

ВЛИЯНИЕ ГРИБА АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ *RHIZOPHAGUS IRREGULARIS* НА РАЗВИТИЕ ЛЮЦЕРНЫ ХМЕЛЕВИДНОЙ ПРИ ДЕФИЦИТЕ ФОСФОРНОГО ПИТАНИЯ

А.П. Юрков^{1,2,3}, А.А. Крюков¹, А.О. Горбунова^{1,2}, Л.М. Якоби¹, Н.И. Воробьев¹, М.Ф. Шишова²

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия, yurkovandrey@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный гидрометеорологический университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Исследование посвящено изучению механизмов, контролирующих симбиотическую эффективность арбускулярной микоризы (АМ). Выявлены основные 4 фазы развития АМ-симбиоза. Показаны взаимосвязи развития АМ и скорости поступления фосфора в растения за счет АМ с параметрами фотосинтеза сильно микотрофной линии МІS-1 люцерны хмелевидной в условиях низкого уровня доступного для питания растений фосфора в субстрате.

Ключевые слова: арбускулярная микориза, люцерна хмелевидная, *Rhizophagus irregularis*, дефицит фосфора

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-840-843

Арбускулярная микориза (АМ) – самый распространенный симбиоз в наземных экосистемах, повсеместно распространенный в зоне тайги и встречающийся как во всех природных зонах России от полярной пустыни до субтропических лесов, так и в регионах с высотной поясностью вплоть до альпийских лугов. Его значимость для природных экосистем трудно переоценить. АМ играет важную роль в развитии растений, способствуя усилению их роста посредством улучшения минерального питания (особенно фосфорного). В связи с этим выявление особенностей развития эффективного АМ-симбиоза представляет собой актуальную и еще не до конца решенную задачу.

В настоящем исследовании проведен анализ основных параметров взаимодействия сильно микотрофного растения – линии МІS-1 люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) со штаммом RCAM00320 АМ-гриба *Rhizophagus irregularis*, идентифицированным авторами в 2018 г [Крюков, Юрков, 2018]. Оценивали: 1) фазу развития АМ (φ°), характеризующую степень развития симбиотических структур АМ-гриба в коре корня растения-хозяина; 2) скорость притока фосфора в растение за счет АМ (I_p), характеризующую симбиотическую эффективность АМ (здесь – амплитуду симбиотического взаимодействия партнеров симбиоза); 3) содержание хлорофиллов “a” и “b” (Chl-a и Chl-b), в качестве ключевых параметров фотосинтетической активности растения-хозяина. Вегетационный эксперимент проведен по схеме Юркова с соавт. [Юрков и др., 2015]. Проведены: учет веса растений, содержания фосфора по методу Труога-Мейера после озоления материала в смеси серной и хлорной кислот по Гинсбург и Щегловой (1975); анализ содержания Chl-a и Chl-b методом спектрометрии в пробах листьев, экстрагированных 90% ацетоном по методу Джеффри и Хамфри (1975); определение концентрации растворимых белков в осадке ацетоновых

экстрактов по методу Брэдфорд (1976) спектрометрически с использованием в качестве градуировочного белка – яичного альбумина (поглощение на $\varphi = 695$ нм) и оценка микоризации с применением метода мацерации и окрашивания корней по Филипс и Хейман (1970), методом световой микроскопии по Травло с соавт. (1986) и расчета параметров микоризации [Воробьев и др., 2016]. Подробно методики описаны в работе Юрков с соавт. [Юрков и др., 2010].

Выявлено 4 фазы развития АМ: I фаза – $\varphi = 0-90^\circ$, в корнях растений присутствует только мицелий; II фаза – $\varphi = 90-180^\circ$, в корнях растений присутствует мицелий и арбускулы; III фаза – $\varphi = 180-270^\circ$, в корнях растений присутствуют мицелий, арбускулы и везикулы; IV фаза – $\varphi = 270-360^\circ$, в корнях растений присутствует мицелий и везикулы, арбускулы отсутствуют (Таблица), поэтому φ° рассчитана по формуле:

$$\varphi^\circ = \frac{90^\circ \cdot a + 180^\circ \cdot b + 270^\circ \cdot c + 360^\circ \cdot d}{a + b + c + d}, \quad (1)$$

где a , b , c и d – число полей зрения с I, II, III и IV фазой развития АМ в корне, соответственно. В качестве амплитуды симбиотического взаимодействия “гриб-растение” рассчитана прибавка содержания фосфора в растениях с АМ в заданный промежуток времени ($t_2 - t_1$) за вычетом содержания в растениях без АМ (I_p) – скорость притока фосфора в растение за счет АМ в период времени:

$$I_p = \frac{[P_2(+AM) - P_1(+AM)] - [P_2(-AM) - P_1(-AM)]}{t_2 - t_1}, \quad (2)$$

