

УДК 581.14+576.6+58.071

РАЗВИТИЕ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ У СИЛЬНО МИКОТРОФНОГО РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА – ЛЮЦЕРНЫ ХМЕЛЕВИДНОЙ (*MEDICAGO LUPULINA* L.)

© 2015 г. А. П. Юрков^{1,2,3}, Л. М. Якоби¹, Н. Е. Гапеева¹, Г. В. Степанова⁴, М. Ф. Шишова⁵

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии
196608 Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3

²Университет ИТМО

191002 Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, д. 9

³Российский государственный гидрометеорологический университет

195196 Санкт-Петербург, Малоохтинский пр., д. 98

⁴Всероссийский научно-исследовательский институт кормов им. В.Р. Вильямса

141055 Московская обл., Лобня, ул. Научный Городок, корп. 1

⁵Санкт-Петербургский государственный университет

199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

E-mail: yurkovandrey@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.11.2014 г.

Окончательный вариант получен 26.02.2015 г.

Показаны основные этапы развития арбускулярной микоризы (АМ) люцерны хмелевидной *Medicago lupulina* с грибом *Glomus intraradices*. Исследование проведено методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Начало микоризации зафиксировано на 7-е сутки развития растения. Дальнейшее развитие приводит к формированию *арум* типа АМ. Корни люцерны на 88-е сутки от высадки проростков (в фазу плодоношения) характеризуются развитием мощного мицелия, сопоставимого по толщине с сосудами центрального цилиндра, развитием арбускул, а также развитием везикул до фазы внутрикорневых спор. Мицелий, арбускулы и везикулы формируются в непосредственной близости от зоны деления кончика корня, что может свидетельствовать об активном развитии гриба в корнях растения. В корне люцерны идентифицированы все фазы развития и размножения гриба, включая внутрикорневые споры (в межклетниках коры корня), что указывает на активное использование микосимбиотом питательных субстратов растения-хозяина. Описано присутствие (развитие) растительной цитоплазмы вокруг молодых ветвей арбускул, не характерное для внутрикорневых гиф гриба. Наличие активного симбиоза подтверждается усилением накопления фосфора в тканях *M. lupulina* при наличии микобионта (*G. intraradices*) в условиях низкого уровня фосфора в почве. В связи с этим данную сортопопуляцию люцерны хмелевидной можно характеризовать как экологически облигатно микотрофное растение в условиях низкого уровня доступного фосфора в почве. Выявлены особенности развития АМ у сильно микотрофной люцерны хмелевидной, начиная с фазы первого настоящего листа и завершая фазой плодоношения растения-хозяина. Полученная растительно-микробная система является перспективным модельным объектом для дальнейших ультрацитологических и молекулярно-генетических исследований механизмов, контролируемых симбиотическую эффективность арбускулярной микоризы, включая выделение и анализ новых симбиотических растительных мутантов.

Ключевые слова: арбускулярная микориза, *Medicago lupulina*, люцерна хмелевидная, *Glomus intraradices*, гриб арбускулярной микоризы, симбиотические структуры, арбускулы, везикулы, споры, световая микроскопия, электронная микроскопия.

DOI: 10.7868/S0475145015050109

ВВЕДЕНИЕ

Арбускулярная микориза (АМ) является наиболее распространенным растительно-микроб-

ным симбиозом. В ее образовании участвуют грибы отдела Glomeromycota (Schüßler et al., 2001; Finlay, 2008) и 80% видов или 92% семейств наземных растений (Wang, Qiu, 2006; Смит, Рид, 2012). Исследование структур АМ – ее морфологии было начато в 1842 г (Nägeli, 1842). Первые крупные обзоры о растениях, образующих АМ, с подроб-

Принятые сокращения: АМ – арбускулярная микориза, АМ-гриб – гриб арбускулярной микоризы, Рд – доступный для питания растений фосфор, сут – сутки.

ными анатомическими описаниями были опубликованы в 1889 г. (Schlicht, 1889). В них отмечены основные морфологические проявления взаимодействия между растением-хозяином и грибом. В 1897 г. было дано определение внутрикорневых (интраматрикальных) вздутий — “везикул” (Janse, 1897) и установлено, что другие структуры, названные позднее “арбускулами” (Gallaud, 1905), локализованы во внутренней части коры корня.

И.А. Селивановым в 1960-е годы основана научная школа по изучению микосимбиотрофии и других форм консортивных отношений в растительном покрове различных ландшафтно-географических зон Советского Союза. АМ (везикулярно-арбускулярная микориза) описывается И.А. Селивановым, как фикомицетная тамнискофаговая эндомикориза, а арбускулы — как один из типов гаусторий. Под понятием “тамнискофагия” понимается процесс деградации арбускул, в результате которого они распадаются на фрагменты с образованием “зернистой массы”, которая лизируется — переваривается растением (Селиванов, 1975).

Современные исследования показывают, что ряд видов растений образуют *нарис* тип АМ, при котором вместо арбускул (*арум* тип АМ) формируются кольца гиф в клетках растения-хозяина. Известен и промежуточный тип АМ (Dickson, 2004). Становление и развитие АМ обычно делят на 5 основных фенотипических этапов: 1) преинфекционное развитие — *Pid* (“*preinfection development*”); 2) формирование апрессориев — *Apf* (“*apressoria formation*”); 3) проникновение гриба в кортекс корня — *Pen* (“*penetration*”); 4) дифференцировка арбускул для *арум* типа АМ — *Ard* (“*arbuscule differentiation*”), либо развитие внутриклеточных колец гиф гриба для *нарис* типа — *Icd* (“*intracellular coils development*”); 5) стабилизация микобионта — *Мур* (“*mycobiont persistence*”), включающая развитие арбускул, везикул и внутри/внекорневого мицелия (Marsh, Schultze, 2001; Koide, Mosse, 2004). Было показано, что в большинстве растений, микоризируемых грибами, АМ представлена арбускулами и везикулами, реже (на порядок) образуются только везикулы. В некоторых случаях формируются везикулы и кольца гиф гриба, например, у скабиозы вида *Scabiosa ochroleuca* L. (Pawlowska et al., 1996) и люцерны вида *Medicago sativa* L. (Boyetchko, Tewari, 1990). Выявлены основные гены, контролирующие стадии развития АМ (Duc et al., 1989; Klingner et al., 1995; Larkan et al., 2007; Morandi et al., 2009). И.А. Тихоновичем в 1990-е годы организована научная школа по изучению молекулярно-генетических основ формирования и функционирования взаимовыгодных растительно-микробных систем с применением модельных бобовых растений (Tsyganov et al., 1994; Jacobi et al., 2003; Borisov et al., 2004; Тихонович, Проворов, 2009). Но, несмотря на большое количество данных, посвященных анализу разнообразия струк-

тур АМ, механизмы инициации ее формирования, а также способы регуляции эффективности данного типа симбиотических отношений во многом еще остаются неясными. Особенно редкими являются исследования, нацеленные на сравнительный анализ развития АМ в ходе онтогенеза растения-хозяина.

Кроме того, для исследования механизмов, контролирующих симбиотическую эффективность АМ, используются в основном мутанты, характеризующиеся дефектами в формировании различных стадий развития АМ. На таких модельных растениях в настоящее время активно исследуется общий сигналинг ризобияльного и микоризного симбиоза (Horvath et al., 2011). Однако для эффективного исследования основных механизмов эффективности АМ, на наш взгляд, целесообразно использовать модельные системы, включающие высокоэффективный АМ-гриб и сильно микотрофное в оптимальных для развития АМ условиях растение. Оптимальными условиями для развития АМ, как известно, является низкий уровень доступного для питания растением фосфора (Рд) в почве (Смит, Рид, 2012). Именно в этих условиях максимально проявляется основное действие микобионта на растение-хозяина — усиление фосфорного питания за счет симбиотрофного и/или автотрофного его поступления. Проведенные нами ранее исследования позволили отобрать необходимое модельное растение — люцерну хмелевидную (Юрков и др., 2007). На данном растении получены мутанты, с применением которых проводятся исследования механизмов, контролирующих симбиотическую эффективность арбускулярной микоризы (Юрков, Якоби, 2011).

