

МНОГОЛИСТОЧКОВОСТЬ ЛЮЦЕРНЫ: ЕЕ ПРИЧИНЫ И ВЛИЯНИЕ

© 2024 г. Н. М. Барсуков^{1,2,*}, Е. С. Леонова^{1,2}, И. С. Зайцев^{1,2}

¹Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, Московская область, Лобня, 141055 Россия

²Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127434 Россия

*e-mail: keeper@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.10.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 02.11.2023 г.

Увеличение облиственности богатой белком люцерны (*Medicago*) возможно не только через селекцию на изменение размеров пластинки листа. Одни из первых сообщений об изучении явления формирования дополнительных листочков, названного впоследствии многолисточковостью, датируются тридцатыми годами XX в. В обзоре упомянуты основные статьи, связанные с изучением признака. Описано строение листа и собрана информация по корреляциям многолисточковости с высотой, междоузлиями, длиной дня, температурой. Указано влияние зародышевой плазмы и методик исследований на получение противоречивых данных. Рассмотрены изначально выдвинутые исследователями предположения об атавистическом характере проявления признака, а позднее и о наличии рецессивной мутации с двумя аддитивными генами, регулирующими экспрессию. Показаны методика нахождения индекса оценки экспрессии многолисточковости, предложенная Крейгом Шиффером, и подтверждения сильного характера наследования признака в классической селекции через рекуррентный отбор. В заключении собраны наиболее значимые гены и семейства генов, прямо или косвенно влияющие на проявление многолисточковости, среди которых *PALM1* и *KNOX*.

Ключевые слова: многолисточковость, *mf*, протеин, люцерна, облиственность, *PALM1*.

DOI: 10.31857/S0016675824030013 **EDN:** DQBTZC

Люцерна — один из лидеров по количеству продуцируемого недорогого протеина с отличным аминокислотным составом, превосходящим сорго-суданковые гибриды в 3 раза, а кукурузу в 2 [1, 2]. Она пригодна к возделыванию в высоких северных широтах с возможностью давать приемлемые урожаи и слабо поражаться болезнями [3]. Плохая приспособленность к влажным кислым почвам и краткосрочным затоплениям корректируется внедрением сортов, полученных благодаря сопряженной симбиотической растительно-микробной селекции с повышенной адаптивностью к абиотическим факторам [4–7]. Большие запасы азота, оставляемые культурой в почве, позволяют значительно сократить использование азотных удобрений для последующих культур и снизить затраты на производство [8].

Однако уровень белка люцерны подвержен сильной вариации [2, 9]. Агротехнические решения для его сохранения подразумевают уборку первого укоса на кормовые цели в фазу бутонизации — начало цветения, а также своевременную сушку [8–11]. Уровни многих аминокис-

лот, хлорофилла и флавоноидов, среди которых апигенин, лютеолин, кверцетин и мирицетин, в этот период в люцерне значительно выше, чем в фазу массового цветения культуры [9, 11, 12]. Поздняя заготовка приводит к сокращению листовой массы, содержащей большое количество белка, повышенному развитию стеблей, а также увеличению доли целлюлозы и лигнина [13–15]. Избыточная влажность в период сушки приводит к потерям хлорофилла, положительно коррелирующего с белком. Наибольшие его потери происходят в первые 12 ч физиологической сушки. Если в этот промежуток выпадают дожди, первый этап высушивания продлевается, и потери хлорофилла значительно увеличиваются [9, 11].

Одним из возможных селекционных решений по увеличению процентного соотношения показателя белка к уровню клетчатки, плохо сказывающейся на качестве корма, служит выявление и отбор растений с повышенной облиственностью для увеличения площади листовой поверхности [16]. Для этого надо отбирать растения с крупными листовыми пластинками или образцы с

дополнительными листочками на черешке, отличающиеся по количеству от дикого растения с тремя листочками [15, 17, 18].

Цель исследования обзорной статьи заключается в изучении информации о причинах и последствиях появления многолисточковости у люцерны с точки зрения селекции и генетики с начала исследований признака, а также его результатов на момент публикации обзора.

ИССЛЕДОВАНИЕ МНОГОЛИСТОЧКОВОСТИ

Наличие дополнительных листьев вызывается мутацией, проявляющейся путем увеличения количества листочков на черешке, по разным данным, от четырех—пяти, до десяти и более [19]; некоторые источники отмечают наиболее распространенными растения с пятью и семью листочками [20, 21]. Есть публикация, сообщающая о существовании образца, созданного в Болгарии, с рекордными 23—24 листочками на лист и приемлемой урожайностью [22]. Вероятность проявления признака многолисточковости, в случае если до этого его преобладание у образца не прослеживалось, может быть очень мала [23].

Одни из первых исследований этого признака за рубежом отсылают в университет Небраски, США. В 1938 г. исследователем Баудером (Bauder), в диссертационной работе, явление многолисточковости именовалось как “odd-leaf”. Выбрав из девяти генотипов, он, для изучения отобрал всего два, из-за низких показателей всхожести семян или низкого процента многолисточковых форм [24, 25]. Баудер предложил дисомный характер наследования для каждого из двух независимых доминантных факторов, при которых один замешан в роли ингибитора, а второй эпистатичен к другому [20, 24, 25]. Также Баудер изучал уровень облиственности среди 50 растений трехлисткового, а также 31 многолисточкового типа. Он установил, что в образцах, у которых многолисточковые листья представляли меньше половины всех листьев, сухое вещество практически не отличалось от растений с многолисточковостью более чем у 50% листьев [20, 24, 25].