где $P_1(+AM)$, $P_2(+AM)$ – содержание фосфора в надземных частях растений с микоризой в момент времени t_1 и t_2 , соответственно (мг P_2O_5 /сут); $P_1(-AM)$, $P_2(-AM)$ – содержание фосфора в растениях без АМ в момент времени t_1 и t_2 , соответственно (мг P_2O_5 /сут). Для удобства работы с малыми числами проведено логарифмирование:

$$r_p = \ln(I_p \cdot 10^4). \quad (3)$$

Расчетными формулами для содержания хлорофиллов служили:

$$C_{Chl_a} = \frac{(11,93 \cdot (E_{663} - E_{750}) - 1,93 \cdot (E_{646} - E_{750})) \cdot V_{исх}}{P}, \quad (4)$$

где C_{Chl_a} – содержание хлорофилла “а” в листовых пластинах (мкг/мл); E_{663} , E_{750} и E_{646} – значения поглощения экстракта в отн. ед. спектрофотометра СФ-26 (ЛОМО, Ленинград) на длинах волн $\lambda = 663$, 750 и 646 нм, соответственно; $V_{исх}$ – исходный объем экстракта в мл; P – разбавление.

$$C_{Chl_b} = \frac{(20,36 \cdot (E_{646} - E_{750}) - 5,5 \cdot (E_{663} - E_{750})) \cdot V_{исх}}{P}, \quad (5)$$

где C_{Chl_b} – содержание хлорофилла “b” в листовых пластинах (мкг/мл). Затем рассчитывали относительное содержание хлорофиллов в пересчете на содержание белка.

Оценка φ° проведена на 5 ключевых этапах развития растения-хозяина: 1) на 14 сут от посадки и инокуляции (фаза развития растения – 1 настоящий лист); 2) на 21 сут (фаза развития растения – 2 настоящий лист); 3) на 28 сут (фаза развития растения – стеблевание); 4) на 35 сут (фаза развития растения – ветвление и бутонизация растений с АМ с задержкой развития растений без АМ в фазе стеблевания); 5) на 88 сут (заключительная фаза развития растения – плодоношение, опадание листьев). Измерение остальных параметров – в те же сроки кроме последнего, т.к. на 88 сут значения содержания хлорофиллов не корректны вследствие отмирания листьев, как и содержание фосфора, причем для расчета скорости притока последнего (I_p) необходим был бы еще более поздний срок учета для осреднения величины амплитуды

взаимодействия на последний срок. Биологическая повторность составила 8 растений. Достоверность различий между средними значениями оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента [Лакин, 1990].

Таблица.

Показатели развития АМ (φ°), интенсивности поступления фосфора за счет АМ (r_p) и содержания хлорофиллов а и б в различные стадии развития люцерны хмелевидной в условиях дефицита фосфорного питания

Срок, сут от посадки и инокуляции	№ фазы АМ	φ°	r_p	Содержание Chl-a в пересчете на белок, %		Содержание Chl-b в пересчете на белок, %	
				–АМ	+АМ	–АМ	+АМ
14	I	75,8	4,05	2,89	3,03	2,15	1,94
21	II	90,1	4,70	3,32	4,17*	1,46	1,25
28	II	113,0	5,64	2,08	3,83*	0,81	1,37*
35	III	232,1	6,04	4,18	7,44*	1,15	1,82*
88	IV	318,6	-	-	-	-	-

Примечание: “–АМ” и “+АМ” – варианты без инокуляции и с инокуляцией АМ-грибом. Наблюдался достоверный ($P<0,05$) прирост фазы развития (φ°) и интенсивности поступления фосфора (r_p) за счет АМ в каждый последующий срок от посадки; 4,17* – значения достоверно ($P<0,05$) выше в варианте с АМ в сравнении с вариантом без АМ.