В связи с вышеперечисленным целью настоящего исследования заключается в анализе развития АМ на разных стадиях развития сильно микотрофного в условиях низкого уровня фосфора в почве растения-хозяина — сортопопуляции ВИК32 люцерны хмелевидной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L. var. *vulgaris* Koch, однолетняя) — один из наиболее широко распространенных видов рода *Medicago* (подрод *Lupularia* (Ser.) Grossh., сем. Leguminosae Endl.). Диплоид ($2n = 16$), самоопылитель, размер генома ~500 Мб, семенная продуктивность до 500 семян с растения и более при выращивании в теплице для размножения. Для настоящего исследования использовали сортопопуляцию ВИК32 люцерны хмелевидной — линия MIS-1. Растения этой линии демонстрируют признаки карликовости в отсутствие инокуляции АМ-грибом и условиях низкого уровня доступного фосфора в почве

(Рд). Для инокуляции использован штамм арбускулярного микоризного гриба (АМ-гриба) *Glomus intraradices* Shenck & Smith — изолят RCAM00320 (по ранее принятой классификации — CIAM8) из коллекции лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных микроорганизмов ВНИИСХМ. Данный штамм представляет собой высокоэффективный штамм АМ-гриба (Якоби и др., 2000; Юрков и др., 2008) и, являясь облигатным симбионтом, поддерживается в лабораторных условиях на плектрантусе (*Plectranthus australis* L.) согласно методическим разработкам С. Джанинаzzi с соавт. (Gianinazzi et al., 2002).

Микровегетационный метод

В работе применен метод вегетационного эксперимента, обеспечивающий оптимальные условия для развития АМ и позволяющий избежать спонтанного заражения ризобиями и иными симбиотическими микроорганизмами (Юрков и др., 2007). Субстрат для выращивания — воздушно-сухую почвенно-песчаную смесь в соотношении 2 : 1 автоклавировали при 134°C, 2 атм. в течение 1 ч, повторно через 2 сут (токсичность после обработки не возникает). Растения выращивали в стерилизованном ультрафиолетом световом боксе с неактивной вентиляцией. Режим смены дня и ночи: 18 и 6 ч, соответственно. Температура воздуха 24–26°C, световой поток ~1400 лм. Агрехимическая характеристика почвы представлена в работе А.П. Юркова с соавт. (Юрков и др., 2007).

Световая микроскопия

При микроскопическом анализе развития АМ использован метод мацерации и окрашивания образцов корней, разработанный Дж.М. Филипс и Д.С. Хейман для оценки АМ-инфекции в корнях бобовых растений (Phillips, Hayman, 1970), включающий окрашивание трипановым синим в растворе, содержащем 10%-й раствор молочной кислоты, глицерин, дистиллированную воду и краситель “трипановый синий” в соотношении 62 мл : 62 мл : 875 мл : 0.3 г, соответственно. Известны и другие способы окрашивания: хлоразолом Е, кислым фуксином и чернилами (Utobo et al., 2011). Наименее дорогой и наиболее безопасный способ — окраска чернилами (Сао et al., 2013). Именно этот метод может в ближайшем будущем стать основным способом окраски при проведении потоковой оценки микоризации, особенно для значительного количества полевых образцов; по данным Е.Б. Ютобо уже сегодня такие анализы проводят более 1000 микробиологов из 77 стран мира (Utobo et al., 2011). Однако в качестве красителя нами был выбран трипановый синий в связи с тем, что достигаемый контраст симбиотических структур, избирательность

окраски грибных структур против растительных тканей у трипанового синего выше для *G. intraradices* в корнях *M. lupulina* по сравнению с окрашиванием чернилами.

При оценке основных количественных и качественных характеристик АМ применен метод световой микроскопии (Trouvelot et al., 1986) и разработанная А.П. Юрковым компьютерная программа “Mycorrhiza”, представляющая в интерактивном режиме оценочные значения показателей микоризации и расчетное число полей зрения для достижения заданного уровня точности (уровень значимости для классов плотности микоризы составляет 5%). Пробоподготовку проводили на стереомикроскопе Stemi 2000 (Zeiss, Germany). Для микроскопического анализа структур АМ в давленом препарате — окрашенных, промацерированных и порезанных (длиной в 1 см) корней люцерны использован микроскоп исследовательский проходящего света “Микмед-2” вар. 2 (ЛОМО, Россия; характеристики: окуляр ×10, объектив ×10, передняя линза во фланце бинокулярной насадки ×1.0). Расчетная протяженность 1 поля зрения “Микмед-2” составляет 1.69 мм. На ключевые сроки развития АМ и растений определены основные показатели микоризации, включая встречаемость АМ и интенсивность микоризации, обилие арбускул и везикул. Минимальная биологическая повторность в каждом из исследованных вариантов составила 12 растений. Достоверность различий между вариантами оценивали по *t*-критерию Стьюдента при $P < 0.05$. Фотографии получены с применением камеры Canon 5D Mark II, установленной на инвертированном микроскопе Axiovert 35 (Zeiss, Germany; характеристики: рабочее поле зрения 1.97 мм при окуляре ×10 и объективе ×10).

Трансмиссионная электронная микроскопия

Для микроскопии ультратонких срезов микоризованных корней люцерны использована методика, примененная Л.М. Якоби с соавт. (Jacobi et al., 2003). Образцы — 1 см фрагменты корней, тщательно отмытые водой, фиксировали в течение 3 ч в 2.5%-м глутаральдегиде на 0.1 М натрий-какодилатном буфере (pH = 7.2). После трехкратной промывки по 20 мин в том же буфере, образцы подвергали пост-фиксации в течение 3 ч в 1%-м тетроксиде осмия на том же буфере. После новой промывки следует обезвоживание образцов в этиловых спиртах возрастающей концентрации с контрастированием в 2%-м уранил-ацетате на 70%-м спирте. Далее проводили дробную проводку образцов в смеси ацетона и смол с последующей заливкой образцов в эпон-аралдитную смесь. Ультратонкие срезы толщиной 70 нм, приготовленные с использованием ультратома EM UC7, и уложенные на медные сеточки (200 mesh), были контрастированы в течение 15 мин в 2%-м вод-



Рис. 1. Люцерна хмелевидная, выращенная на почве с низким уровнем Рд с инокуляцией (справа) и без инокуляции (слева) грибом *G. intraradices* на 70 сут от высадки проростков.

ном растворе уранилацетата при комнатной температуре, а затем после аккуратной промывки дистиллированной водой образцы импрегнировали в течение 30 мин в цитрате свинца по Э.С. Рейнольдсу при комнатной температуре (Reynolds, 1963). Трансмиссионная микроскопия проведена с применением электронного микроскопа Jeol JEM-2100НС при 120 кВ (РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” СПбГУ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние микорризации на рост сильно микотрофного растения

В настоящем исследовании проведен анализ становления и развития АМ у растений люцерны

хмелевидной, а также анализ изменения симбиотической эффективности взаимодействия фито- и микобионтов в процессе онтогенеза симбиосистемы. В качестве объекта использована сильно микотрофная люцерна, растения которой без микорризы способны формировать жизнеспособные семена, но имеют признаки карликовости (отсутствие бокового ветвления, мелкая и более темно-зеленая листовая пластинка, укороченный стебель, слаборазвитая корневая система) при низком уровне доступного для питания растений фосфора в почве (рис. 1). Развитие микорризованных растений в тех же условиях фосфорного питания не имело отклонений, что свидетельствует о значительной симбиотической эффективности АМ и быстром отклике на микорризацию в симбиосистеме “*M. lupulina* + *G. intraradices*” (табл. 1). Одним из первичных механизмов высокой отзывчивости люцерны, показанной в наших экспериментах, может быть адаптация растений к низкому уровню фосфора в почве за счет активации грибом АМ секреции фосфатаз растения-хозяина (Ezawa et al., 2005). В качестве вторичного механизма можно рассматривать гидролиз внекорневыми гифами АМ-грибов почвенного органического фосфора (Koide, Kabir, 2000), который затем посредством фосфорных транспортеров поступает в корни растения-хозяина (Karandashov, Bucher, 2005). В связи с этим нами проведена оценка изменений в накоплении биомассы целых растений, а также содержания фосфора в частях растений люцерны (табл. 1 и 2).

Из полученных данных видно, что отклик наблюдался уже на 7-е сут от высадки проростков, но к 14-м сут он нивелировался, по-видимому, вследствие оттока питательных веществ из корня микорризованного растения в надземную его часть. Об этом свидетельствует тот факт, что к этому сроку наблюдалось полное развитие первого настоящего листа, а вес корней (воздушно-сухая масса корней) на 14-е сут был существенно ниже при микорризации растений в сравнении с таковым в контрольном варианте без инокуляции (табл. 1). Затем, уже на 21-е сут зафиксирован достоверный ($P < 0.05$) отклик на микорризацию по весу как надземных частей, так и корней. Кроме того, с 21 сут четко проявляется роль микорризации в ускорении развития растения (рис. 2). Значительное усиление интенсивности роста растений при микорризации ранее было показано не только для бобовых культур, но и для многих других растений, например, пшеницы (Юрков и др., 2012), бамбука (Jiang et al., 2013) и т.д. Однако наряду с этим в ряде исследований установлено, что при неблагоприятных условиях гриб *G. intraradices* способен оказывать обратное действие — подавлять рост растений некоторых видов, как было показано на пшенице (*Triticum aestivum*) (Li et al., 2008).

