

УДК 633.352:575.222.75:631.527.42

ИЗУЧЕНИЕ КОНТРОЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОЗА У РАЗНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ МУТАНТОВ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЕГЕТАТИВНЫХ ПРИВИВОК

© 2012 г. Е.Ю. Власова, К.К. Сидорова, М.Н. Глянченко, Т.М. Мищенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: sidorova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 26 марта 2012 г. Принята к публикации 25 апреля 2012 г.

С использованием метода вегетативных прививок по типу «стебель/корень» изучено 8 индуцированных химическими мутагенами симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.). Установлено, что у бесклубеньковых мутантов К20а и К1005м, мутантов с неэффективными клубеньками К287 и К1а, а также суперклубеньковых мутантов К10а и К12а симбиотические признаки определяются корнем. Напротив, у суперклубеньковых мутантов К301 и К22а этот признак контролируется стеблем. Сделан вывод о том, что у суперклубеньковых мутантов К10а и К12а, с одной стороны, и К301 и К22а – с другой, реализуются разные механизмы формирования признака супернодуляции.

Ключевые слова: горох, *Pisum sativum*, симбиотические мутанты, нодуляция, азотфиксация, вегетативные прививки.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс фиксации молекулярного азота воздуха бобовыми растениями является результатом их симбиотического взаимодействия с бактериями родов *Rhizobium*, *Sinorhizobium* и *Bradyrhizobium*. У макро- и микросимбионтов имеются свои системы генов, контролирующей формирование симбиоза и его функционирование, которые находятся в сложном взаимодействии друг с другом. В течение последних трех десятилетий много внимания было уделено исследованиям симбиотического процесса со стороны макросимбионта. При помощи создания и изучения коллекций спонтанных и индуцированных симбиотических мутантов к настоящему времени у разных видов бобовых растений выявлено свыше 100 генов, мутации которых влияют на разные стадии становления и функционирования симбиоза. Самое большее число симбиотических генов, свыше 30, идентифицировано у гороха посевного (*Pisum sativum* L.), традиционного модельного объек-

та генетических исследований. Большинство из них определяют моногенный рецессивный характер наследования мутантных симбиотических признаков, для многих из них установлена хромосомная локализация (LaRue, Weeden, 1992; Сидорова, Ужинцева, 1992, 1994; Kneen *et al.*, 1994; Sagan *et al.*, 1994; LaRue *et al.*, 1996; Сидорова, Шумный, 1997). Очевидно, что процесс нодуляции находится под контролем растения-хозяина, именно генотип растения определяет число формирующихся клубеньков, их размеры, морфологию и ультраструктуру бактериальной ткани. Способность формировать азотустойчивый симбиоз также зависит от генотипа макросимбионта.

Спектр симбиотических мутантов растений включает несколько основных типов: бесклубеньковые (*nod*⁻), с ограниченной неустойчивой нодуляцией (*nod*^{+/-}), с неэффективными клубеньками (*nod*⁺*fix*⁻), с гипернодуляцией (повышенным количеством клубеньков, в 2–4 раза выше нормы, высокой азотфиксацией и умеренной устойчивостью к нитратам (*Nod*⁺*fix*⁺),

суперклубеньковые (с избыточным количеством клубеньков, в 10–15 раз выше нормы, высокой азотфиксацией и высокой устойчивостью к нитратам, $nod^{+++}fix^{++}$ nts).

Последний тип мутантов представляет собой особый интерес, так как у него, очевидно, нарушен авторегуляционный контроль нодуляции, описанный у люцерны (Caetano-Anolles, Bauer, 1988), затем изученный у суперклубенькового мутанта сои (Caetano-Anolles, Gresshoff, 1991; Gresshoff, 1993) и позднее в симбиотической системе горох – клубеньковые бактерии (Sagan, Gresshoff, 1995; Li *et al.*, 2009). Суть его заключается в том, что в норме сформировавшиеся ранее клубеньки, когда их количество достигает определенного критического числа, сигналом в стебель, а затем ответным – из стебля в корень системно подавляют образование новых клубеньков в более молодых частях корневой системы, тем самым препятствуя избыточной нодуляции.