Возможно, одним из первых упоминаний этого признака в СССР стала работа “Биолого-анатомическое исследование люцерны (*Medicago sativa* L.)” Е.А. Мокеевой от 1940 г. На рис. 1, созданном на основе иллюстрации из ее работы, изображен тройчатый лист с сосудами и жилками. Е.А. Мокеева указывала, что сосудистый

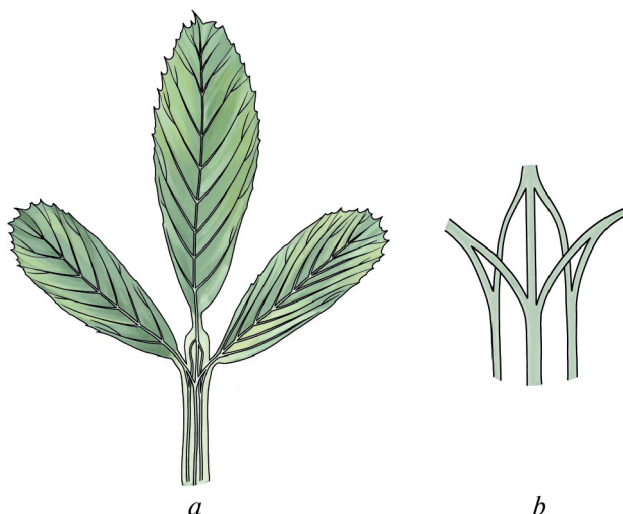


Рис. 1. Иллюстрация тройчатого листа, выполненная по рис. 12 из работы Е.А. Мокеевой [19, с. 26] *а* — общий план листа с сосудами и жилками; *б* — крупный план расхождения пучков боковых и верхнего листочков на второй и третьей ветвях соответственно.

пучок, выходящий из верхнего листочка, разделяется на три пучка, а именно центральный и боковые. Последние расходятся на два, где один из них сливается с центральным, а другой с боковым, формируя тем самым по всей длине общего черешка три сосудистых пучка [19].

Расхождение на три сосуда проводящего пучка в сочленении у верхнего листочка (рис. 1, *б*), как подметила автор, свидетельствует о допустимом формировании двух дополнительных листочков или лопастей, а у соединения боковых листьев возможно восстановление только одного листочка или лопасти. В подтверждение своих выводов исследователь привела наблюдения за многолисточковыми формами, часто обнаруживаемыми в периоды межсезонья при коротком световом дне, и предположила, что данный признак может быть проявлением атавизма. Мокеева утверждала, что проведенные опыты на сокращающемся световом дне на местной селекционной станции позволили получить растения как с увеличенными листовыми пластинками, так и с перистыми формами листьев, однако попытки отобрать из них образцы для исследований в местных условиях не дали результатов [19, с. 29, 113].

Американский исследователь Э. Бингхэм (E. Bingham) предположил, что многолисточковость в диплоидной люцерне находится под контролем как минимум трех генов: *multifoliata* (*mf*) — рецессивного, отвечающего за экспрес-

сию, и двух аддитивных, оказывающих влияние на характер проявления признака [20]. В другой своей работе он повторил опыты Мокеевой в климатической камере с низкими температурами и короткими периодами освещенности, где многолисточковых форм не обнаружил, однако отметил увеличение размера листовых пластинок [19, 20, 25, 27]. В статье Бингхэма 1966 г. появились данные, что черешки многолисточковых листьев имеют размер сосудистых пучков в 2 раза больше, чем обычные формы. Проявилось это за счет рассечения срединного пучка в шейке при появлении дополнительных листьев. Сосудистый рисунок листьев остался прежним и был сходен с другими бобовыми [28].

В 1969 г. появилось первое упоминание об обнаружении многолисточковости у гексаплоидной люцерны [29]. Сравнение обычных растений с мутантными по высоте в 1973 г. выявило противоречия. Длина междоузлий у обычных растений была меньше, чем у мутантных. Авторы посчитали, что данные признаки различаются из-за разной плотности посева [30]. В 1976 г. М. Брик (M. Brick) и соавт. сообщили, что полученные при скрещиваниях многолисточковые растения имели как длинные, так и короткие междоузлия, а корреляция между высотой растения и длиной междоузлий отсутствует [31].

В 1993 г. Н. Хуан (N. Juan) и соавт. подтвердили влияние короткого светового дня на увеличение среднего количества листочков и его значительное взаимодействие с уровнем экспрессии признака. Черешки многолисточковых листьев оказались тяжелее обычных, однако их размеры остались пропорциональными. У мутантных растений была выявлена связь с более длинными междоузлиями у образцов с низкой экспрессией признака. Повышенная экспрессия многолисточковости не сопровождалась снижением урожайности стеблевой массы [32].

В лаборатории селекции люцерны ФНЦ “ВИК им. В. Р. Вильямса” также изучают проявление многолисточковости у растений люцерны разных видов. На рис. 2 изображена вариация листьев, встречаемая на одном из опытных образцов, относящихся к люцерне изменчивой (*Medicago varia* Mart.), а на рис. 3 показаны листья с того же образца, но с представлением разной морфологии листа, проявляющейся на растении.

Группа исследователей из Белгорода утверждает, что растения с мутацией многоли-

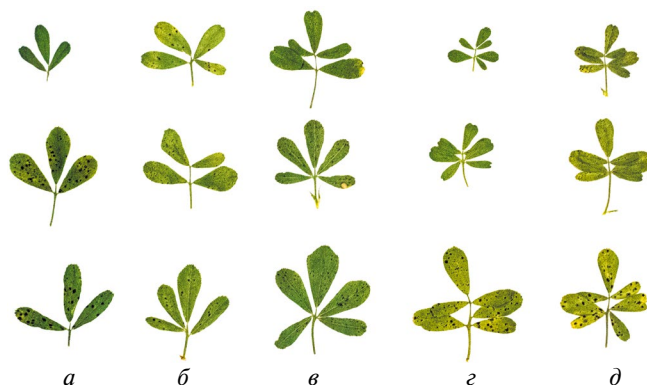


Рис. 2. Вариация листьев на одном из образцов лаборатории селекции люцерны: дикий тип — а (три листочка); многолисточковый — б, в, з, д (от четырех до семи листочков соответственно).