Результаты показали активную смену фаз развития АМ в процессе онтогенеза сильно микотрофной линии MIS-1 *M. lupulina*. В условиях низкого уровня доступного для питания растений фосфора в почве развитие АМ проходило через все фазы развития, включая четвертую, предполагающую существенное снижение развития арбускул против значительного роста числа везикул при равномерном росте интенсивности поступления фосфора в растение за счет АМ (r_p). Фаза развития растения-хозяина при инокуляции АМ-грибом и при отсутствии инокуляции не различалась в 1-й срок учета – 14 сут от посадки – фаза развития 1-го настоящего листа. Однако наблюдалось ускорение роста АМ-растений, начиная с 21-х сут от посадки (у АМ-растений – фаза развитого 2-го настоящего листа, у растений без АМ – фаза начала развития 2-го настоящего листа). К этому сроку зафиксирован достоверный ($P<0,05$) отклик на микоризацию по содержанию Chl-a. На 28-е сут от посадки наблюдался переход растений без АМ в фазу стеблевания и фаза развитого стеблевания у растений с АМ. К этому сроку выявлен достоверный ($P<0,05$) отклик на микоризацию по содержанию Chl-b. Таким образом, АМ положительно влияла на рост, развитие и фотосинтез *M. lupulina*. В результате развития эффективного симбиоза ускорение фазы развития растений наблюдалось и на 35-е сут от посадки: растения с АМ перешли в фазу ветвления и бутонизации, а растения без АМ находились в фазе развитого стеблевания. К 88-м сут от посадки фаза растений с АМ и без АМ совпадала и соответствовала фазе плодоношения с образованием зрелых плодов. При этом урожайность семян у растений с АМ и растений без АМ существенно различалась – вес зрелых семян с одного растения с АМ был выше такового с растения без АМ в 7,2 раза. Это свидетельствует, что эффективность АМ сохранялась на протяжении всего цикла развития люцерны хмелевидной, включая 4 фазу развития АМ, на которой обилие арбускул в корнях значительно снижено в отличие от активной 3-й фазы АМ. Согласно общим представлениям о механизмах формирования эффективной АМ предполагается, что основной поток симбиотрофного фосфора поступает в растение-хозяина через арбускулы, которые, тем самым, являются основными симбиотическими структурами [Smith, Read, 2008]. Однако полученные на сильно микотрофной линии MIS-1 данные о наличии симбиотической эффективности в более позднюю фазу активного развития

везикул и мицелия свидетельствуют в пользу наличия иных способов поступления симбиотрофного фосфора в АМ-растения. Выдвигается гипотеза о том, что в заключительную 4 фазу развития АМ (развитие мицелия и везикул) основное поступление фосфора в растение происходит не через арбускулы, а иными путями, среди которых можно предполагать следующие: 1) транспорт через межклеточные внутрикорневые гифы минерального фосфора; 2) поступление фосфора в составе фрагментов лизировавшихся грибных структур (везикул, арбускул и мицелия) внутри растений.

Работа поддержана грантами СПбГУ №1.37.534.2016, РФФИ-а №18-016-00220, РФФИ-офи м №15-29-02753, РФФИ №16-16-00118, государственным заданием 0664-2015-0011. Часть работы выполнена на оборудовании ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ и Ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Литература

Воробьев Н.И., Юрков А.П., Проворов Н.А. Свидетельство №2016612112 от 12.02.2016 о регистрации программы ЭВМ "Программа вычисления индексов микоризации корней растений". – М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности. – 2016.

Крюков А.А., Юрков А.П. Оптимизация процедуры молекулярно-генетической идентификации грибов арбускулярной микоризы в симбиотическую фазу на примере двух близкородственных штаммов // Микология и фитопатология. – 2018. – Т. 52, №1. – С. 38–48.

Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.

Юрков А.П., Шишова М.Ф., Семенов Д.Г. Особенности развития люцерны хмелевидной с эндомикоризным грибом. – Саарбрюккен: Изд-во LAP, 2010. – 215 с.

Юрков А.П., Якоби Л.М., Гапеева Н.Е., Степанова Г.В., Шишова М.Ф. Развитие арбускулярной микоризы у сильно микотрофного растения-хозяина – люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.) // Онтогенез. – 2015. – Т. 46, № 5. – С. 313–326.

Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. 3rd edn. – London: Academic Press, 2008. – 803 p.

THE EFFECT OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS *RHIZOPHAGUS IRREGULARIS* ON THE DEVELOPMENT OF BLACK MEDICK UNDER PHOSPHORUS DEFICIENCY CONDITIONS

A.P. Yurkov^{1,2,3}, A.A. Kryukov¹, A.O. Gorbunova^{1,2}, L.M. Jacobi¹, N.I. Vorobiev¹, M.F. Shishova²

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia, yurkovandrey@yandex.ru

²St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

³Russian State Hydrometeorological University, St. Petersburg, Russia

Abstract. This research is devoted to the study of the mechanisms controlling the symbiotic efficiency of arbuscular mycorrhizae (AM). The main 4 phases of AM symbiosis development have been revealed. The relationship between the development of AM and the rate of phosphorus uptake into plants due to AM with photosynthesis parameters of a highly mycotrophic MIS-1 line of black medick is shown under conditions of a low available phosphorus level.

Keywords: *arbuscular mycorrhiza, Medicago lupulina, Rhizophagus irregularis, phosphorus deficiency*