Факторы, влияющие на нодуляцию, могут продуцироваться в различных частях растений. При изучении симбиотических мутантов для установления места экспрессии генов, контролирующих нодуляцию, метод прививок по типу «корень/стебель» одним из первых использовал Натман (Nutman, 1949, 1956). Он изучал взаимодействие с ризобиями химерных растений клевера лугового, надземная часть которых имела генотип мутантного типа, а корень – дикого типа и наоборот. Было установлено, что у этого вида отсутствие нодуляции (фенотип nod^{-}), реализуемое при гомозиготности по аллелю *r*, определяется корнем. То есть химерные растения, имевшие корень дикого типа, формировали нормальные клубеньки, а растения, имевшие мутантный корень, были неспособны к нодуляции.

В последующем такие работы были проведены на целом ряде культур. Было установлено, что фенотип nod^{-} у изученных мутантов бобов, сои, фасоли и гороха в большинстве случаев определялся корнем, однако для гороха описан также контроль одновременно со стороны корня и стебля (Postma *et al.*, 1988). Фенотип $nod^{+/-}$ в разных случаях определялся как корнем, так и стеблем. Фенотип fix^{-} у разных культур во всех изученных случаях зависел от корня. Суперклубеньковый фенотип nod^{+++} у первых исследованных мутантов сои зависел от стебля (Delves

et al., 1986; Lee *et al.*, 1991), затем был описан контроль этого признака со стороны корня, а также стебля и корня одновременно (Abd-Alla, 2001; Ikeda, 2001). Точно так же у большинства изученных мутантов гороха признак супернодуляции находится под контролем стебля (Sagan, Duc, 1996), однако для него отмечен и контроль этого признака со стороны корня (Postma *et al.*, 1988). У гороха описан случай, когда факторы, влияющие на нодуляцию, поступали в корень из семядолей (Phillips, 1971).

Таким образом, оказывается, что большинство симбиотических генов бобовых экспрессируются в корне и лишь немногие – в стебле, т. е. в данном случае контроль формирования симбиоза имеет системный характер. Как правило, такой контроль обнаруживается при изучении мутаций, вызывающих избыточную нодуляцию или, иначе, суперклубеньковость (фенотип nod^{+++}).

В Институте цитологии и генетики СО РАН создана и поддерживается коллекция из 40 константных симбиотических линий гороха M10–M12 поколений, представляющих все основные типы симбиотических мутаций (Сидорова, Шумный, 2003). Каждая линия создана на основе одного исходного мутантного события. Кроме 40 мутантов, изолированных непосредственно по симбиотическим признакам в M2–M3 поколениях, в коллекции представлены мутанты M12–M17 поколений, которые были выделены по морфологическим признакам, а изменения в нодуляции и азотфиксации у них были обнаружены при дальнейшем изучении.

Целью настоящей работы было установить, со стороны какого органа растения, корня или стебля осуществляется контроль нодуляции и азотфиксации разных типов симбиотических мутаций. Для этого были проведены эксперименты с использованием реципрокных прививок по типу «корень/стебель» или «стебель/корень» мутантов с их исходными формами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опыты были включены 8 симбиотических мутантов M10–M12 поколений: бесклубеньковые (nod^{-}) – K1005m, K20a; с отсутствием азотфиксирующей активности ($nod^{+}fix^{-}$) – K287,

K1a; суперклубеньковые ($nod^{+++}fix^{+nts}$) – K301, K10a, K12a, K22a, а также их исходные формы – сорта гороха Рамонский 77, Рондо и морфологический мутант K511, обладающие нормальной нодуляцией и азотфиксацией ($nod^{+}fix^{+}$).

Все мутанты были получены с использованием метода химического мутагенеза. Суперклубеньковый мутант K301 ($nod^{+++}fix^{+nts}$) и мутант с неэффективными белыми клубеньками K287 ($nod^{+}fix^{-}$) были индуцированы из сорта гороха Рамонский 77 с использованием нитрозозтилмочевины (НЭМ).

