ($Nod^{+/-}$ фенотип), а другая — формирование неэффективных клубеньков (Fix^{-} фенотип) (табл. 4).

При анализе расщепления F_2 от скрещивания мутантов с исходной линией были отобраны сегреганты с проявлением мутантных фенотипов, на основе которых после селекции в ряду пяти поколений были созданы мутантные линии SGENod⁻-9, SGEFix⁻-5 SGEFix⁻-6, SGEFix⁻-7, SGEFix⁻-8 и SGEFix⁻-9 (табл. 1).

Комплементационный анализ

В ходе комплементационного анализа, в который были включены 11 тестерных мутантных линий, было показано, что мутантный фенотип линии SGEFix⁻-5 определяется мутацией в гене *sym33*, линии SGEFix⁻-6 — мутацией в гене *sym40*, линии SGEFix⁻-7 — мутацией в гене *sym27*, линии SGEFix⁻-8 — мутацией в гене *sym25*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной статье дается описание программы химического ЭМС-мутагенеза лабораторной линии гороха

Таблица 2

Анализ расщепления по фенотипу растений поколений F_1 и F_2 от скрещиваний исходной линии SGE и Nod^{-} мутанта гороха.

Скрещивание ($\text{♀} \times \text{♂}$)	F_1	F_2	$\chi^2_{(3:1)}$
	$Nod^{+} : Nod^{-}$	$Nod^{+} : Nod^{-}$	
SGE-330 \times SGE	5 : 0	60 : 21	0,04
SGE \times SGE-330	3 : 0	41 : 13	0,02

Таблица 3

Анализ расщепления по фенотипу растений поколений F_1 и F_2 от скрещиваний исходной линии SGE и Fix^{-} мутантов гороха

Скрещивание ($\text{♀} \times \text{♂}$)	F_1	F_2	$\chi^2_{(3:1)}$
	$Fix^{+} : Fix^{-}$	$Fix^{+} : Fix^{-}$	
SGE \times SGE-103	3 : 0	25 : 7	0,17
SGE-103 \times SGE	4 : 0	54 : 17	0,04
SGE-249 \times SGE	9 : 0	103 : 37	0,15
SGE \times SGE-249	5 : 0	36 : 16	0,92
SGE-268 \times SGE	5 : 0	35 : 10	0,19
SGE \times SGE-268	4 : 0	25 : 6	0,53
SGE-403 \times SGE	7 : 0	45 : 16	0,05
SGE \times SGE-403	3 : 0	26 : 10	0,15

Таблица 4

Анализ расщепления по фенотипу растений поколений F_1 и F_2 от скрещиваний исходной линии SGE и SGEFix⁻-9 мутанта гороха

Скрещивание ($\text{♀} \times \text{♂}$)	F_1	F_2	$\chi^2_{(9:3:3:1)}$
	$Fix^{+} : Fix^{-}$	$Fix^{+} : Fix^{-} : Nod^{+/-} : Nod^{+/-} Fix^{-}$	
$Fix^{-} - 9 \times$ SGE	6 : 0	90 : 39 : 24 : 17	7,694

SGE, направленной на получение новых мутантов по симбиотическим признакам. Ранее линия SGE уже была успешно использована для получения такого рода мутантов (Tsyganov et al., 1994). Метод негативной селекции, в результате которого потенциальные симбиотические мутанты отбираются по признакам азотного голодания, а также извлечение растений из субстрата для визуального осмотра их корневых систем, приводят к снижению жизнеспособности отобранных мутантов и снижению вероятности получения от них семян поколения M_3 . Высокая урожайность линии SGE (Kosterin, Rozov et al., 1993) позволяет уменьшать негативные последствия используемой системы скрининга. Действительно, семена M_3 были получены нами от 71,7 % отобранных потенциальных мутантов. Следует отметить, что в данном исследо-

вании наблюдалась очень высокая частота возникновения потенциальных симбиотических мутантов — 2,17 % (45 мутантов на 2069 проанализированных растений M_2). Эта частота превышает величины, описанные в ходе проведения других программ по мутагенезу гороха (Borisov et al., 1992; Duc, Messenger, 1989; Engvild, 1987; Jacobsen, 1984; Kneen, LaRue, 1988; Sagan, Duc, 1996; Tsyganov et al., 1994). В то же время следует отметить, что не все потенциальные мутанты подтвердили стабильность проявления мутантного фенотипа в ряду поколений, что может объясняться, прежде всего, сложностью проявления симбиотических признаков, зависящих от взаимодействия генотипов макро- и микросимбионтов, а также сильного влияния окружающей среды на проявление данных признаков. Аналогичная картина наблюдалась и при анализе большой коллекции мутантов, индуцированных на основе сорта Finale (Engvild, 1987), при детальном анализе которой не для всех мутантов были подтверждены мутантные фенотипы (Novák, 2003).