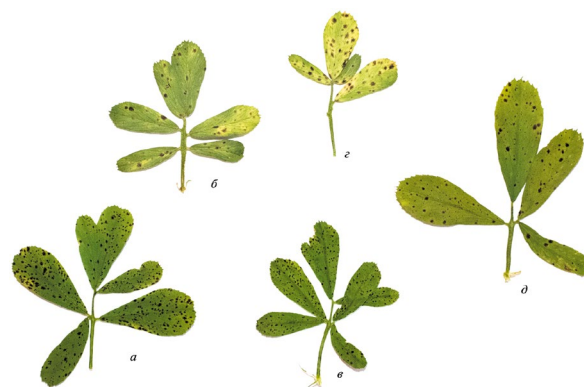


Рис. 3. Листья с разным строением: а, б — расщепление верхнего листочка; в — разнонаправленность боковых листочков; з — “потеря” бокового листа; д — расположение нескольких листочков на одном черешочке. Вероятно, наличие бурой пятнистости на листьях обусловлено поздним их сбором, 31.08.2023 г.

сточковости имеют устойчивость к развитию листостебельных заболеваний, причем наиболее она выражена у образцов с антоциановой окраской и восковым налетом [33]. В другой своей работе они сообщают, что многолисточковые сортопопуляции показывают повышенный выход зеленой массы в условиях высокоплодородных почв и пониженный при возделывании на луговых экотопах [34].

В исследовании, изучающем использование маркеров для отбора растений, устойчивых к засухе, установили, что урожайность многолисточковых растений люцерны в среднем несколько выше, чем у обычных растений. Наиболее продуктивными оказались варианты с низкими побегами, продемонстрировавшие повышение продуктивной массы на 19–20% по сравнению с отобранной высокостебельной и начальной

популяцией. Наиболее низкая продуктивность была отмечена у растений с маркерами, отвечающими за отбор форм с поверхностным залеганием корневой системы и высокими стеблями [35].

По другим данным, есть риск, что многолисточковые формы растений будут менее устойчивы к условиям засушливых регионов в отсутствие искусственного орошения из-за повышенной потери воды ввиду большей площади листовой поверхности, подверженной транспирации [35]. Однако если засуха будет кратковременной и умеренной, уровень клетчатки, в результате ускоренного ферментативного осахаривания целлюлозы, может снизиться, а показатели пеквариваемости улучшиться [36].

Эффективность фотосинтеза у растений с признаками многолисточковости в порядке уменьшения листочков выглядит так: $5 > 4 > 3 > 6 > 7 > 8 > 9$. Лист с пятью листочками показывает значительное превосходство над трехлисточковым растением, демонстрируя максимальную общую эффективность фотосинтеза среди всех изученных образцов. В нем содержится наибольшее количество базальных тел, хлоропластов и крупных зерен крахмала [37].

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИЗНАКА

Люцерна с признаками многолисточковости может содержать в своей генетической базе внушительное разнообразие геномов из достаточно удаленных друг от друга источников [35]. В подтверждение сильного фактора наследования, предположения о котором выдвигались и ранее [25], научная группа из Аргентины отмечает, что при задействовании фенотипического рекуррентного отбора в течение четырех поколений, представленных 40 образцами, признак, отвечающий за многолисточковость, сохраняется в созданной популяции без существенного снижения генетического разнообразия, повышения уровня инбридинга и дрейфа генов, дополнительно с понижением части антипитательных веществ, а также увеличением общей питательной ценности биомассы [38]. Схожие данные получила и российская исследовательская группа, применив три цикла рекуррентного отбора [33].

Увеличение количества листьев из-за мутации многолисточковости может повышать уровень белка и облиственности [23]. Если 60% растений и более в популяции люцерны будут содержать хотя бы один лист с признаком многолисточково-

сти, то их можно отнести к группе с высокой экспрессией признака с коммерческой точки зрения, указывает А. Одорицци (A. Odorizzi). Также он считает, ссылаясь на других авторов, что разные варианты оценки выраженности многолисточковости могут быть результатом противоречивых данных, публикуемых по этой тематике [39]. Нами была обнаружена только одна методика учета экспрессии признака, предложенная К. Шиффером (C. Sheaffer) с соавт. в 1995 г. Согласно ей каждому стеблю растения/растению присваивается оценка от 0 до 5 в зависимости от количества листьев с признаками многолисточковости, и подсчитывается индекс экспрессии признака MultiFoliate Index (MFI) – сумма произведений количества (N^*) растений, относящихся к каждой оценке многолисточковости, разделенная на общее количество растений в популяции. Высокая экспрессия признака подразумевает нахождение в диапазоне от 2.8 и 3 до 3.8, умеренная – от 2 до 3, низкая – 1.4–2.4 [21].

Из-за тетраплоидности генома аллогамной люцерны со сложным морфогенезом листьев, его основу не могли получить длительное время [23, 40]. В мае 2020 г. китайскими учеными была опубликована работа, в которой описывается сборка эталонного генома на уровне хромосом и одновременно протокол его редактирования с помощью системы Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9), позволяющей удалять конкретные участки заданных генов, что, в свою очередь, дает возможность создавать мутанты, способные к аллогамному скрещиванию без передачи потомству трансгенов [40, 41].