Бесклубеньковый мутант K20a (nod^{-}) также индуцирован из сорта Рамонский 77, но с использованием в качестве мутагена этилметансульфоната (ЭМС).

Бесклубеньковый мутант K1005m (nod^{-}) выделен из низкорослого мутанта K511, обладающего нормальной нодуляцией (nod^{+}), который ранее был получен из сорта Тордаг при обработке семян ЭМС.

Мутант с неактивными клубеньками K1a ($nod^{+}fix^{-}$), а также суперклубеньковые мутанты K10a, K12a и K22a ($nod^{+++}fix^{+nts}$) индуцированы из сорта Рондо с использованием ЭМС. Вид корневой системы сорта Рондо и суперклубеньковых мутантов K10a и K22a представлен на рис. 1.

Все включенные в данную работу мутанты представляют собой по отношению к их исходным формам моногенные рецессивные мутации. Мутанты K301 и K287 – с плеiotропным эффектом. У суперклубенькового мутанта K301 в плеiotропный комплекс входит признак фасциации стебля, у мутанта с неэффективными клубеньками K287 стебель с укороченными междоузлиями. Признак формы стебля наследуется у них вместе с симбиотическими признаками. С использованием суперклубенькового мутанта K301 идентифицирован и локализован на хромосомной карте гороха в V группе сцепления ген *Nod4-nod4*, рецессивный