Таблица 1. Средний сухой вес растений сильно микотрофной люцерны хмелевидной, инокулированных (+АМ) и неинокулированных (–АМ) грибом *G. intraradices*

Срок, сут от посадки	Вес корней растения, мг		Вес надз. частей растения, мг		Вес целого растения, мг	
	–АМ	+АМ	–АМ	+АМ	–АМ	+АМ
1	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.64 ± 0.02	0.64 ± 0.02	0.89 ± 0.02	0.89 ± 0.02
7	0.58 ± 0.04	0.87 ± 0.08	1.22 ± 0.06	1.65 ± 0.11	1.79 ± 0.07	2.53 ± 0.13
14	1.73 ± 0.03	1.29 ± 0.02	3.31 ± 0.02	3.32 ± 0.02	5.04 ± 0.09	4.61 ± 0.07
21	3.01 ± 0.06	2.85 ± 0.06	6.47 ± 0.08	10.39 ± 0.13	9.48 ± 0.23	13.24 ± 0.32
28	3.54 ± 0.09	7.32 ± 0.20	8.71 ± 0.12	25.86 ± 0.48	12.26 ± 0.37	33.18 ± 1.02
35	5.03 ± 0.11	13.42 ± 0.37	12.59 ± 0.24	60.24 ± 0.97	17.61 ± 0.53	73.65 ± 2.14
49	9.34 ± 0.30	23.16 ± 0.46	35.94 ± 0.75	134.57 ± 4.05	45.28 ± 1.72	157.73 ± 5.67

Примечание. “Вес” – воздушно-сухая биомасса.

Таблица 2. Содержание фосфора в тканях растений сильно микотрофной люцерны хмелевидной, инокулированных (+АМ) и неинокулированных (–АМ) грибом *G. intraradices*

Срок, сут от посадки	Содержание фосфора (P ₂ O ₅), %					
	в сухой массе корней		в сухой массе надз. частей		в сухой массе растения	
	–АМ	+АМ	–АМ	+АМ	–АМ	+АМ
1	2.76 ± 0.003	2.76 ± 0.003	2.76 ± 0.005	2.76 ± 0.005	2.76 ± 0.006	2.76 ± 0.006
7	2.04 ± 0.007	2.08 ± 0.009	2.19 ± 0.003	2.23 ± 0.014	2.14 ± 0.008	2.18 ± 0.017
14	0.788 ± 0.006	1.671 ± 0.031	0.301 ± 0.001	0.686 ± 0.004	0.468 ± 0.006	0.961 ± 0.032
28	0.585 ± 0.026	1.674 ± 0.071	0.254 ± 0.003	0.729 ± 0.006	0.350 ± 0.027	0.937 ± 0.072
49	0.499 ± 0.035	1.441 ± 0.014	0.198 ± 0.012	0.802 ± 0.003	0.260 ± 0.037	0.896 ± 0.014

Анализ накопления фосфора в тканях растений люцерны показал существенное влияние микоризации на этот показатель уже на этапе становления АМ (табл. 2). Показано, что отклик по содержанию фосфора наблюдался уже в фазу 1-го настоящего листа (на 14 сут) в отличие от веса растения, что подтверждается статистически достоверной симбиотической эффективностью рассчитанной для данного срока (табл. 3). Последняя представляет собой разницу (прибавку) показателя продуктивности в варианте с инокуляцией (+АМ) и в варианте без инокуляции (“–АМ”, контроль), отнесенная к варианту “–АМ” и выраженная в процентах. Таким образом, накопление массы надземных частей люцерны начинается сразу после становления АМ, когда симбиотрофное поступление фосфора в растение начинает преобладать над собственным питанием растения-хозяина.

Фосфор, поступивший в растение, имеет огромное физиологическое значение в связи с активным участием в регуляции энергетического статуса растительной клетки, в том числе посредством лидирующей роли фосфатов в регуляции углеводного обмена клетки. Общеизвестны данные о том, что концентрация фосфатов в цитоплазме является основным регуляторным звеном

интенсивности оттока ассимилятов из хлоропластов, а, следовательно, поддержания интенсивности работы фотосинтетического аппарата клетки (Медведев, 2004).

Полученные нами результаты (табл. 3) свидетельствуют о значительной симбиотической эффективности взаимодействия люцерны с АМ-грибом *G. intraradices* в ходе всего развития растений люцерны. Эффективность была максимальной (+274.4%) для надземных частей в фазу плодоношения (на 49 сут), на этот же поздний срок была наибольшей и симбиотическая эффективность, рассчитанная по содержанию фосфора в надземных частях растений люцерны (+304.3%).

Данные по симбиотической эффективности наряду с данными о карликовом росте растений люцерны без АМ (рис. 1) позволяют заключить, что исследуемая люцерна хмелевидная действительно является сильно микотрофным растением – экологически облигатным микотрофом в условиях низкого уровня фосфора в почве. Отметим, что для иных растений, не являющихся облигатными микотрофными, отклик на микоризацию обычно проявляется существенно позднее. Например, для ежевики (*Rubus fruticosus*) показано, что отклик по содержанию фосфора в растении реги-

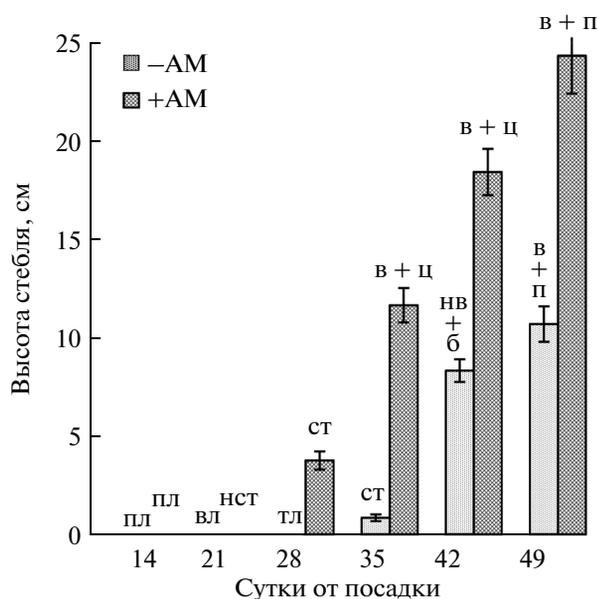


Рис. 2. Высота стебля и фаза развития растений люцерны хмелевидной, инокулированных (+АМ) и неинокулированных (–АМ) грибом арбускулярной микоризы *G. intraradices*. Над столбцами указаны фазы развития: “пл” – фаза первого настоящего листа, “вл” – фаза второго настоящего листа, “тл” – фаза третьего настоящего листа, “нст” – начало стеблевания, “ст” – стеблевание, “в + ц” – ветвление и цветение, “нв + б” – начало ветвления и бутонизация, “в + п” – ветвление и плодоношение.

стрируется приблизительно на 30-е сут (Саггеб-Abud et al., 2007). Для большинства растений существенно ниже и показатели отзывчивости на микоризацию. Например, в недавних исследованиях влияния микоризации на рост растений бамбука было показано, что симбиотическая эф-

фективность АМ-грибов на 60-е сут от посадки саженцев варьировала в диапазоне 18.6–74.3% по сухому весу корней и 67.2–93.0% – по весу надземных частей (расчетная эффективность по данным В. Жанг с соавт., Jiang et al., 2013). Примером растений, обладающих сильным автотрофным (в противоположность симбиотрофному) питанием, могут служить, по результатам С. Немек и Дж.С. Ву, растения апельсина *Citrus aurantium*, убранные на стадии плодоношения (Nemes, Vu, 1990). В этом эксперименте прибавки, рассчитанные по поглощению фосфора, при инокуляции растений грибом *G. intraradices* на низкофосфорной почве (9–12 ppm) были сопоставимы с прибавками на почве с высоким содержанием Рд (420 ppm). Такие результаты могут свидетельствовать о различных механизмах, определяющих становление эффективного микоризного симбиоза у растений разных семейств.