Китайские исследователи описывают один из значимых для формирования структуры листьев ген, именуемый *Palmate-like Pentafoliata1* (*PALMI*). Его мутация приводит к образованию пятилисточковых листьев, тогда как наиболее распространенные формы являются трехлисточковыми [15]. Ген *PALMI* отвечает за один из факторов транскрипции цинкового пальца – Cys(2) His(2) [15, 42, 43]. Факторы транскрипции являются крупной группой молекул, контролирующей большое количество генов-мишеней и вызывающей их подавление или активизацию [43, 44].

Детализированный анализ показал, что пара дополнительных примордиев листочков закладывается на ранней стадии формирования зачатка, тем самым свидетельствуя о том, что *PALMI* угнетает в проксимальной области листа дея-

тельность морфогенеза и требуется для поддержки развития трехлисточкового листа. Несмотря на то, что у мутантного растения *palm1* наблюдается увеличенное количество, почти в 3 раза, транскрипта *Single Leaflet 1 (SGL1)*, потеря которого приведет к формированию одиночной пластинки вместо тройчатой, на фоне дикого образца сдвоенный мутант *palm1sgl1* формирует не сложные, а простые листья. По данным исследователей это свидетельствует о том, что *SGL1* подвержен эпистатическому взаимодействию по отношению к *PALM1*, а дополнительные листочки, сформированные под воздействием *palm1*, образованы увеличением деятельности морфогенеза боковых створок примордия [42, 45].

Мутирование хотя бы одного из четырех идентифицированных аллелей *MsPALM1* (*Ms* – приставка к генам из *Medicago sativa*), которые имеют одинаковый экзон, может привести к формированию листа с пятью листочками. У растений *palm1* все четыре аллеля были мутированы. Несколько исследуемых мутантов *palm1* были идентифицированы как химерные [40]. В публикации 2023 г. говорится об обнаружении мутации, приводящей к образованию семилисточковых листьев. Она превращает глутамин 15 транскрипционного фактора *PALM1* в аргинин. В полевых условиях эта доминантная мутация в *PALM1* приводит к значительному повышению уровней облиственности и белка, а также снижению нейтрально-детергентной клетчатки [46].

Сделано предположение, что многолисточковость имеет связь с выраженностью работы генов *Knotted-like Homeobox (KNOX)*, отвечающих за развитие морфогенеза и меристем сложных листьев растений, ввиду их повышенной экспрессии у многолисточковых образцов. Возможно, данные наблюдения можно использовать как маркер многолисточковости [23, 47–50]. *Homeobox* – семейство генов, имеющее общий элемент последовательности ДНК, открытое в 1983 г. [51]. Нарушение работы этих генов в клетках зародыша листа приводит к формированию листьев с выраженными лопастями или зубинами [52]. У люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), как и других бобовых, относящихся к Inverted Repeat Lacking Clade (IRLC), в зоне зарождения листьев *KNOX* находятся в состоянии подавленности, считается что их роль заменяет *SGL1*, *Floricaula (FLO)*, *Lfy (LFY)* и другие ортологи [45, 53–55]. *SGL1*, возможно, оказывает влияние на регуляцию параллельных путей с

KNOX в комплексном развитии, так как постоянная его экспрессия функционально не равнозначна *KNOX* [45]. Данные о том, экспрессируется ли *KNOX* у растений из IRLC, противоречивы [2, 53, 56]. Высказывается предположение также и о влиянии *PALM1* на морфогенетические процессы, чувствительные к работе *KNOX* [42].

Была опубликована научная работа, посвященная изучению генов *SQUAMOSA promoter-binding Protein-Like (SPL)* на уровне всего генома, отвечающих за регуляцию признаков в растениях и их адаптацию к абиотическому стрессу, а также микроРНК 156 (*miR 156*), ответственной за посттранскрипционную регуляцию некоторых *SPL*. Исследователи пришли к выводам, что транскрипты *MsSPL08*, улучшающие адаптационные условия люцерны в условиях засухи и засоления, были значительно подавлены в многолисточковой люцерне, а *MsSPL08*, нацеленный на *miR156*, играет роль в формировании растений с дополнительными листочками и способствует образованию ветвей [43]. В публикации 2023 г. установили, что *MsSPL* отвечают на стрессы, связанные с засухой, засолением и уровнем метилжасмоната, а также что их белки локализованы в ядре [57].

Группа исследователей из Аргентины и Франции во время поиска доминантных мутаций с просматриваемым фенотипом у растений, полученных при помощи *Transposable element of tobacco (Nicotiana tabacum) cell type 1 (Tnt1)*, обнаружила мутантную форму растения люцерны с многолисточковыми листьями разной морфологии [43, 58]. Количество листочков в образце варьировало от трех до семи. Сравнение нового растения с родительской формой показало преимущество первого над вторым по соотношению листьев к стеблям. Особое внимание привлек тот факт, что у половины цветков многолисточкового образца с мутацией обнаружено увеличенное количество лепестков. По заявлению исследователей на 2021 г., это является первым упоминанием доминантной мутации, отвечающей за развитие многолисточковости, и новых возможностей для задействования ретротранспозона *Tnt1* в поисках подобных типов мутаций у полиплоидных видов [58]. Анализ фланкирующих последовательностей *Tnt1* в растении с мутацией, а также его потомстве, свидетельствовал о том, что мутация многолисточковости локализована в хромосоме 3.4 с геном *Nitrogen Assimilation Control protein 39 (MsNAC39)*, который может быть ответственным за контроль онтогенеза ви-

ду родственности с NAC-подобными белками и генами *Cup-Shaped Cotyledon 1 (CUC1)*, *CUC2* у *Arabidopsis thaliana*, участвующих в формировании листьев и цветков [58–60]. Ген *CUC2*, при развитии листового края, содействует формированию точек сближения транспортера оттока ауксина Pin-Formed (PIN1), что приводит к максимальным концентрациям ауксина на зубчатых кончиках листа, который сильно угнетает *CUC2* на кончиках зубцов и способствует их росту [45].