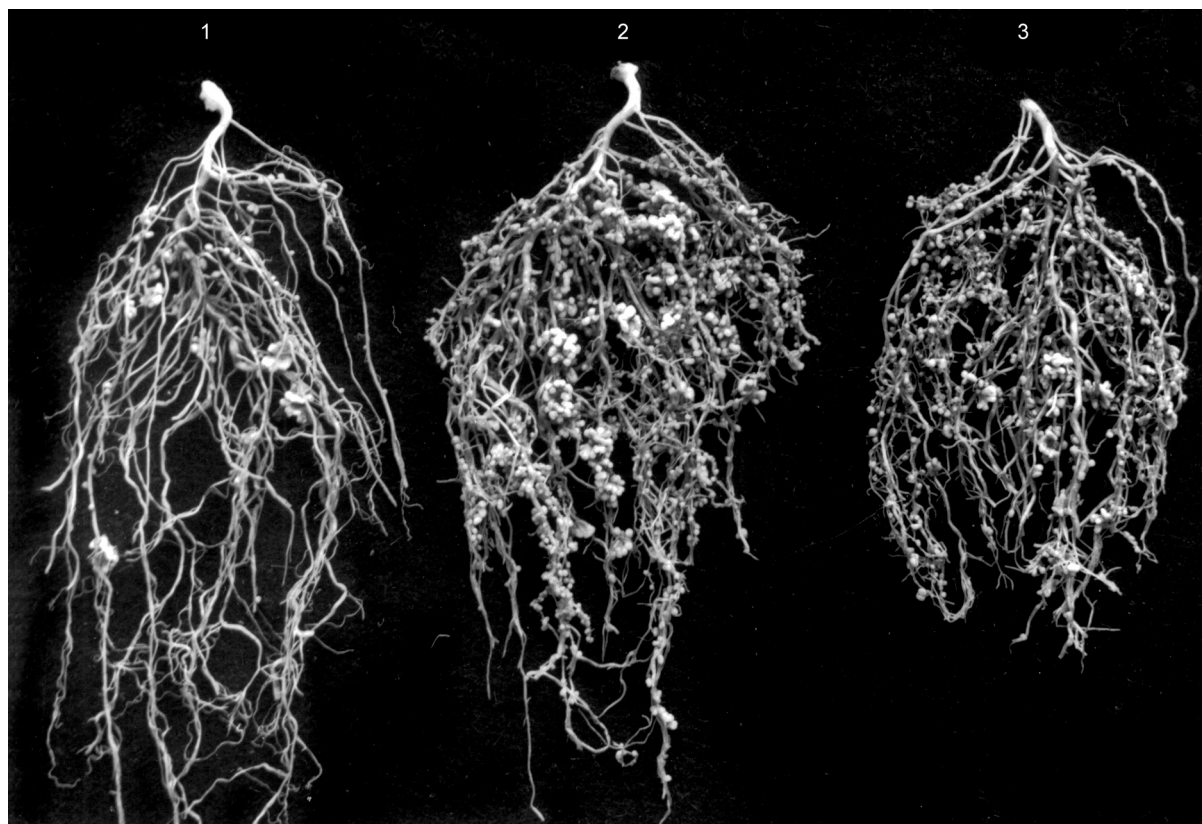


Рис. 1. Корни растений гороха.

1 – сорт Рондо, 2 – суперклубеньковый мутант K10a (*nod3*), 3 – суперклубеньковый мутант K22a (*nod6*).

аллель которого контролирует супернодуляцию (Сидорова, Ужинцева, 1992, 1994).

При проведении прививок за основу была принята методика, подробно описанная исследователями из Нидерландов (Postma *et al.*, 1988). Семена мутантов и их исходных форм проращивали в предварительно прокаленном кварцевом песке, увлажняя его прокипяченной водопроводной водой. Операции прививок проводили, когда проростки достигали 4–5 см в высоту методом клиновидной прививки с разрезом в области эпикотилия. Подвой и привой удерживали вместе с помощью пластиковых трубочек длиной до 1 см, аккуратно надвигаемых на область прививки со стороны подвоя (рис. 2). После проведения прививок растения, обернутые влажной фильтровальной бумагой, несколько дней выдерживали в условиях 100 %-й влажности в пластиковых контейнерах.

Для определения влияния самой операции прививки на нодуляцию и азотфиксацию в

качестве контроля использовали привитые растения, для получения которых в качестве привоя и подвоя использовали разные растения одного мутанта или сорта, т. е. прошедшие через прививки «сам на себя».

Инокуляцию клубеньковыми бактериями проводили перед высадкой химерных растений на постоянное место выращивания, используя штамм 250a *Rhizobium leguminosarum*, любезно предоставленный нам Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург).

Растения выращивали в теплице на субстрате из смеси керамзита с вермикулитом, в стеллажах и в сосудах. В стеллажах использовали стандартный для гидропонных теплиц питательный раствор (Чесноков, Базырина, 1957). При выращивании в сосудах вносили стартовую дозу азота только в начальный период роста в количестве 20 % от полной нормы. Режим освещения