Развитие арбускулярной микоризы в корнях сильно микотрофного растения

Микроскопический анализ корней люцерны показал, что на 4-е сут от высадки проростков в корнях растения-хозяина симбиотических структур не наблюдалось. Известно, что на этом этапе проходит преинфекционное развитие, которое включает рост внекорневых гиф в направлении корней растения, а также их ветвление (Hirsch, Kapulnik, 1998). Микоризация люцерны на 4-е сут отсутствовала. Первые апрессории сформировались в период с 4 на 7-е сут растений люцерны, встречаемость АМ в коре корня на 7-е сут составила 10.7% (табл. 4). Арбускул и везикул не наблюдалось. Начало микоризации представлено на рис. 3а. К 7 сут гриб проникает в кору корня,

Таблица 3. Симбиотическая эффективность арбускулярной микоризы, формируемой сильно микотрофной люцерной хмелевидной и грибом *G. intraradices*

Срок, сут от посадки	Симбиотическая эффективность (%), рассчитанная по					
	весу корней	весу надз. частей	весу растения	содержанию фосфора в корнях	содержанию фосфора в надз. частях	содержанию фосфора в растении
1	0	0	0	0	0	0
7	51.1*	36.1*	40.9*	1.9	1.9	1.7
14	–25.7	0.4	–8.6	112.1*	128.0*	105.3*
21	–5.2	60.6*	39.7*			
28	106.5*	196.8*	170.7*	186.2*	186.8*	167.9*
35	166.8*	378.6*	318.2*			
49	147.9*	274.4*	248.3*	188.7*	304.3*	244.0*

Примечание. 51.1* – существенная (при $P < 0.05$) прибавка в значении показателя продуктивности при микоризации в сравнении с неинокулированным контролем. “Вес” – воздушно-сухая биомасса. Оценка проведена по различию средних значений показателей продуктивности в контроле и при инокуляции АМ-грибом с применением *t*-критерия Стьюдента при 5%-ном уровне значимости.

Таблица 4. Показатели микоризации растений сильно микотрофной люцерны хмелевидной, инокулированных грибом *G. intraradices*

Срок, сут от посадки	<i>F</i> , %	<i>M</i> , %	<i>m</i> , %	<i>A</i> , %	<i>a</i> , %	<i>B</i> , %	<i>b</i> , %
1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
7	10.7	—	—	—	—	—	—
14	68.9 ± 4.8	29.6 ± 4.0	42.2 ± 3.9	26.4 ± 3.8	88.8 ± 5.6	5.5 ± 0.9	19.3 ± 3.0
21	79.8 ± 1.8	30.7 ± 3.0	38.3 ± 3.4	29.2 ± 2.9	94.9 ± 4.8	2.7 ± 0.6	9.1 ± 1.9
28	58.5 ± 2.4	20.2 ± 1.5	34.5 ± 2.6	16.3 ± 1.7	80.3 ± 6.2	1.2 ± 0.5	6.0 ± 2.3
35	78.5 ± 1.8	28.4 ± 1.5	36.2 ± 1.9	22.4 ± 1.7	78.7 ± 5.2	3.5 ± 0.8	12.6 ± 3.0
49	81.3 ± 2.6	53.3 ± 3.4	66.0 ± 6.1	23.4 ± 3.9	43.3 ± 4.7	7.4 ± 0.8	13.9 ± 1.8

Примечание. Пропуски “—” означают, что при единичных структурах микоризы в корне оценочные показатели микоризации имели высокую погрешность; *F* — встречаемость микоризной инфекции в корне; *M* и *m* — интенсивность микоризной инфекции в расчете на всю корневую систему и в расчете на микоризованную часть корней, соответственно; *A* и *a* — обилие арбускул в расчете на всю корневую систему и в расчете на микоризованную часть корней, соответственно; *B* и *b* — обилие везикул в расчете на всю корневую систему и в расчете на микоризованную часть корней, соответственно.

проходя через внешние ризодермальные клетки растения-хозяина. Наблюдается рост межклеточного мицелия. На следующем этапе гифы в коре корня формируют арбускулы (рис. 3б). Единичные арбускулы обнаружены на 12 сут развития растения. Далее происходит распространение межклеточных гиф гриба по корню и рост числа арбускул (рис. 3б). К 14 сут одновременно с ростом числа арбускул выявлен процесс формирования везикул гриба в межклеточниках корней растения-хозяина (рис. 3в). К данному сроку обилие арбускул (*A*) и везикул (*B*) в корне составило 26.4 ± 3.8 и $5.5 \pm 0.9\%$, соответственно.

В фазу стеблевания (на 28 сут) развитые арбускулы образуют в корнях люцерны хмелевидной плотные скопления. Нами был применен метод получения давленных препаратов, что позволило анализировать несколько слоев кортикальных клеток, четко видимых при микроскопии. Такой метод применяется для детального анализа АМ (Trouvelot et al., 1986; Utobo et al., 2011). Обнаружены молодые, развивающиеся арбускулы, заполняющие часть клетки растения-хозяина (рис. 3г, указаны тонкими стрелками), развитые активные арбускулы, заполняющие клетку целиком (рис. 3г, указаны жирными стрелками), а также старые “схлопнувшиеся” разрушающиеся арбускулы, заполняющие клетку с одной стороны — в месте проникновения (рис. 3д, указаны тонкими стрелками). Аналогично немецкие исследователи Е. Шмид и Ф. Обервинклер выявили развитые (“living” — “живые”, зрелые) и “вырождающиеся” арбускулы (“degenerated arbuscules”) в старых корнях папортника *Ophioglossum reticulatum* L. (Schmid, Oberwinkler, 1996).

По результатам анализа фотографий давленных препаратов корней растений люцерны хмелевидной можно заключить, что гриб формирует везику-

лы в виде терминальных вздутых мицелия, реже — в виде интеркалярных вздутых (рис. 3е). Их образование наблюдается уже с 14 сут. Иногда формируются “тройные” везикулы, что было показано впервые (рис. 3ж). Обнаружены межклеточные везикулы, но внутриклеточные везикулы, характерные для паразитической стадии грибов, обнаружены не были. Форма везикул варьирует в широком диапазоне: преобладают округлые, овальные, встречаются также грушевидные, продолговатые и неопределенной формы. Согласно данным Дж.Б. Мортон везикулы всех грибов рода *Glomus* действительно являются высоко полиморфными (Morton, 1988). Автор приравнивает понятия “внутрикорневые споры” и “везикулы АМ-гриба”.

Настоящее исследование на сильно микотрофной люцерне хмелевидной показывает, что споры образуются из АМ-гриба, главным образом, на поздних стадиях онтогенеза растения (в фазу плодоношения, выявленные на 49 сут, рис. 3ж). Форма спор близка к сферической, стенка — двойная. В то же время до сих пор в литературе нет единого мнения о развитии спор из везикул. Основной формой внутрикорневых спор, обнаруженных Дж.Б. Мортон для *G. intraradices* Schenck & Smith, как и для *G. diaphanum* Morton & Walker, являлась эллиптическая. Сопоставляя форму внутрикорневых спор этих видов с другими видами рода *Glomus*, автор отметил, что виды *G. clarum* Nicolson & Schenck и *G. manihot* Howeler, Sieverding & Schenck образуют в корнях наиболее близкие к сферической форме споры, обладающие значительно более толстой стенкой. Он также показал, что грибы АМ образуют также яйцевидные, грушевидные, неправильные, почковидные, веретеновидные и булавовидные споры. Дж.Б. Мортон предположил, что высокий полиморфизм по форме внутрикорневых спор АМ-гри-