Многие мутации люцерны, полученные как индуцированием мутагенов, так и естественным путем, являются рецессивными, их обнаружению способствовало изучение вида *Medicago truncatula* [40, 46, 58]. Гены *Revoluta (REV)* из семейства *class III HomeoDomain-leucine ZIPper (HD-ZIPIII)*, отвечающие за адаксиальное развитие клеток в листе, при неправильной экспрессии в *Medicago truncatula* формируют новую полярность и структуру сложных листьев вдоль дорсовентральной оси, а также, предположительно, участвуют в изменении уровня гомеостаза ауксина, изменяют сложный рисунок листьев [61].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования причин появления дополнительных листьев были начаты уже довольно давно. Начиная с изучения строения черешка сложного листа, наука дошла до анализа генома и выявления все новых, вероятно взаимосвязанных в работе аллелей. Активное исследование многолисточковости начато с 60-х гг. прошлого века. С 2000-х гг. активно изучается работа генов, дающих начало появлению таких растений.

При изучении строения листьев в 40-х гг. прошлого века было выдвинуто предположение о том, что дополнительные листочки являются проявлением атавизма. Обычно многолисточковость сопровождается наличием от 4 до 10–11 листочков, однако существует публикация о люцерне из Болгарии с впечатляющими 23–24 листочками. Исследование признака часто связано с подсчетом индекса многолисточковости MFI, предложенного К. Шиффером в 1995 г. Однако при работе с ним возникает проблема как интерпретировать значения, попадающие в межинтервальный промежуток категорий экспрессии.

Интерес представляет изучение и сравнение внутреннего строения различных по количеству листочков листьев. Несмотря на их разнообраз-

ное количество у люцерны, отдавать предпочтение в отборе образцам исключительно с самым большим количеством листочков из-за вероятных проблем с эффективностью фотосинтеза не всегда идеальное решение. Оптимальное количество листочков в качестве цели для классического отбора будет четыре–пять.

Особое внимание следует обратить на изучение влияния длины дня ввиду большого количества световых зон в нашей стране. Короткий световой день повышает экспрессию многолисточковости у растений с высоким индексом MFI. Связь высоты с мутантным признаком найдена у растений с длинными междоузлиями и низкой экспрессией многолисточковости. Противоречивые данные, рассмотренные в предыдущих статьях [14, 30, 31], по мнению Н. Хуана и К. Шиффера, связаны с изучением влияния конкретных зародышевых плазм, а не самого признака [30, 32]. Несмотря на это заключение, исследований о связи с высотой по-прежнему недостаточно, как и не хватает данных о влиянии мутантного признака на засухо- и морозоустойчивость, зимостойкость, устойчивость к заболеваниям, изменения площади листовых пластинок, параметры цветения, изменения подземной части. По многим из этих тем публикаций нет вовсе. Большинство исследований корреляций было выполнено более 20 лет назад. Необходимы дополнительные научные работы для подтверждения старых и обнаружения новых связей между признаками.

Во многих работах, затрагивающих проявление и изучение многолисточковости, долгое время сообщали только про *mf*-мутацию, предположение о которой выдвинул Э. Бингхэм в 1965 г. Она представлена как рецессивная и подверженная сильному фактору наследования, что позволяет выделить ее через использование классической селекции. Однако с развитием генетики и возможностей оборудования геном люцерны, сложность которого связана с тетраплоидной природой, удалось представить в сборке на уровне хромосом с учетом аллелей. Смогли обнаружить часть новых генов, прямо или косвенно принимающих участие в развитии признака многолисточковости. Изучением их работы и взаимодействия в роли проявления признака предстоит заниматься еще длительное время. Выделение потенциальных доноров многолисточковости можно осуществлять как многократным рекуррентным отбором и длительным инбридингом, так и через задействование

Таблица 1. Гены, участвующие в проявлении многолисточковости

Гены, семейства генов		Роль в растениях
полное название	аббревиатура	
<i>Palmate-like Pentafoliata 1</i> или <i>PALM1 from Medicago sativa</i>	<i>PALM1</i> или <i>MsPALM1</i>	Отвечает за образование пятилисточковых и, по последним данным, семилисточковых листьев. Участвует в транскрипции цинкового пальца. Некоторые его рецессивные мутанты являлись химерными. Доминантная мутация повышает облиственность и уровень белка
Knotted-like Homeobox	KNOX	Отвечают за развитие сложных листьев у растений, не относящихся к IRLC. Данные о том, синтезируется ли <i>KNOX</i> у IRLC противоречивы, однако у многолисточковых растений их экспрессия повышена. Есть предложения использовать их как маркер многолисточковости
<i>SQUAMOSA promoter-binding Protein-Like</i> или <i>SPL from Medicago sativa type 08</i>	<i>SPL</i> или <i>MsSPL08</i>	Регулируют адаптацию растений к абиотическим стрессам в условиях засухи и засоления. В многолисточковых растениях подавлены и оказывают влияние на образование листьев и ветвей
Nitrogen Assimilation Control protein 39 from <i>Medicago sativa</i>	MsNAC39	С этим геном локализована доминантная мутация многолисточковости в хромосоме 3.4, полученная с помощью ретротранспозона <i>Tnt1</i> . Вероятно, отвечает за контроль онтогенеза, включая вегетативный рост
Revoluta	REV	В результате неправильной экспрессии образуют новую структуру и полярность сложных листьев. Могут быть связаны с проявлением многолисточковости

системы CRISPR/Cas9, а также ретротранспозона *Tnt1*. Гены, описанные в настоящей статье и имеющие связь с многолисточковостью, собраны в табл. 1 и сопровождаются краткой характеристикой их роли в растениях.