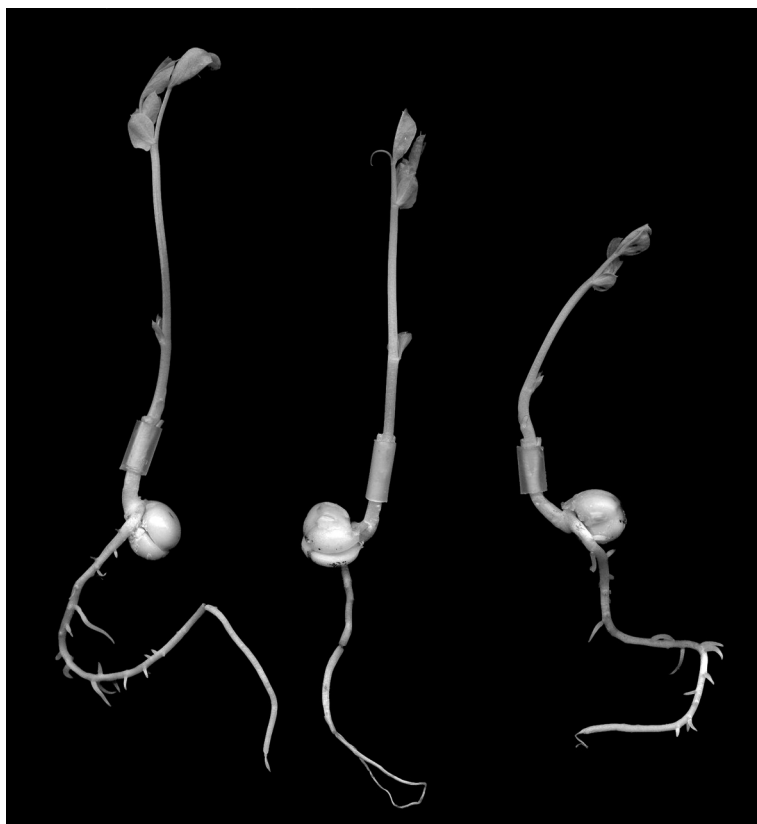


Рис. 2. Химерные растения гороха в первые сутки после прививки.

день/ночь – соответственно 16/8 ч. Температура 20–22 °С днем и 15–17 °С ночью.

Анализ нодуляции и оценку азотфиксирующей способности проводили в стадии начала цветения растений. Активность нитрогеназы определяли ацетиленовым методом (Hardy *et al.*, 1968) на газовом хроматографе «Цвет-500».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение нодуляции и азотфиксации у химерных растений, полученных в результате реципрокных прививок симбиотических мутантов с их исходными формами, а также растений, прошедших через прививки «сам на себя» (табл. 1),

Таблица 1

Характер нодуляции и азотфиксации у химерных растений, полученных в результате реципрокных прививок между симбиотическими мутантами и их исходными формами, а также прививок «сам на себя» и орган, контролирующий их формирование

Стебель/корень	Изучено растений	Тип нодуляции и азотфиксации	Контроль формирования симбиотических признаков
Бесклубеньковые мутанты (nod^-)			
К20а/К20а	13	К20а	
Рамонский 77/К20а	17	К20а	корень
К20а/Рамонский 77	19	Рамонский 77	корень
К1005м/К1005м	7	К1005м	
К511/К1005м	12	К1005м	корень
К1005м/К511	11	К511	корень
Мутанты с неэффективными клубеньками ($nod^{+}fix^{-}$)			
К287/К287	18	К287	
Рамонский 77/ К287	15	К287	корень
К287/Рамонский 77	16	Рамонский 77	корень
К1а/К1а	9	К1а	
Рондо/К1а	19	К1а	корень
К1а/Рондо	19	Рондо	корень
Суперклубеньковые мутанты ($nod^{+++}fix^{++nts}$)			
К10а/К10а	4	К10а	
Рондо/К10а	12	К10а	корень
К10а/Рондо	7	Рондо	корень
К12а/К12а	13	К12а	
Рондо/К12а	13	К12а	корень
К12а/Рондо	16	Рондо	корень
К22а/К22а	5	К22а	
Рондо/К22а	10	Рондо	стебель
К22а/Рондо	18	К22а	стебель
К301/К301	18	К301	
Рамонский 77/К301	20	Рамонский 77	стебель
К301/Рамонский 77	17	К301	стебель
Исходные формы ($nod^{+}fix^{+}$)			
Рамонский 77/Рамонский 77	15	Рамонский 77	
Рондо/Рондо	16	Рондо	
К511/К511	14	К511	

показало, что у бесклубеньковых мутантов K1005m и K20a (*nod*⁻), а также у мутантов с неактивными клубеньками K287 и K1a (*nod*⁺*fix*⁻) симбиотические признаки контролируются корнем. На основании этого можно предположить, что гены, мутации которых определяют эти симбиотические признаки в данных случаях, экспрессируются в корне. Эти результаты согласуются с многочисленными литературными данными, в которых у гороха и других бобовых культур отмечен контроль формирования этих симбиотических признаков со стороны корня.

У суперклубеньковых мутантов K301 и K22a (*nod*⁺⁺⁺*fix*⁺⁺⁺*nts*) проявление признака супернодуляции зависит от стебля. Таким образом, гены, мутации которых приводят к супернодуляции в этом случае, предположительно экспрессируются в стебле, а контроль признака имеет системный характер и, скорее всего, связан с нарушением механизма авторегуляции нодуляции.