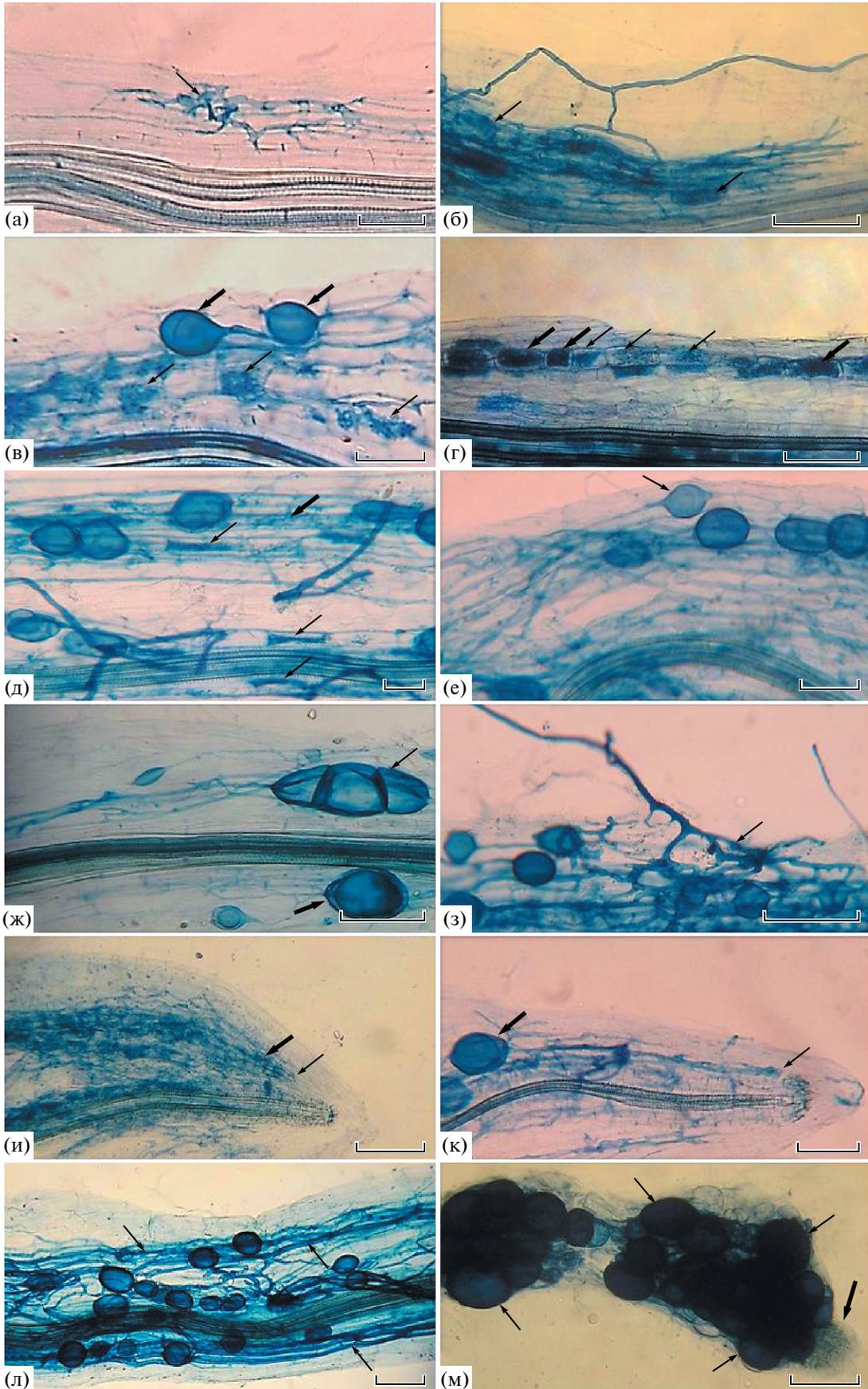


Рис. 3. Развитие структур АМ в корнях люцерны хмелевидной. На рис. 3а стрелка указывает начало заражения АМ; на рис. 3б стрелки указывают на арбускулы; на рис. 3в тонкие стрелки указывают на арбускулы, жирные — на везикулы; на рис. 3г тонкие стрелки указывают на развивающиеся молодые арбускулы, жирные — на активные развитые арбускулы; на рис. 3д тонкими стрелками указаны разрушающиеся арбускулы, жирной — активная арбускула; на рис. 3е стрелкой указана везикула в виде интеркалярного вздутия; на рис. 3ж тонкой стрелкой указана тройная везикула, жирной — везикула с двойной оболочкой; на рис. 3з стрелкой указан апрессорий, образованный в результате вторичного проникновения АМ-гриба в корень; на рис. 3и–3к тонкой стрелкой указано наличие мицелия в непосредственной близости от зоны деления клеток кончика корня; на рис. 3и жирной стрелкой указано наличие арбускул, на рис. 3к жирной стрелкой указана везикула; на рис. 3л стрелками указан толстый мицелий АМ-гриба, сопоставимый по размерам с сосудами центрального цилиндра корня люцерны; на рис. 3м тонкими стрелками указаны везикулы — споры, раздражающие корень, жирной стрелкой — кончик корня. На рис. 3а представлена АМ на 7 сут от высадки проростков, на рис. 3б–3в — на 14-е сут, на рис. 3г–3е — на 28-е сут, на рис. 3ж–3л — на 49-е сут, на рис. 3м — на 88-е сут. Размер масштабной линейки составляет 100 мкм.

ба может быть результатом реакции грибов на стрессовое воздействие растения-хозяина или окружающей среды (Morton, 1988).

Общий анализ структур, формируемых АМ, а также отсутствие скрученных в кольца гиф гриба внутри клеток коры, свойственных *parus* типу АМ, позволяет заключить, что для люцерны хмелевидной характерен *arum* тип арбускулярной микоризы с грибом *G. intraradices*. Полученные нами данные согласуются с литературными о широком распространении именно *arum* типа у представителей бобовых (Pawlowska et al., 1996), а также с данными, полученными для люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula*), которая образует тот же тип АМ (Smith et al., 2004). Однако известно, что растения даже одного рода (но разных видов) могут образовывать различные типы АМ — *arum* (*Arum*), *parus* (*Paris*) или *промежуточный* (*Intermediate*) (Muthukumar, Tamilselvi, 2010; Burni, Hussain, 2011). Показано, что на одном растении могут формироваться разные типы АМ в зависимости от вида микосимбионта (Dickson, 2004) и, наоборот, один гриб может формировать разные типы АМ на разных видах растений. Например, *G. intraradices* образует *arum* тип АМ с луком-пореем (*Allium porrum*) и *parus* тип АМ с асфоделиосом дудчатым (*Asphodelus fistulosus*) (van Aarle et al., 2005). С. Диксон представил наиболее подробную интерпретацию 8 подтипов формируемой растениями АМ (Dickson, 2004). Вероятно, тип АМ зависит не только от генотипов растения-хозяина и микосимбионта, но и от условий взаимодействия партнеров симбиоза. Тогда можно предположить, что и растения одного вида в разных условиях могут формировать разные типы АМ. Однако это предположение еще не нашло подтверждения.

Результаты нашего исследования показали, что уже на начальном этапе развития растения (к 14 сут) формируются все основные структуры АМ. Данные по содержанию фосфора (табл. 2) в растениях люцерны свидетельствуют в пользу того, что уже к этому сроку (фаза 1 настоящего листа) АМ принимает активное участие в регуляции роста люцерны в условиях недостатка фосфатов в почве. На более поздних этапах (с 35 сут) наблюдалось вторичное проникновение гриба в корни

люцерны (рис. 3з). Об активном развитии АМ может свидетельствовать и выявленная нами способность межклеточного мицелия вплотную подступать к зоне деления клеток кончика корня (рис. 3и–к). Следует отметить, что в этой части корня гриб образует не только гифы, но и арбускулы (рис. 3и, арбускула указана толстой стрелкой) и везикулы (рис. 3к, везикула указана жирной стрелкой). Несмотря на такой тесный симбиоз люцерны хмелевидной с АМ-грибом *G. intraradices*, последний не представляется паразитом, а, наоборот, способствует значительному усилению роста растения-хозяина (рис. 1, табл. 3). Видимо, такое тесное взаимодействие может быть объяснено облигатно микотрофным статусом люцерны в условиях низкого уровня Рд в почве.

Дальнейший анализ развития АМ показал, что на 49 сут у люцерны хмелевидной наблюдается наличие в корне не только везикул с одной оболочкой как на первых этапах микоризации (рис. 3в), но и с двумя оболочками (рис. 3ж, везикула указана жирной стрелкой). Общеизвестно, что везикулы имеют одну оболочку и выступают в роли органов накопления запасных энергетических веществ, главным образом липидов (Vago et al., 2002; van Aarle, Olsson, 2003). На более поздних сроках (на 88 сут) эти везикулы приобретают вид непрозрачных, более крупных и округлых структур (рис. 3м). Такие везикулы можно, по-видимому, считать спорами или аналогичными структурами, поскольку данные визуальных наблюдений, проведенных с использованием стереоскопического микроскопа Stemi 2000, показали, что такие новообразования АМ способны израстать мицелием в водной среде на чашках Петри. Обычные везикулы с одной оболочкой такой способностью не обладают. И.М. ван Аарль и П.А. Олсон также обнаружили на подорожнике (*Plantago lanceolata* L.) как внутрикорневые споры, так и везикулы АМ (van Aarle, Olsson, 2003). Ряд авторов предполагает, что везикулы АМ являются начальной стадией развития спор (Schenck, Pérez, 1988; Fortin et al., 2002). В настоящей работе показано, что у сильно микотрофной люцерны хмелевидной уже в начале плодоношения (на 49-е сут) формируются не только внутрикорневые споры (рис. 4а), образуя-