В настоящей работе мы хотели собрать некоторое представление о разных причинах, связанных с появлением дополнительных листочков и их влиянием на растения. По данной тематике написано не так много публикаций, большая часть из них относится к зарубежным авторам. Исследователей этого признака в России крайне мало, однако опыты в полевых условиях разных экотопов уже ведутся на юге страны [62, 63]. Мы надеемся, что научные работы по изучению многолисточковости найдут продолжение у исследователей нашей страны.

Авторы выражают благодарность Ю.Г. Шаповой за помощь в подготовке иллюстраций и Г.В. Степановой за консультации во время написания статьи.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № FGFW-2023-0002. Разработать биотехнологию управления процессом сопряженной селекции люцерно-ризобиальных симбиотических систем для создания сортов люцерны с высокой эффективностью симбиоза, обеспечивающей устойчи-

во высокую урожайность в различных условиях возделывания).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пикун, П.Т. Люцерна и ее возможности. Минск: Беларус. навука, 2012. 310 с.
2. Di Giacomo E., Sestili F., Iannelli M. et al. Characterization of *KNOX* genes in *Medicago truncatula* // Plant Mol. Biol. 2008. V. 67. P. 135–150. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9307-7>
3. Донских Н.А. Устойчивость сортов люцерны изменчивой к болезням и вредителям при возделывании их в одновидовых и смешанных посевах // Вест. студ. науч. общества. 2017. Т. 8. № 1. С. 74–76.
4. Sheaffer C.C., Evers G.W., Jungers J.M. Cool-season legumes for humid areas // Forages: The Sci. of Grassland Agriculture. 2020. V. 2. P. 263–275. <https://doi.org/10.1002/9781119436669.ch14>
5. Степанова Г.В. Сорт люцерны изменчивой Таисия // Адаптивное кормопроизводство. 2020. № 2. С. 21–32.

- <https://doi.org/10.33814/AFP-2222-5366-2020-2-21-32>
6. Степанова Г.В. Методы и результаты сопряженной симбиотической селекции люцерны // Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве. 2015. С. 230–234.
 7. Степанова Г.В. Урожайность сортов люцерны изменчивой в стрессовых погодных условиях // Многофункциональное адаптивное кормопроизводство. 2022. С. 70–79.
<https://doi.org/10.33814/МАК-2022-28-76-70-79>
 8. Radović J., Sokolović D., Marković J. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry // Biotechnol. in Animal Husbandry. 2009. V. 25. № 5-6-1. P. 465–475.
<https://doi.org/10.2298/BAH0906465R>
 9. Степанова, Г.В. Влияние погодных условий на химический состав сухого вещества люцерны (*Medicago varia* Mart.) в фазу цветения // Адаптивное кормопроизводство. 2019. № 2. С. 26–39.
<https://doi.org/10.33814/AFP-2222-5366-2019-2-26-39>
 10. Liu L.Y., Jia Y.S., Fan W.Q. et al. An investigation of the main environmental factors affecting the natural drying of alfalfa for hay, and hay quality // Acta Prataculturae Sinica. 2022. V. 31. № 2. P. 121.
<https://doi.org/10.11686/cyxb2020529>
 11. Liu L.Y., Fa W.Q., Cheng Q.M. et al. Multi-omics analyses reveal new insights into nutritional quality changes of alfalfa leaves during the flowering period // Front. in Plant Sci. 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.995031>
 12. Lui A.C., Lam P.Y., Chan K.H. et al. Convergent recruitment of 5'-hydroxylase activities by CYP75B flavonoid B-ring hydroxylases for tricin biosynthesis in *Medicago legumes* // New Phytologist. 2020. V. 228. № 1. P. 269–284.
<https://doi.org/10.1111/nph.16498>
 13. Grev A.M., Wells M.S., Catalano D.N. et al. Stem and leaf forage nutritive value and morphology of reduced lignin alfalfa // Agronomy J. 2020. V. 112. № 1. P. 406–417.
<https://doi.org/10.1002/agj2.20011>
 14. Putnam D.H. Factors influencing yield and quality in alfalfa // The Alfalfa Genome. Cham: Springer, 2021. P. 13–27.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-74466-3_2
 15. Wang T., Zhang W.H. Priorities for the development of alfalfa pasture in northern China // Fund. Research. 2023. V. 3. № 2. P. 225–228.
<https://doi.org/10.1016/j.fmre.2022.04.017>
 16. Косолапова В.Г., Муссие С.А. Питательная ценность люцерны различных сортов в процессе роста и развития // Кормопроизводство. 2020. № 10. С. 17–24.
 17. Шамсутдинов З.Ш., Писковацкий Ю.М., Новоселов М.Ю. и др. Селекция и семеноводство кормовых культур в России: результаты и стратегические направления // Адаптивное кормопроизводство. 2014. № 2. С. 12–23.
 18. Чернявских В.И., Думачева Е.В., Бородаева Ж.А. Основные направления селекции и семеноводства люцерны в Европейской России // Plant Gen. 2019. С. 247.
<https://doi.org/10.18699/PlantGen2019-229>
 19. Мокеева Е.А. Биолого-анатомическое исследование люцерны (*Medicago sativa* L.). Ташкент: Гос. с.-х. изд-во УзССР, 1940. 122 с.
 20. Bingham E.T., Murphy R.P. Breeding and morphological studies on multifoliolate selections of alfalfa, *Medicago sativa* L. // Crop Sci. 1965. V. 5. № 3. P. 233–235.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1965.0011183X000500030010x>
 21. Sheaffer C.C., McCaslin M., Volenec J.J. et al. Multifoliolate leaf expression (leaves with greater than 3 leaflets leaf) // Standard Tests Bull. N. Am. Alfalfa Improvement Conf. 1995.
 22. Stefanov D., Petkova D., Marinova D. et al. Photosynthetic characteristics of multifoliolate alfalfa leaves // Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences. 2013. V. 66. № 7.
<https://doi.org/10.7546/CR-2013-66-7-13101331-12>
 23. Popescu S., Boldura O., Ciulca S. Evaluation of the genetic variability correlated with multileaflet trait in alfalfa // AgroLife Sci. J. 2016. V. 5. № 2. P. 125–130.
 24. Bauder W.W. The Inheritance of the Odd-leaf Character in *Medicago* sp. Lincoln: Univ. Nebraska, 1938.
 25. Brick M.A. A Genetic Study of the Multifoliolate Characteristic in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Tucson: Univ. Arizona, 1975.
 26. Bingham E.T. A Genetical and Morphological Investigation of Multifoliolate Leaves of Alfalfa, *Medicago sativa* L. Ithaca: Cornell Univ., 1964.
 27. Azizi M.R. Inheritance of the Multifoliolate Trait in Tetraploid Alfalfa, *Medicago sativa* L. Tucson: Univ. Arizona, 1980.
 28. Bingham E. T. Morphology and petiole vasculature of five heritable leaf forms in *Medicago sativa* L. // Bot. Gazette. 1966. V. 127. №. 4. P. 221–225.
 29. Bingham E. T., Binek A. Hexaploid alfalfa, *Medicago sativa* L.: origin, fertility and cytology // Canad. J. Genet. and Cytol. 1969. V. 11. № 2. P. 359–366.
 30. Ferguson J.E., Murphy R.P. Comparison of trifoliolate and multifoliolate phenotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Crop Sci. 1973. V. 13. № 4. P. 463–465.
 31. Brick M.A., Dobrenz A.K., Schonhorst M.H. Transmittance of the multifoliolate leaf characteristic into non-dormant alfalfa 1 // Agronomy J. 1976. V. 68. № 1. P. 134–136.
<https://doi.org/10.2134/agronj1976.00021962006800010037x>
 32. Juan N.A., Sheaffer C.C., Barnes D.K. Temperature and photoperiod effects on multifoliolate expression and morphology of alfalfa // Crop Sci. 1993. V. 33. № 3. P. 573–578.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300030030x>
 33. Cherniavskih V.I., Dumacheva E.V., Borodaeva Z.A., Markova E.I. Leaf-spotting diseases as a matter of damage