У суперклубеньковых мутантов K10a и K12a, напротив, характер нодуляции зависит от корня. Можно предположить, что у них мутации, определяющие признак супернодуляции, экспрессируются в корне, а не в стебле.

Сама операция прививки не оказывала влияния на характер нодуляции, а также наличие или отсутствие азотфиксирующей активности клубеньков у растений мутантов и сортов, хотя и приводила к некоторому снижению их числа по сравнению с обычно наблюдаемым у растений того же мутанта или сорта при тех же условиях выращивания, что можно объяснить ослаблением растений после операции и затратами ассимилятов на восстановление поврежденных тканей.

В рамках программы по выявлению симбиотических генов нами ранее были проведены скрещивания изучаемых в данной работе мутантов как с исходными сортами, так и фенотипически сходных мутантов между собой на аллелизм с привлечением в исследования симбиотических мутантов из американской коллекции, маркированных разными *sum*-генами, а также скрещивания между мутантами разных типов. Было установлено, что мутанты K10a и K12a аллельны по мутантному гену, определяющему супернодуляцию. Эти же мутанты оказались аллельными с суперклубеньковым мутантом *nod3* из американской коллекции.

Следует отметить, что наши суперклубеньковые мутанты были индуцированы на четыре года раньше, чем мы получили мутант *nod3* из США. Было сделано заключение, что мутанты K10a и K12a, контролирующие супернодуляцию, представляют собой новый аллель гена *nod3*. Для мутанта *nod3* в опытах с вегетативными прививками по типу «корень/стебель» исследователями из Нидерландов был установлен контроль нодуляции со стороны корня (Postma *et al.*, 1988). Таким образом, наши данные подтверждают сделанные ими выводы.

Другой суперклубеньковый мутант, K22a, также полученный из сорта Рондо, у которого признак супернодуляции оказался под контролем стебля, как и у суперклубенькового мутанта K301, полученного из сорта Рамонский 77, по нашим данным, является неаллельным с мутантами *nod3* (K10a, K12a) и *nod4* (K301). Мутация у него была обозначена символом *nod6*, ген локализован в VII группе сцепления (Sidorova *et al.*, 2003). Очевидно, что гены *nod4* (K301) и *nod6* (K22a), с одной стороны, и ген *nod3* (K10a, K12a), с другой стороны, контролируют разные механизмы и/или этапы формирования признака супернодуляции у гороха.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что фитогормоны участвуют в формировании и развитии клубеньков, а инокуляция бобовых клубеньковыми бактериями меняет их гормональный статус (Hirsch, Fang, 1994; Павлова, Лутова, 2000; Stougaard, 2000). В частности предполагается, что ауксин играет особую роль в механизме авторегуляции клубенькообразования и формировании признака супернодуляции у бобовых (Gresshoff, 1993). Эти выводы подтверждаются и данными по изучению уровней фитогормонов у разных типов симбиотических мутантов из нашей коллекции (Холодарь и др., 2001). По нашим данным, мутант K301 (*nod4*), у которого признак супернодуляции находится под контролем стебля, в фазу цветения по содержанию ауксина в корнях превышал исходный сорт Рамонский 77 в 10 раз ($154,5 \pm 35,0$ и $15,0 \pm 2,0$ нг/г сырой вегетативной массы корня соответственно). Содержание ауксина в корнях в ту же фазу цветения у мутанта K10a (*nod3*), у которого признак супернодуляции определяется корнем, было практически на уровне его исходного сорта

Рондо (900 ± 100 и 950 ± 250 нг/г сырой массы корня соответственно). Следует отметить, что у мутантов К301 и К10а существенно отличались и сами величины этого показателя.