В данном исследовании были выявлены мутанты по всем основным фенотипическим классам, известным для симбиотических мутантов (Sagan et al., 1994): Nod^- , $Nod^{+/-}$, Fix^- . Не были получены только мутанты, формирующие повышенное, по сравнению с исходной линией, количество клубеньков, так называемые суперклубенькообразующие мутанты (Nod^{++}) (табл. 1).

Гибридологический анализ линии SGE-192 показал, что данный мутант несет мутации в двух несцепленных симбиотических генах, один из которых определяет образование уменьшенного количества клубеньков ($Nod^{+/-}$ фенотип), а другой — формирование неэффективных клубеньков (Fix^- фенотип) в ответ на инокуляцию клубеньковыми бактериями. Ранее в литературе были описаны случаи возникновения в геноме после экспериментального ЭМС-мутагена мутаций в двух различных симбиотических генах. Так, гибридологический анализ мутанта гороха E135F (*sym13*), характеризующегося Fix^- фенотипом, показал, что растения данной линии несут в гетерозиготе рецессивную мутацию в другом гене — *sym14*, определяющую Nod^- фенотип (Kneen et al., 1990). После экспериментального ЭМС-мутагена растений *Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen была получена линия LjEMS40, которая несла мутации в двух несцепленных генах: *Ljsym22* и *Ljsym34*. Установлено, что обе мутации характеризуются рецессивным проявлением. Мутация в гене *Ljsym22*, определяет Nod^- фенотип, а мутация в гене *Ljsym34* — формирование клубеньков, количество которых в несколько раз превышает число клубеньков у растений «дикого типа» (Nod^{++} фенотип) (Szczyglowski et al., 1998). Таким образом, методом индуцированного ЭМС-мутагена могут быть получены в одном геноме мутации в нескольких не сцепленных симбиотических генах, контролирующих различные стадии симбиотических взаимоотношений.

Большая часть мутантов, полученных в данном исследовании, была распределена по 4 группам комплементации. Ранее по гену *sym33* были описаны 2 мутации: у мутанта SGE Fix^- -2 (Tsyganov et al., 1998), индуцированная с использованием линии SGE, а также у мутанта RisFixU, полученная на сорте Finale (Engvild, 1987; Borisov et al., 2004). Для гена *sym40* ранее была известна лишь одна уникальная мутация у мутанта SGE Fix^- -1 (Tsyganov et al., 1998), полученная на основе линии SGE. Для гена *sym27* известны 2 мутации: у мутанта P12, индуцированная на сорте Frisson (Duc, Messenger, 1989; Borisov et al., 2004), и у мутанта RisFixQ, полученная на основе сорта Finale (Engvild, 1987; Borisov et al., 2004). Ранее были описаны 4 мутанта по гену *sym25*, все они были индуцированы на сорте Frisson (Duc, Messenger, 1989; Borisov et al., 2004).

Таким образом, нами были выявлены новые мутации в поздних симбиотических генах *sym25*, *sym27*, *sym33* и *sym40*. Данные мутации представляют большой интерес для решения вопроса о возможной генотипической специфичности мутагена. К настоящему времени программы по мутагенезу гороха были проведены с использованием 7 генотипов (Borisov et al., 2004). При анализе распределения полученных с их использованием мутаций по группам комплементации становится ясным, что часть групп комплементации представлена единичными, уникальными мутациями, выявленными лишь у одного генотипа. Также были выявлены группы комплементации, например *sym5*, *sym29*, *sym34*, представленные сериями независимых мутаций, но индуцированные лишь на одном генотипе (Borisov et al., 2004). В эту же группу попадали и мутации по гену *sym25*, однако в ходе данной работы была выявлена мутация в этом же гене, индуцированная на линии SGE. Поэтому представляется целесообразным проведение дальнейшего поиска новых симбиотических мутаций с использованием определенных генотипов (наиболее перспективными являются SGE и Frisson, для которых проведение мутационных программ продолжается в настоящее время) и вовлечение полученных новых мутантов в комплементационный анализ. Это позволит получить более представительные коллекции мутантов с использованием одного конкретного генотипа, что, в свою очередь, даст возможность ответить на вопрос о возможной генотипической специфичности мутагена в отношении симбиотических генов гороха.

В ходе данной работы проанализированные мутанты были отнесены к ранее описанным группам комплементации, при этом не было выявлено ранее не идентифицированных симбиотических генов гороха. Данный факт свидетельствует, по-видимому, о близости решения задачи — выявления полного круга симбиотических генов гороха, выявляемых методами экспериментального мутагена. Таких генов, на сегодняшний день, обнаружено чуть более 40 (Borisov et al., 2004).