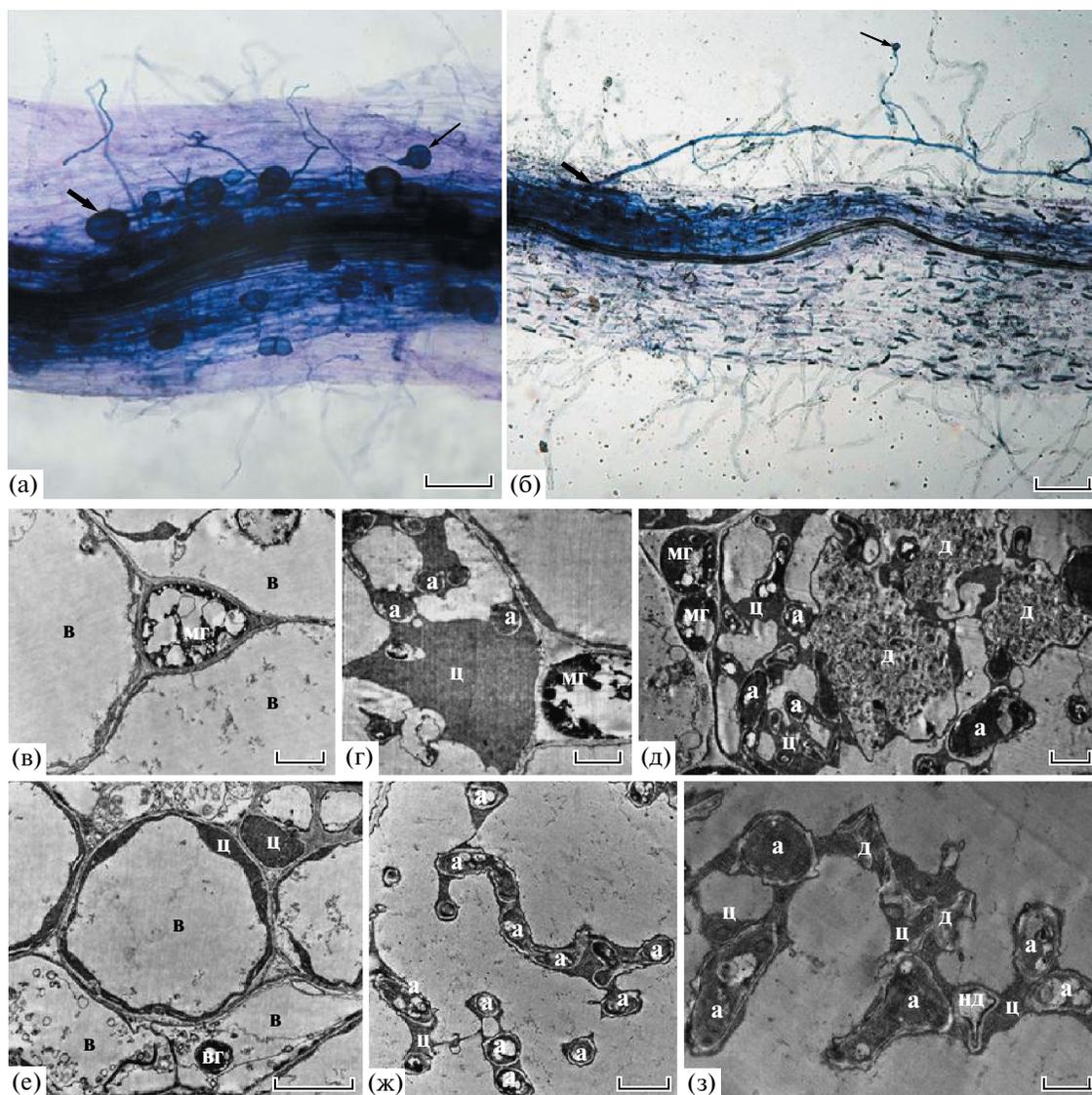


Рис. 4. Споры АМ-гриба (рис. 4а–б) и структуры АМ (рис. 4в–з) в фазу плодоношения люцерны. На рис. 4а жирной стрелкой указана овальная внутриклеточная спора гриба, тонкой стрелкой – грушевидная везикула гриба; на рис. 4б тонкой стрелкой показано образование вторичной внекорневой споры гриба, а толстой стрелкой – вторичный аппрессорий; на рис. 4в–з представлены микрофотографии АМ, где “в” – растительные вакуоли, “мг” – межклеточные гифы гриба, “вг” – внутриклеточная гифа гриба, “ц” – растительная цитоплазма, “а” – ветви арбускул, “нд” – начало деградации ветви арбускулы, “д” – деградирующие (рис. 4з) и деградированные (рис. 4д) ветви арбускул. На рис. 4а–4з представлена АМ в фазу плодоношения люцерны (на 49-е сут). Размер масштабной линейки на рис. 4а и 4б составляет 100 мкм, на рис. 4в–д, 4ж – 2 мкм, на рис. 4е – 5 мкм, на рис. 4з – 1 мкм.

щиеся из везикул гриба, но и внекорневые вторичные споры (рис. 4б).

Основной морфологической особенностью АМ, образуемой люцерной, является формирование на поздних сроках развития (в фазу плодоношения) мощного внутрикорового мицелия, который достигает толщины в 8–12 мкм и сопоставим по толщине с сосудами центрального цилиндра (рис. 3л). Например, мицелий в корнях растений двулетней люцерны тоньше в 2–3 раза и сопоставим по толщине с внекорневым (экстрематриальным), который согласно полученным нами и

литературным данным составляет для грибов АМ рода *Glomus* 3.5–5.5 мкм. Следует отметить, что содержание фосфора в расчете на 1 растение (выраженное в мг на 1 растение) не снижалось (оно легко рассчитывается перемножением соответствующих значений в табл. 1 и 2), содержание фосфора в растениях постоянно возрастало как для надземных частей, так и для корней, что свидетельствовало о том, что в фазу плодоношения (к 49 сут) растение-хозяин не остановилось в развитии, а поступление симбиотрофного фосфора продолжало возрастать к этому сроку. Таким об-

разом, полученные морфологические данные могут свидетельствовать об активном участии АМ в метаболизме сильно микотрофной люцерны, включая фазу плодоношения, что подтверждается данными о высоком содержании фосфора в тканях микоризованных растений против растений без АМ.

Анализ электронных микрофотографий АМ люцерны хмелевидной с грибом *G. intraradices* выявил следующие особенности в развитии симбиотической структур. Показано, что клетки, не содержащие арбускулы, характеризуются развитой вакуолью (рис. 4в), как и клетки мезодермы корней люцерны в варианте без инокуляции АМ-грибом. В клетках, содержащих молодые арбускулы, наблюдается наличие (значительное развитие) цитоплазмы (рис. 4г). В клетках с более зрелыми арбускулами площадь цитоплазмы на срезе меньше (рис. 4ж). Исследование показало, что межклеточные гифы (рис. 4в) не вызывают такого развития цитоплазмы в соседних клетках, как и внутриклеточные гифы в той же клетке (рис. 4е). На рис. 4е в средней части представлены 3 крупные клетки эндодермы, выше клетки центрального цилиндра корня (здесь клетки флоэмы), а ниже — клетки мезодермы. Показано, что у исследуемого сильно микотрофного растения грибок *G. intraradices* не проникает в клетки эндодермы и флоэмы (рис. 4е). Таким образом, паразитического развития АМ-гриба в корне люцерны хмелевидной выявлено не было. При этом АМ-гриб, как правило, больше всего развивался в наиболее глубоких слоях мезодермы. На рис. 4з зафиксировано начало деградации ветви арбускулы. На рис. 4д показано, что в одной клетке растения-хозяина может проходить одновременно 2 процесса: (1) заключение в вакуоль и последующее разрушение старой деградирующей арбускулы (по центру рисунка, выше и правее представлены 3 зоны деградации), а также (2) активное развитие новой арбускулы (слева). В работе Л.М. Якоби с соавт. (Jacobi et al., 2003), анализируя АМ гороха посевного (*Pisum sativum* L., сорт SGE и 2 симбиотических мутанта) с *G. intraradices*, можно также выявить существенное развитие цитоплазмы вокруг ветвей арбускул как для АМ у исходной линии, так и для АМ у мутанта SGEFix⁻¹ (*sym40*), характеризующегося высоким (~90%) содержанием клеток с деградированными арбускулами. В работе М. Вишнеvsка и В. Голиновски проведен анализ клеток табака (*Nicotiana tabacum* L., сорт Samsun), микоризованных грибом *G. mosseae* Nicol. & Gerd. (Wishnevskaja, Golinowski, 2011). Сопоставление полученных данных показало, что зрелые арбускулы у *N. tabacum* также имеют значительное количество тонких ветвей, окруженных цитоплазмой клетки растения-хозяина, растительная вакуоль также сильно фрагментирована, а коллапсированные ветви деградирующих арбускул плотно упа-

кованы. Согласно гипотезе зрелые арбускулы разрушаются в результате чего ортофосфат, накопленный грибом в гранулах, поглощается клеткой растения-хозяина (Brown, King, 1982; Смит, Рид, 2012).