Наличие плеiotропного эффекта у мутантов, у которых кроме нодуляции изменена форма стебля, а также особенностей мутантов, установленных при реципрокных прививках их с исходными сортами, объясняет появление в F_2 при скрещивании между собой мутантов разного типа, представляющих интерес в генетическом отношении – двойных рецессивов. Так, в результате скрещивания суперклубенькового мутанта К301, имеющего фасциированный стебель, с мутантом К287 с неэффективными белыми клубеньками и компактным стеблем в F_2 выщеплялись растения, которые имели фасциированный стебель, такой же, как у мутанта К301, и белые неэффективные клубеньки, как у мутанта К287. При скрещивании суперклубенькового мутанта К301 с бесклубеньковым мутантом К1005М двойные рецессивы в F_2 имели следующий фенотип – фасциированный стебель и отсутствие клубеньков (табл. 2).

Реципрокные прививки и скрещивания симбиотических мутантов разных типов позволяют изучать контроль формирования симбиотических признаков и взаимодействие разных симбиотических генов в одном генотипе.

Работа частично финансировалась по программе Президиума РАН № 25 подпрограммы 11.9. «Биоразнообразие и динамика генофондов», проект № 26.27.3

ЛИТЕРАТУРА

- Павлова З.Б., Лутова Л.А. Клубенькообразование как модель для изучения дифференцировки у высших растений // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 1173–1188.
- Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Использование мутантов для выявления генов, контролирующих симбиотические признаки у гороха // Генетика. 1992. Т. 28. № 4. С. 144–151.
- Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Локализация мутантного гена *nod4*, контролирующего супернодуляцию у гороха // Докл. РАН. 1994. Т. 336. № 6. С. 847–849.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Новый ген гороха (*Pisum sativum* L.) *Nod5-nod5*, контролирующий нодуляцию // Докл. РАН. 1997. Т. 353. № 5. С. 703–704.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Создание и генетическое изучение коллекции симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 501–509.

Таблица 2

Дигибридное расщепление в F_2 по двум симбиотическим генам

Гибрид	Расщепление при 9 : 3 : 3 : 1	χ^2	P
Мутант К301(<i>nod4</i>) × мутант К287(<i>fix</i>)	$\frac{Nod4 - Fix -}{255} : \frac{nod4 - nod4}{93} : \frac{Fix -}{89} : \frac{fix -}{22}$	2,21	$0,60 > P > 0,50$
Мутант К301(<i>nod4</i>) × мутант К1005М(<i>sym</i>)	$\frac{Nod4 - Sym -}{131} : \frac{nod4 - nod4}{37} : \frac{Sym -}{34} : \frac{nod4 - nod4}{11}$	2,55	$0,50 > P > 0,40$
Мутант К287(<i>fix</i>) × мутант К1005М(<i>sym</i>)	$\frac{Fix - Sym -}{213} : \frac{fix - fix}{73} : \frac{Sym -}{95} : \frac{fix - fix}{27}$	5,9	$0,20 > P > 0,10$

Примечание. Мутанты: К301 – суперклубеньковый; К287 – с неэффективными белыми клубеньками; К1005М – бесклубеньковый.