- of alfalfa breeding populations in an evident multifoliate phase in different cycles of phenotypic recurrent selection // J. Physics: Conference Series. 2021. V. 1942. № 1. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1942/1/012081>
34. Чернявских В.И., Бородаева Ж.А., Думачева Е.В. Устойчивость сортопопуляций *Medicago varia* Mart. к листовым пятнистостям в экотопах юга среднерусской возвышенности // Аграрная наука. 2019. Т. 1. С. 109–112. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-1-109-112>
 35. Singh L., Pierce C., Santantonio N. et al. Validation of DNA marker-assisted selection for forage biomass productivity under deficit irrigation in alfalfa // The Plant Genome. 2022. V. 15. № 1. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20195>
 36. Lin S., Medina C.A., Boge B. et al. Identification of genetic loci associated with forage quality in response to water deficit in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) // BMC Plant Biology. 2020. V. 20. № 1. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02520-2>
 37. Wu Z.N., Wei Z.W., Hou X.Y. et al. Study on photosynthetic characteristics and compound leaf ultrastructure of multifoliate alfalfa // Acta Agrestia Sinica. 2015. V. 23. № 2. P. 223. <https://doi.org/10.11733/j.issn.1007-0435.2015.02.001>
 38. Odorizzi A., Mamani E.M.C., Sipowicz P. et al. Effect of phenotypic recurrent selection on genetic diversity of non-dormant multifoliate lucerne (*Medicago sativa* L.) populations // Crop and Pasture Sci. 2015. V. 66. № 11. P. 1190–1196. <https://doi.org/10.1071/CP14280>
 39. Odorizzi A., Arolfo V., Basigalup D.H. A very non-dormant alfalfa (*Medicago sativa* L.) with high multifoliate expression // Second World Alfalfa Congress. Argentina: Cordoba. 2018. P. 120–124.
 40. Chen H., Zeng Y., Yang Y. et al. Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa // Nat. Communications. 2020. V. 11. № 1. P. 2449. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16338-x>
 41. Bao A., Burrit D.J., Chen H. et al. The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing // Critical Rev. in Biotechnology. 2019. V. 39. № 3. P. 321–336. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554621>
 42. Chen J., Yu J., Ge L. et al. Control of dissected leaf morphology by a Cys (2) His (2) zinc finger transcription factor in the model legume *Medicago truncatula* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 23. P. 10754–10759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003954107>
 43. Min X., Luo K., Liu W. et al. Molecular characterization of the miR156/MsSPL model in regulating the compound leaf development and abiotic stress response in alfalfa // Genes. 2022. V. 13. № 2. <https://doi.org/10.3390/genes13020331>
 44. Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs // Science. 2008. V. 319. № 5871. P. 1785–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1151651>
 45. Wang H., Kong F., Zhou C. From genes to networks: The genetic control of leaf development // J. Integrative Plant Biol. 2021. V. 63. № 7. P. 1181–1196. <https://doi.org/10.1111/jipb.13084>
 46. Gómez C., Jozefkiewicz C., Mozzicafreddo M. et al. The Gln15Arg mutation in the transcriptional factor PALM1 produces multifoliate alfalfa // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2023. V. 152. № 3. P. 677–681. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02429-8>
 47. Bar M., Ori N. Leaf development and morphogenesis // Development. 2014. V. 141. № 22. P. 4219–4230. <https://doi.org/10.1242/dev.106195>
 48. Boldura O.M., Popescu S. KNOX genes expression as a marker of the multileaflet trait in alfalfa // Curr. Op. in Biotechnology. 2013. № 24. P. S124. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.394>
 49. Popescu S., Boldura O. M., Botau D. The KNOX genes involvement in the development of multileaflet trait on tetraploid *Medicago sativa* // 14th Int. Multidisciplinary Sci. Geoconf. SGEM 2014. Sofia: STEF92 Technology, 2014. V. 1. P. 551–558. <https://doi.org/10.5593/SGEM2014/B61/S25.075>
 50. Sorina P., Oana-Maria I.B. The six KNOX genes identification on tetraploid *Medicago sativa*, based on the model plant resources // Romanian Biotechnol. Letters. 2010. V. 15. № 2. P. 33.
 51. Gehring W.J., Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox // Annual Review Genet. 1986. V. 20. № 1. P. 147–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.20.120186.001051>
 52. Ori N., Eshed Y., Chuck G. et al. Mechanisms that control KNOX gene expression in the *Arabidopsis shoot* // Development. 2000. V. 127. № 24. P. 5523–5532. <https://doi.org/10.1242/dev.127.24.5523>
 53. Champagne C.E., Goliber T.E., Wojciechowski M.F. et al. Compound leaf development and evolution in the legumes // The Plant Cell. 2007. V. 19. № 11. P. 3369–3378. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052886>
 54. Moghaddam M., Kazempour-Osaloo S. Extensive survey of the ycf 4 plastid gene throughout the IRLC legumes: Robust evidence of its locus and lineage specific accelerated rate of evolution, pseudogenization and gene loss in the tribe Fabeae // PLoS One. 2020. V. 15. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229846>
 55. Di Giacomo E., Sestili F., Iannelli M.A. et al. Characterization of KNOX genes in *Medicago truncatula* // Plant Mol. Biol. 2008. V. 67. P. 135–150. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9307-7>
 56. Hofer J., Gourlay C., Michael A., Ellis T.N. Expression of a class 1 knotted1-like homeobox gene is down-regulated in pea compound leaf primordia // Plant Mol. Biol. 2001. V. 45. P. 387–398. <https://doi.org/10.1023/A:1010739812836>
 57. Wang Y., Ruan Q., Zhu X. et al. Identification of alfalfa SPL gene family and expression analysis under biotic and abiotic stresses // Sci. Reports. 2023. V. 13. № 1. P. 84.