Координация в развитии АМ и развитии сильно микотрофного растения

Сравнительный анализ статистических данных об изменении частоты встречаемости основных структур АМ в ходе развития растения, представленных в табл. 4, позволил выявить два ключевых этапа развития АМ:

1) 7–14 сут от высадки проростков характеризовались становлением основных структур АМ, причем наблюдалось резкое увеличение количественных характеристик микоризации;

2) 21–28 сут отличались значимым снижением по всем количественным характеристикам микоризации (по *F* снижение составило 21%) с последующим их восстановлением к 35 сут (табл. 4).

Следует отметить, что выявленные периоды соответствуют изменению развития растения-хозяина. На 7–14 сут происходит последовательное развитие первого округлого листа люцерны и начало образования боковых корней. Этот этап сменяется развитием первого настоящего (тройного) листа и вторичным ветвлением корней. Ветвление корней растений, согласно литературным данным, тесно скоординировано с развитием симбиотических структур гриба в корнях растений (Marsh, Schultze, 2001). В нашем исследовании показано, что при появлении первых боковых корней у растений происходило проникновение гриба в корни и развитие внутрикорневого мицелия, а при образовании вторичных боковых корней наблюдалось активное развитие арбускул. Следовательно, наличие первого выявленного нами этапа обусловлено интенсивным развитием АМ (см. встречаемость — *F* в табл. 4). Показатель *F* быстро выходит на “плато” — уже на момент регистрации арбускул и везикул с 7 на 14 сут. Встречаемость микоризы, начиная с этого периода, практически не изменяется, а колеблется в пределах 70–80% (табл. 4). Отмечено также очень высокое обилие арбускул в расчете на микоризованную часть корней (*a*) — более 80% на протяжении всего раннего периода развития АМ (табл. 4). Вероятно, это определяется облигатномикотрофным статусом люцерны хмелевидной по отношению к АМ-грибу *G. intraradices*, который выражен в признаках карликовости растений без микоризы по отношению к нормальному развитию растений с АМ, выращенных на почве с низким уровнем фосфора (Юрков и др., 2007). Гриб АМ усиливает фосфатное питание растений люцерны хмелевидной, снимая эффект подавления роста в условиях низкого уровня фосфора в почве, т.е. способствует адаптации растений. В свою очередь растение-хо-

заян на ранних этапах активно развивается, что характеризуется увеличением числа листьев. Происходит усиление работы ассимиляционного аппарата растений люцерны хмелевидной (Юрков, Семенов, 2008; Юрков и др., 2010). Тем самым увеличивается снабжение микосимбионта углеводами, что приводит к еще более интенсивному развитию АМ (Koide, Mosse, 2004). Стимулирующий эффект АМ может сказываться на содержании хлорофилла, увеличении площади листовой поверхности и скорости фиксации CO_2 . Показано, что АМ усиливает приток продуктов фотосинтеза в корни, где они могут использоваться микосимбионтом (Nemes, Vu, 1990; Paradi et al., 2003).

В период с 14 на 21 сут АМ у люцерны полностью сформировалась и перешла в состояние динамического равновесия, показатели микоризации фактически не менялись (табл. 4). Однако затем в период с 21 на 28 сут наблюдалось снижение обилия симбиотических структур в корнях. Именно в этот период происходит переход растений в фазу стеблевания (рис. 4). Вероятно, интенсификация роста растений люцерны и в следствие с этим перераспределение потоков ассимилятов и привела к снижению показателей микоризации к 28 сут с последующим восстановлением их значений уже через неделю (табл. 4). Таким образом, АМ – это динамическая структура, развитие которой может, как усиливаться, так и подавляться растением-хозяином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные результаты, следует заключить, что растения люцерны хмелевидной образуют с грибом *G. intraradices arum* тип арбускулярной микоризы. По данным трансмиссионной электронной микроскопии корней люцерны было показано, что клетки мезодермы микоризованных корней, не содержащие арбускулы, как и клетки корней в варианте без инокуляции АМ-грибом характеризуются развитой вакуолью. Наибольшее развитие цитоплазмы (площадь среза, занятая цитоплазмой) наблюдается в клетках, содержащих молодые арбускулы. Межклеточные гифы не вызывают такого развития цитоплазмы в соседних клетках, как и внутриклеточные гифы в той же клетке.

Выявлена способность межклеточного мицелия вплотную подступать к зоне деления клеток кончика корня, причем АМ-гриб формирует не только мицелий, но и арбускулы, и везикулы. Несмотря на это, в исследовании показан мутуалистический характер симбиоза; не было обнаружено ни одного проникновения гриба *G. intraradices* в клетку центрального цилиндра корня растения-хозяина, которое характерно для паразитических грибов.

В корне люцерны идентифицированы все фазы развития и размножения АМ-гриба, что указывает на активное использование микосимбионтом питательных субстратов растения-хозяина. С дру-

гой стороны, показано, что поступление фосфора в микоризованные растения существенно усиливалось на всех фазах развития – не только в фазу стеблевания, но и в фазы цветения и плодоношения (табл. 2). Так, симбиотическая эффективность АМ, рассчитанная как прибавка содержания фосфора в растениях, была достоверной и на 14-е, и на 28-е и на 49-е сут от посадки (табл. 3). Данные по содержанию фосфора в тканях растений, а также по его выносу подтверждают тот факт, что АМ находилась в активном состоянии постоянно, наблюдается повышение симбиотической эффективности с развитием растения-хозяина (табл. 3). Эти результаты свидетельствуют об эффективном и активном взаимодействии партнеров симбиоза, при котором растение-хозяин способно как усиливать микоризацию, так и подавлять развитие АМ-гриба в корне (табл. 4), обеспечивая собственный рост и развитие.

Работа выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01), гранта Президента РФ (МК-5964.2013.4), гранта РФФИ 15-29-02753 офи_м и с использованием оборудования РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” СПбГУ (проект № 109-98).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Селиванов И.А. Структура фикомицетных тамнискофаговых (везикулярно-арбускулярных) эндомикориз // Микориза растений. 1975. Т. 142. С. 60–68.
- Смит С.Э., Рид Д.Дж. Микоризный симбиоз. Пер. с 3-го англ. издания Ворониной Е.Ю. М.: Тов. науч. изд. КМК, 2012. 776 с.
- Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агроэкосистем будущего. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2009. 210 с.
- Юрков А.П., Семенов Д.Г. Неинвазивное спектрофотометрическое исследование фотосинтетической эффективности арбускулярной микоризы люцерны хмелевидной // Уч. Записки РГГМУ. 2008. № 7. С. 101–110.
- Юрков А.П., Якоби Л.М. Получение мутантов люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) с изменениями развития арбускулярной микоризы // Естественные и технические науки. 2011. № 6(56). С. 127–133.
- 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. № 12. С. 18–24.
- Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В. и др. Эффективность инокуляции форм люцерны хмелевидной грибом арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* и внутрипуляционная изменчивость растений по показателям продуктивности и микоризообразования // Сельскохозяйственная биология. 2007. № 5. С. 67–74.
- Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В. и др. Влияние арбускулярной микоризы на рост и развитие люцерны хмелевидной в условиях среднего содержа-