- Холодарь А.В., Сидорова К.К., Шумный В.К. Изучение уровня фитогормонов у разных типов симбиотических мутантов гороха // Генетика. 2001. Т. 37. № 11. С. 1517–1521.
- Чесноков В.А., Базырина Е.Н. Выращивание растений без почвы на искусственных средах // Вестн. с.-х. науки. 1957. № 4. С. 121–128.
- Abd-Alla M.H. Regulation of nodule formation in soybean-Bradyrhizobium symbiosis is controlled by shoot or/and root signals // Plant Growth Regulation. 2001. V. 34. No. 2. P. 241–250.
- Caetano-Anolles G., Bauer W.D. Feedback regulation of nodule formation in alfalfa // Planta. 1988. V. 175. P. 546–557.
- Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. Plant genetic control of nodulation // Annu. Rev. Microbiol. 1991. V. 45. P. 345–382.
- Delves A.C., Mathews A., Day D.A. *et al.* Regulation of the soybean-Rhizobium nodule symbiosis by shoot and root factors // Plant Physiol. 1986. V. 82. P. 588–590.
- Gresshoff P.M. Molecular genetic analysis of nodulation genes in soybean // Plant Breed. Rev. 1993. V. 11. P. 275–318.
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K. *et al.* The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. 1968. V. 43. No. 8. P. 1185–1207.
- Hirsch A.M., Fang Y. Plant hormones and nodulation: what's the connection? // Plant Mol. Biol. 1994. V. 26. P. 5–9.
- Ikedo J. Analysis of regulation site and manner of abundant nodulation in a soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar, Kitamusume, using grafting techniques // Soil Sci. Plant Nutr. 2001. V. 47. No. 4. P. 703–710.
- Kneen B.E., Weeden N.F., LaRue T.A. Nonnodulating mutants of *Pisum sativum* (L.) cv. Sparkle // J. Hered. 1994. V. 85. No. 2. P. 129–133.
- LaRue T.A., Weeden N.F. The symbiosis genes of pea // Pisum Genet. 1992. V. 24. P. 5–12.
- LaRue T.A., Temnykh S., Weeden N.F. *Sym18*, a novel gene conditioning altered strain specificity in *Pisum sativum* cv. Sparkle // Plant and Soil. 1996. V. 180. No. 2. P. 191–195.
- Lee S.H., Ashley D.A., Boerma H.R. Regulation of nodule development in supernodulating mutants and wild-type soybean // Crop Sci. 1991. V. 31. No. 3. P. 688–693.
- Li D.X., Kinkema M., Gresshoff P.M. Autoregulation of nodulation (AON) in *Pisum sativum* (pea) involves signaling events associated with both nodule primordia development and nitrogen fixation // J. Plant Physiol. 2009. V. 166. No. 9. P. 955–967.
- Nutman P.S. Nuclear and cytoplasmic inheritance of resistance to infection by nodule bacteria in red clover // Heredity. 1949. V. 3. P. 263–291.
- Nutman P.S. The influence of the legume in root-nodule symbiosis: a comparative study of host determinants and functions // Biol. Rev. 1956. V. 31. P. 109–151.
- Postma J.G., Jacobsen E., Feenstra W.J. Three pea mutants with an altered nodulation studied by genetic analysis and grafting // J. Plant Physiol. 1988. V. 132. P. 424–430.
- Sagan M., Huguet T., Duc G. Phenotypic characterization and classification of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.) // Plant Sci. 1994. V. 100. P. 59–70.
- Sagan M., Gresshoff P.M. Kinetics of nodule development in pea cv. Frisson and in two supernodulating mutants // Abstr. of the 10th Intern. Congr. on Nitrogen Fixation. St-Petersburg, Russia. 1995. P. 289.
- Sagan M., Duc G. *Sym28* and *sym29*, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum* L.) // Symbiosis. 1996. V. 20. No. 3. P. 229–245.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu. *et al.* A new gene for supernodulation in pea *nod6* // Pisum Genet. 2003. V. 35. P. 28–29.
- Stougaard J. Regulators and regulation of legume root nodule development // Plant Physiol. 2000. V. 124. P. 531–540.
- Phillips D.A. A cotyledonous inhibitor of root nodulation in *Pisum sativum* // Physiol. Plant. 1971. V. 25. P. 482–487.

STUDY OF SYMBIOSIS FORMATION CONTROL IN PEA MUTANTS BY THE VEGETATIVE GRAFT METHOD

E.Yu. Vlasova, K.K. Sidorova, M.N. Glyanenko, T.M. Mishchenko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: sidorova@bionet.nsc.ru

Summary

Eight symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) induced by chemical mutagenesis have been studied by the vegetative graft method in a «stem/root» manner. It has been found that symbiotic traits are controlled by the root in nonnodulating mutants K20a and K1005m, mutants with ineffective nodules K287 and K1a and supernodulating mutants K10a and K12a. In contrast, in supernodulating mutants K301 and K22a these traits are controlled by the stem. It is concluded that different mechanisms control supernodulation in supernodulating mutants K10a and K12a, on the one hand, and K301 and K22a, on the other hand.

Key words: pea, *Pisum sativum*, symbiotic mutants, nodulation, nitrogen fixation, vegetative grafts.