- <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26911-7>
58. Jozefkiewicz C., Gómez C., Odorizzi A. et al. Expanding the benefits of Tnt1 for the identification of dominant mutations in polyploid crops: A single allelic mutation in the MsNAC39 gene produces multifoliated alfalfa // *Front. in Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 3074.
 59. Mallory A. C., Dugas D. V., Bartel D. P., Bartel B. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. № 12. P. 1035–1046.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.022>
 60. Rubio-Somoza I., Zhou C. M., Confraria A. et al. Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 22. P. 2714–2719.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.058>
 61. Zhou C., Han L., Zhao Y. et al. Transforming compound leaf patterning by manipulating REVOLUTA in *Medicago truncatula* // *Plant J.* 2019. V. 100. № 3. P. 562–571.
<https://doi.org/10.1111/tpj.14469>
 62. Бородаева Ж. А. Анализ исходного материала люцерны изменчивой в различных экотопах центрально-черноземного региона // *Многофункциональное адаптивное кормопроизводство.* 2022. С. 80–86.
 63. Cherniavskih V. I., Dumacheva E. V., Borodaeva Z. A. et al. Features of intra population variability of *Medicago varia* Mart. with the expressed mf-mutation on a complex qualitative characteristics // *EurAsian J. BioSciences.* 2019. V. 13. № 2. P. 733–737.

MULTIFOLIATE ALFALFA: ITS CAUSES AND INFLUENCE

N. M. Barsukov^{a, b, *}, E. S. Leonova^{a, b}, I. S. Zaitsev^{a, b}

^aFederal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Moscow oblast, Lobnya, 141055 Russia

^bRussian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127434 Russia

*e-mail: keeper@yandex.ru

An increase in the leafiness of protein-rich alfalfa (*Medicago*) is possible not only through selection to change the size of the leaf blade. Some of the first reports on the study of the phenomenon of the formation of additional leaves, afterwards called multifoliate, date back to the 30 years of the XX century. This review article mentions the main articles related to the study of the trait. The structure of the leaf is described and information is collected on the correlations of multifoliate with height, internodes, day length and temperature. The influence of germplasm and research methods on obtaining contradictory data is indicated. The assumptions initially put forward by researchers about the atavistic nature of the manifestation of the trait, and later about the presence of a recessive mutation with 2 additive genes regulating expression, are considered. The method of finding the index of evaluation of the expression of multifoliate proposed by Craig Sheaffer and confirming the strong character of inheritance of the trait in classical selection through recurrent selection is shown. In conclusion, the most significant genes and gene families that directly or indirectly affect the manifestation of multifoliate, including *PALM1* and *KNOX*, are collected.

Keywords: multifoliate, *mf*, protein, alfalfa, leafiness, *PALM1*.