В то же время следует отметить, что в ходе детального и близкого к завершению комплементационного анализа коллекции симбиотических мутантов, индуцированных на сорте Finale (Engvild, 1987), проводимого в 3 различных лабораториях, было выявлено 9 ранее неидентифицированных генов гороха (Borisov et al., 2004; Tsyganov et al., 2001; Novák, 2003). Генетический анализ коллекции мутантов, описываемой в данной статье, также еще не завершен, поэтому не исключено, что неописанные ранее симбиотические гены гороха еще будут обнаружены в ходе дальнейших исследований.

Благодарности

Авторы благодарны Л. Е. Дворяниновой за прекрасное техническое обслуживание экспериментов.

Данная работа была финансово поддержана ОНТП Россельхозакадемии, Министерством образования и науки (государственный контракт № 16.552.11.7047) и грантом Президента России (НШ–3440.2010.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов А. Ю., Розов С. М., Цыганов В. Е. и др., 1994. Выявление симбиотических генов гороха (*Pisum sativum* L.) с использованием экспериментального мутагенеза // Генетика. Т 30. С. 1484–1494.
2. Борисов А. Ю., Штарк О. Ю., Жуков А. В. и др., 2011. Взаимодействие бобовых с полезными почвенными микроорганизмами: от генов растений к сортам // С/х биология. № 3. С. 41–47.
3. Борисов А. Ю., Проворов Н. А., Тихонович И. А., Цыганов В. Е., 1998. Генетический контроль взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями // Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под ред. Тихоновича И. А. и Проворова Н. А. Санкт-Петербург: Наука. С. 8–62.
4. Barker D., Bianchi S., Blondon F. et al., 1990. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*–legume symbiosis // Plant. Mol. Biol. Rep. Vol. 8 P. 40–49.
5. Bhatia C. R., Nichterlein K., Maluszynski M., 2001. Mutations affecting nodulation in grain legumes and their potential in sustainable cropping system // Euphytica. Vol. 120. P. 415–432.
6. Borisov A. Y., Morzhina E. V., Kulikova O. A. et al., 1992. New symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) affecting either nodule initiation or symbiosome development // Symbiosis. Vol. 14. P. 297–313.
7. Borisov A. Y., Danilova T. N., Koroleva T. A. et al., 2004. Pea (*Pisum sativum* L.) regulatory genes controlling development of nitrogen–fixing nodule and arbuscular mycorrhiza: fundamentals and application *Biologia*. Vol. 59/Suppl. P. 137–144.
8. Duc G., Messenger A., 1989. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation // Plant Sci. Vol. 60. P. 207–213.
9. Engvild K. J., 1987. Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea (*Pisum sativum*) // Theor. Appl. Genet. Vol. 74. P. 711–713.
10. Handberg K., Stougaard J., 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics // Plant J. Vol. 2. P. 487–496.
11. Jacobsen E., 1984. Modification of symbiotic interaction of pea (*Pisum sativum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* by induced mutations // Plant Soil. Vol. 82. P. 427–438.
12. Kneen B. E., LaRue T. A., 1988. Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweetclover (*Melilotus alba annua*) // Plant Sci. Vol. 58. P. 177–182.
13. Kneen B. E., LaRue T. A., Hirsch A. M., et al., 1990. *sym-13* — A gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum*. // Plant Physiol. Vol. 94. P. 899–905.
14. Kosterin O. E., Rozov S. M., 1993. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I // Pisum Genet. Vol. 25. P. 27–31.
15. Kouchi H., Imaizumi–Anraku H., Hayashi M., et al., 2010. How many peas in pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground // Plant Cell Physiol. Vol. 51. P. 1381–1397.
16. Novák K., 2003. Allelic relationships of pea nodulation mutants // J. Hered. Vol. 94. P. 191–193.
17. Oldroyd G. E. D., Downie J. A., 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes // Mol. Cell Biol. Vol. 5. P. 566–576.
18. Safronova V. I., Novikova N. I., 1996. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen freezing // J. Microbiol. Methods. Vol. 24. P. 231–237.
19. Sagan M., Duc G., 1996. *Sym28* and *Sym29*, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum* L.) // Symbiosis. Vol. 20. P. 229–245.
20. Sagan M., Huguet T., Barker D., Duc G., 1993. Characterization of two classes of non-fixing mutants of pea (*Pisum sativum* L.) // Plant Sci. Vol. 95. P. 55–66.
21. Sagan M., Huguet T., Duc G., 1994. Phenotypic characterization and classification of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.). Plant Sci. Vol. 100. P. 59–70.
22. Schauser L., Roussis A., Stiller J., Stougaard J., 1999. A plant regulator controlling development