- ния доступного для растений фосфора в почве // ЕТН. 2010. № 6. С. 117–123.
- Якоби Л.М., Кукалев А.С., Ушаков К.В. и др. Полиморфизм форм гороха посевного по эффективности симбиоза с эндомикоризным грибом *Glomus* sp. в условиях инокуляции ризобиями // Сельскохозяйственная биология. 2000. V. 3. P. 94–102.
- van Aarle I.M., Cavagnaro T.R., Smith S.E. et al. Metabolic activity of *Glomus intraradices* in *Arum*- and *Paris*-type arbuscular mycorrhizal colonization // New Phytol. 2005. V. 166. P. 611–618.
- van Aarle I.M., Olsson P.A. Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 6762–6767.
- Bago B., Zipfel W., Williams R.M. et al. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 108–124.
- Borisov A.Y., Danilova T.N., Koroleva T.A. et al. Pea (*Pisum sativum* L.) regulatory genes controlling development of nitrogen-fixing nodule and arbuscular mycorrhiza: fundamentals and application // Biologia. 2004. V. 59. № 13. P. 137–144.
- Boyetchko S.M., Tewari J.P. Root colonization of different hosts by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus dimorphicum* // Plant Soil. 1990. V. 129. P. 131–136.
- Brown M.E., King F.J. Electron microscopy of mycorrhiza // Meth. and Princip. Mycorrhizal Res. 1982. V. 11. P. 201–207.
- Burni T., Hussain F. Diversity in arbuscular mycorrhizal morphology in some medicinal plants of family Lamiaceae // PJB. 2011. V. 43. P. 1789–1792.
- Cao M.Q., Wu Q.S., Zou Y.N. An improved ink-acetic acid technique for staining arbuscular mycorrhizas of citrus // Int. J. Agric. Biol. 2013. V. 15. P. 386–388.
- Carreón-Abud Y., Soriano-Bello E., Martínez-Trujillo M. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by micropropagated blackberry (*Rubus fruticosus* var. *brazos*) plants / In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Netherlands: Springer, 2007. P. 161–165.
- Dickson S. The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses // New Phytol. 2004. V. 163. P. 187–200.
- Duc G., Trouvelot A., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc^-) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.) // Plant Sci. 1989. V. 60. P. 215–222.
- Ezawa T., Hayatsu M., Saito M. A new hypothesis on the strategy for acquisition of phosphorus in arbuscular mycorrhiza: up-regulation of secreted acid phosphatase gene in the host plant // MPMI. 2005. V. 18. P. 1046–1053.
- Finlay R.D. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 1115–1126.
- Fortin J.A., Bécard G., Declerck S. et al. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures // Can. J. Bot. 2002. 80: 1–20.
- Gallaud J. Etude sur les mycorrhizes endotrophes // Rev. Gen. Bot. 1905. V. 17. P. 5–48.
- Gianinazzi S., Schüepp H., Haselwandter K. et al. Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts. Basel, Birkhäuser, 2002. 340 p.
- Hirsch A.M., Kapulnik Y. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: comparisons with the *Rhizobium-legume* symbiosis // Fungal Genet. Biol. 1998. V. 23. P. 205–212.
- Horvath B., Yeun L.H., Domonkos A. et al. *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses // MPMI. 2011. V. 24. P. 1345–1358.
- Jacobi L.M., Zubkova L.A., Barmicheva E.M. et al. Effect of mutations in the pea genes *Sym33* and *Sym40*. II. Dynamics of arbuscule development and turnover // Mycorrhiza. 2003. V. 13. P. 9–16.
- Janse J.M. Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaises // Ann. Jardin. Bot. Buitenzorg. 1897. V. 14. P. 53–201.
- Jiang W., Gou G., Ding Y. Influences of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and mineral element absorption of chenglu hybrid bamboo seedlings // Pak. J. Bot. 2013. V. 45. P. 303–310.
- Karandashov V., Bucher M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas // Trends Plant Sci. 2005. V. 10. P. 22–29.
- Klingner A., Bothe H., Wray V. Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization // Phytochemistry. 1995. V. 38. P. 53–55.
- Koide R.T., Kabir Z. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate // New Phytol. 2000. V. 148. P. 511–517.
- Koide R.T., Mosse B. A history of research on arbuscular mycorrhiza // Mycorrhiza. 2004. V. 14. P. 145–163.
- Larkan N.J., Smith S.E., Barker S.J. Position of the reduced mycorrhizal colonization (*Rmc*) locus on the tomato genome map // Mycorrhiza. 2007. V. 17. P. 311–318.
- Li H., Smith F.A., Dickson S. et al. Plant growth depressions in arbuscular mycorrhizal symbioses: not just caused by carbon drain? // New Phytol. 2008. V. 178. P. 852–862.
- Marsh J.F., Schultze M. Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants // New Phytol. 2001. V. 150. P. 525–532.
- Morandi D., Signor C., Gianinazzi-Pearson V., Duc G. A *Medicago truncatula* mutant hyper-responsive to mycorrhiza and defective for nodulation // Mycorrhiza. 2009. V. 19. P. 435–441.
- Morton J.B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification // Mycotaxon. 1988. V. 27. P. 267–324.
- Muthukumar T., Tamilselvi V. Occurrence and morphology of endorhizal fungi in crop species // Tropic. Subtropic. Agroecosyst. 2010. V. 12. P. 593–604.
- Nägeli C. Pilze im Innern von Zellen // Linnaea. 1842. V. 16. P. 278–285.
- Nemec S., Vu J.C.V. Effects of soil phosphorus and *Glomus intraradices* on growth, nonstructural carbohydrates and photosynthetic activity of *Citrus aurantium* // Plant Soil. 1990. V. 128. P. 257–263.
- Paradi I., Bratek Z., Lang F. Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus supply on polyamine content, growth and photosynthesis of *Plantago lanceolata* // Biologia Plantarum. 2003. V. 46. P. 563–569.
- Pawlowska T.E., Błaszczkowski J., Rühling Á. The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland // Mycorrhiza. 1996. V. 6. P. 499–505.
- Phillips J.M., Hayman D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular

- mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection // *Transact. British Mycor. Soc.* 1970. V. 55. P. 158–161.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
- Schenck N.C. Pérez Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 2nd Ed. Gainesville, University of Florida. 1988. 241 p.
- Schlicht A. Beitrag zur Kenntniss der Verbreitung und Bedeutung der Mycorrhizen // *Landwirtschaftliche Jahrbücher.* 1889. V. 18. P. 478–506.
- Schmid E., Oberwinkler F. Light and electron microscopy of a distinctive VA mycorrhiza in mature sporophytes of *Ophioglossum reticulatum* // *Mycol. Res.* 1996. V. 100. P. 843–849.
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution // *Mycol. Res.* 2001. V. 105. P. 1413–1421.
- Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth and total P uptake // *New Phytol.* 2004. V. 162. P. 511–524.
- Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Rozov S.M., Tikhonovich I.A. New symbiotic mutants of pea obtained after mutagenesis of laboratory line SGE // *Pisum Genet.* 1994. V. 26. P. 36–37.
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes ayant une signification fonctionnelle / In: *Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle.* Paris, 1st ESM Press. 1986. 217–221.
- Utobo E.B., Ogbodo E.N., Nwogbaga A.C. Techniques for extraction and quantification of arbuscular mycorrhizal fungi // *LARCJI.* 2011. V. 2. P. 68–78.
- Wang B., Qiu Y.-L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants // *Mycorrhiza.* 2006. V. 16. P. 299–363.
- Wishniewska M., Golinowski W. Immunolocalization of α -expansin protein (NtEXPA5) in tobacco roots in the presence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* Nicol. & Gerd // *Acta Botanica Cracoviensia Series Botanica.* 2011. V. 53. P. 113–123.

Development of Arbuscular Mycorrhiza in Highly Responsive and Mycotrophic Host Plant—Black Medick (*Medicago lupulina* L.)

A. P. Yurkov^{a, b, c}, L. M. Jacobi^a, N. E. Gapeeva^a, G. V. Stepanova^d, and M. F. Shishova^e

^a *Laboratory of Ecology of Symbiotic and Associative Microorganisms, All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, 196608 Russia*
e-mail: yurkovandrey@yandex.ru

^b *International Research Centre "Biotechnologies of the Third Millennium," ITMO University, St. Petersburg, 191002 Russia*

^c *Chair of Ecology, Faculty of Ecology and Physics of Nature, Russian State Hydrometeorological University, St. Petersburg, 195196 Russia*

^d *Laboratory of Breeding Symbiotic Technologies, All-Russia Williams Fodder Research Institute, Moscow oblast, 141055 Russia*

^e *Chair of Plant Physiology and Biochemistry, Biological Faculty, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

Received November 24, 2014; in final form, February 26, 2015

The main phases of arbuscular mycorrhiza (AM) development were analyzed in black medick (*Medicago lupulina*) with *Glomus intraradices*. Methods of light and transmission electron microscopy were used to investigate AM. The first mycorrhization was identified on the seventh day after sowing. *M. lupulina* with AM-fungus *Glomus intraradices* formed *Arum* type of AM. Roots of black medick at fruiting stage (on the 88th day) were characterized by the development of forceful mycelium. The thickness of mycelium was comparable with the vascular system of root central cylinder. The development of vesicles into intraradical spores was shown. Micelium, arbuscules, and vesicles developed in close vicinity to the division zone of root tip. This might be evidence of an active symbiotic interaction between partners. All stages of fungal development and breeding, including intraradical spores (in intercellular matrix of root cortex), were identified in the roots of black medick, which indicated an active utilization of host plant nutrient substrates by the mycosymbiont. Plant cell cytoplasm extension was identified around young arbuscular branches but not for intracellular hyphae. The presence of active symbiosis was confirmed by increased accumulation of phosphorus in *M. lupulina* root tissues under conditions of *G. intraradices* inoculation and low phosphorus level in the soil. Thus, black medick cultivar-population can be characterized as an ecologically obligate mycotrophic plant under conditions of low level of available phosphorus in the soil. Specific features of AM development in intensively mycotrophic black medick, starting from the stage of the first true leaf until host plant fruiting, were evaluated. The obtained plant-microbe system is a perspective model object for further ultracytological and molecular genetic studies of the mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza symbiotic efficiency, including selection and investigation of new symbiotic plant mutants.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, *Medicago lupulina*, black medick, *Glomus intraradices*, arbuscular mycorrhizal fungus, symbiotic structures, arbuscules, vesicles, spores, light microscopy, electron microscopy