- of symbiotic root nodules // *Nature*. Vol. 402. P. 191–195.
23. *Stacey G., Libault M., Brechenmacher L. et al.*, 2006. Genetics and functional genomics of legume nodulation // *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 9. P. 110–121.
24. *Stougaard J.*, 2001. Genetics and genomics of root symbiosis // *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 4. P. 328–335.
25. *Szczyglowski K., Shaw R. S., Wopereis J. et al.*, 1998. Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus* // *Mol. Plant–Microbe Interact.* Vol. 11. P. 684–697.
26. *Tsyganov V. E., Borisov A. Y., Rozov S. M., Tikhonovich I. A.*, 1994. New symbiotic mutants of pea obtained after mutagenesis of laboratory line SGE // *Pisum Genetics*. Vol. 26. P. 36–37.
27. *Tsyganov V. E., Morzhina E. V., Stefanov S. Y., et al.*, 1998. New pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Mol. Gen. Genet.* Vol. 256. P. 491–503.
28. *Tsyganov, V. E., Borisov A. Y., Tikhonovich I. A.*, 2001. Fix⁻ mutants RisFixA and RisFixV carry mutations in newly identified pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym41* and *sym42*, respectively // *Pisum Genet.* Vol. 33. P. 36.
29. *Udvardi M. K.*, 2001. Legume models strut their stuff // *Mol. Plant–Microbe Inter.* Vol. 14. P. 6–9.

NOVEL SERIES OS PEA SYMBIOTIC MUTANTS INDUCED IN THE SGE LINE

Tsyganov V. E., Voroshilova V. A., Rozov S. M., Borisov A. Yu., Tikhonovich I. A.

✿ **SUMMARY:** Using ethylmethansulphonate the chemical mutagenesis of the pea laboratory line SGE was performed. During analysis of 425 families (2069 plants) of M₂ progeny 45 putative mutants were selected, among them 30 mutants forming ineffective nodules (Fix⁻ phenotype), 13 mutants unable to form nodules (Nod⁻ phenotype), and 2 mutants forming a few nodules (Nod^{+/-} phenotype). For 1 Nod⁻ and 5 Fix⁻ mutants monogenic inheritance and recessive phenotype manifestation were demonstrated. For Fix⁻ mutant SGEFix⁻–9 an additional mutation leading to Nod^{+/-} phenotype was shown. Complementation analysis showed that the mutant phenotype of the SGEFix⁻–5 line is caused by a mutation in the *sym33* gene, of the SGEFix⁻–6 line in the *sym40* gene, of the SGEFix⁻–7 line in the *sym27* gene, and of the SGEFix⁻–8 line in the *sym25* gene.

✿ **KEY WORDS:** chemical mutagenesis; symbiotic mutants; symbiotic genes; nodulation; *Pisum sativum* L.

✿ Информация об авторах

Цыганов Виктор Евгеньевич — зав. лабораторией молекулярной и клеточной биологии, к. б. н. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3.
E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru

Ворошилова Вера Александровна — специалист по клиническим исследованиям, к. б. н. ООО «Пи Эс Ай». 191119, Санкт-Петербург, ул. Достоевского д. 19/21.
E-mail: vera.voroshilova@psi-cro.com

Розов Сергей Михайлович — с. н. с., к. б. н. Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, лаборатория бионинженерии растений. 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10.
E-mail: rozov@bionet.nsc.ru

Борисов Алексей Юрьевич — зав. лабораторией, д. б. н. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3.
E-mail: ayborisov@yandex.ru

Тихонович Игорь Анатольевич — директор, профессор, д. б. н., академик Россельхозакадемии. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3.
E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru

Tsyganov Viktor Evgenyevich — Head of the laboratory. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS, Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru

Voroshilova Vera Aleksandrovna — Expert in clinical trials. Contract Drug Development Company "PSI". Dostoevsky street 19/21, Saint-Petersburg, 191119, Russia.
E-mail: vera.voroshilova@psi-cro.com

Rozov Sergei Mikhailovich — Senior Scientist. Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Division of RAS. Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian department, Laboratory of Plant Bioengineering. Lavrentjev avenue, 10, Novosibirsk, 630090, Russia.
E-mail: rozov@bionet.nsc.ru

Borisov Aleksei Yurievich — Head of the Laboratory. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: ayborisov@yandex.ru

Tikhonovich Igor Anatolievich — Director, Professor, Full Member of RAAS. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru