

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА ПРИ УЧАСТИИ БИОПРЕПАРАТА И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА

О.Г. ВОЛОБУЕВА, кандидат биологических наук, ORCID ID:0000-0002-5422-0792

РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ – МОСКОВСКАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ К.А.ТИМИРЯЗЕВА

E-mail: ovolobueva@list.ru

Изучена ультраструктура клубеньков растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница, семена которых были обработаны Ризоторфином, Альбитом, Корневином и Эпином-Экстра и растений сои сортов Магева и Свапа, семена которых были обработаны Ризоторфином и Эпином-Экстра. Установлено повышение активности нитрогеназы у растений фасоли сорта Гелиада и сои сорта Свапа при обработке Эпином-Экстра на фоне повышения площади бактериоидов, площади и количества волютина и снижения площади и количества включений поли-β-оксимасляной кислоты (ПОМ). У сорта фасоли Шоколадница и сои сорта Магева проявилось протекторное действие Ризоторфина, под влиянием которого наблюдалось повышение активности нитрогеназы в клубеньках и увеличение площади и количества бактериоидов, включений волютина, при минимальном содержании ПОМ. Наличие в симбиосомах бактериоидов, включений волютина и ПОМ рассматривается как новый дополнительный показатель активности симбиотической системы.

Ключевые слова: фасоль, соя, бобово-ризобиальный симбиоз, биопрепараты, регуляторы роста, ультраструктура клубеньков, бактериоиды, симбиосома, волютин, поли-β-оксимасляная кислота.

Для цитирования: Волобуева О.Г. Повышение эффективности бобово-ризобиального симбиоза при участии биопрепарата и регуляторов роста. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2022; 3(43):26-32. DOI: 10.24412/2309-348X-2022-3-26-32

IMPROVING THE EFFICIENCY OF LEGUME-RHIZOBIUM SYMBIOSIS WITH THE PARTICIPATION OF A BIOLOGICAL PRODUCT AND GROWTH REGULATORS

O.G. Volobueva

RUSSIAN STATE AGRARIAN UNIVERSITY – MOSCOW TIMIRYAZEV AGRICULTURAL
ACADEMY

Abstract: *The ultrastructure of nodules of bean plants of the Heliada and Shokoladnitsa varieties, the seeds of which were treated with Rizotorfin, Albit, Kornevin, and Epin-Extra, and soybean plants of the Mageva and Svapa varieties, the seeds of which were treated with Rizotorfin and Epin-Extra, were studied. An increase in the activity of nitrogenase in bean plants of the Heliada variety and soybean variety Svapa was established when treated with Epin-Extra against the background of an increase in the area of bacteroids, the area and amount of volutin and a decrease in the area and number of inclusions of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB). In the bean variety Shokoladnitsa and soybean variety Mageva, the protective effect of Rizotorfin was manifested, under the influence of which an increase in the activity of nitrogenase in nodules and an increase in the area and number of bacteroids, inclusions of volutin, with a minimum content of PHB, were observed. The presence of bacteroids, volutin and PHB inclusions in symbiosomes is considered as a new additional indicator of the activity of the symbiotic system.*

Keywords: bean, soybean, legume-rhizobium symbiosis, biological products, growth regulators, nodule ultrastructure, bacteroids, symbiosome, volutin, poly- β -hydroxybutyric acid.

Особую и важную роль в повышении продуктивности агроэкосистем отводят бобово-ризобиальному симбиозу, поскольку биологический азот, который усваивают клубеньковые и другие азотфиксирующие микроорганизмы и переводят в доступное для растений состояние, является не только совершенно безвредным для окружающей среды, растений, человека, но и улучшает почвенное плодородие, снижает потребности в азотных удобрениях или полном их отсутствии, способствует поддержанию совершенно безопасной агроэкосистемы и в целом биогеоценоза [1, 2]. Поэтому, повышение эффективности формирования бобово-ризобиального симбиоза является актуальной научной задачей и имеет важное теоретическое и практическое значение для фундаментальной науки и сельского хозяйства. В последние годы для повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза используют биопрепараты и регуляторы роста [3, 4]. Применение биопрепаратов и регуляторов роста обуславливает координацию процессов формирования ультраструктуры клубеньков бобовых растений и соотношения разных групп фитогормонов. Воздействуя на растения экзогенно препаратами, в них изменяется содержание и соотношение эндогенных фитогормонов, приводящие к возможному изменению метаболизма макросимбионта и ризобий, что по-видимому оказывает влияние на ультраструктуру клубеньков и как следствие на активность симбиотической азотфиксации [5].

Цель работы – изучение ультраструктуры клубеньков растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница и сои сортов Магева и Свапа при обработке семян этих растений Ризоторфином и регуляторами роста.

Материалы и методика исследований

Анализ ультраструктуры клубеньковой ткани растений фасоли и сои проводили в периоды наиболее активной азотфиксации: у фасоли – в фазу цветения, у сои в фазу плодообразования. Анализировали свежие клубеньки (чаще всего срединной части). Клубеньки перед фиксацией разрезали бритвой на маленькие кусочки размером 1 мм² и погружали в 0,1М фосфатный буфер (рН 7,4) в 10-кратной повторности. В течение 2,5-3,0 ч при 0°C (в холодной комнате) фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида, после чего клубеньки промывали в фосфатном буфере 3 раза по 30 мин при 0°C и заливали осмиевым фиксатором на ночь (в холодной комнате). Отмытые в фосфатном буфере клубеньки обезвоживали в спиртах возрастающих концентраций и ацетона, затем заливали в смесь эпонов. Фиксацию клубеньков в глутаральдегиде проводили по методу Sabatini. Срезы получали на ультрамикротоме LKB-3 («LKB», Швеция) и помещали на сетки с формваровой подложкой, контрастировали 1%-ным водным раствором уранилацетата и 0,2%-ным цитратом свинца. Препараты просматривали в электронном микроскопе TEMSCAN 100CX2 («JEOL», Япония) (инструментальное увеличение 300000, а ускоряющее напряжение 80 кВ). Применяли фотопластинки для ядерных исследований, когда проводили фотографирование объекта. Морфометрические показания и статистическую обработку электронно-микроскопических исследований проводили на приборе MOP-VIDEOPLAN фирмы «Reichert» (Австрия). Клубеньки у бобовых растений отбирали в результате исследований, проведенных в 2006-2012 гг. Условия проведения опытов изложены ранее [5, 6].

Результаты исследований и их обсуждение

Об эффективности бобово-ризобиального симбиоза судили по показателям ультраструктуры клубеньков, симбиотической азотфиксации и продуктивности растений. В данной статье приводятся исследования по изучению ультраструктуры клубеньков растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница, семена которых были обработаны Ризоторфином, Альбитом, Корневином и Эпином-Экстра и растений сои сортов Магева и Свапа, семена которых были обработаны Ризоторфином и Эпином-Экстра. Метод электронной микроскопии позволил выявить некоторые особенности действия Ризоторфина, Альбита,

Корневина и Эпин-Экстра на эффективность бобово-ризобияльного симбиоза. Определяли площадь симбиосом, бактериоидов, включений поли-β-оксимасляной кислоты (ПОМ) и воллютина и их количество на приборе MOP-VIDEOPLAN с микроскопических фотографий.

Установлено, что во всех вариантах присутствовали бактериоиды. В отдельных вариантах бактериоиды были с сильно развитым перибактероидным пространством (ПБП) (рис.1).

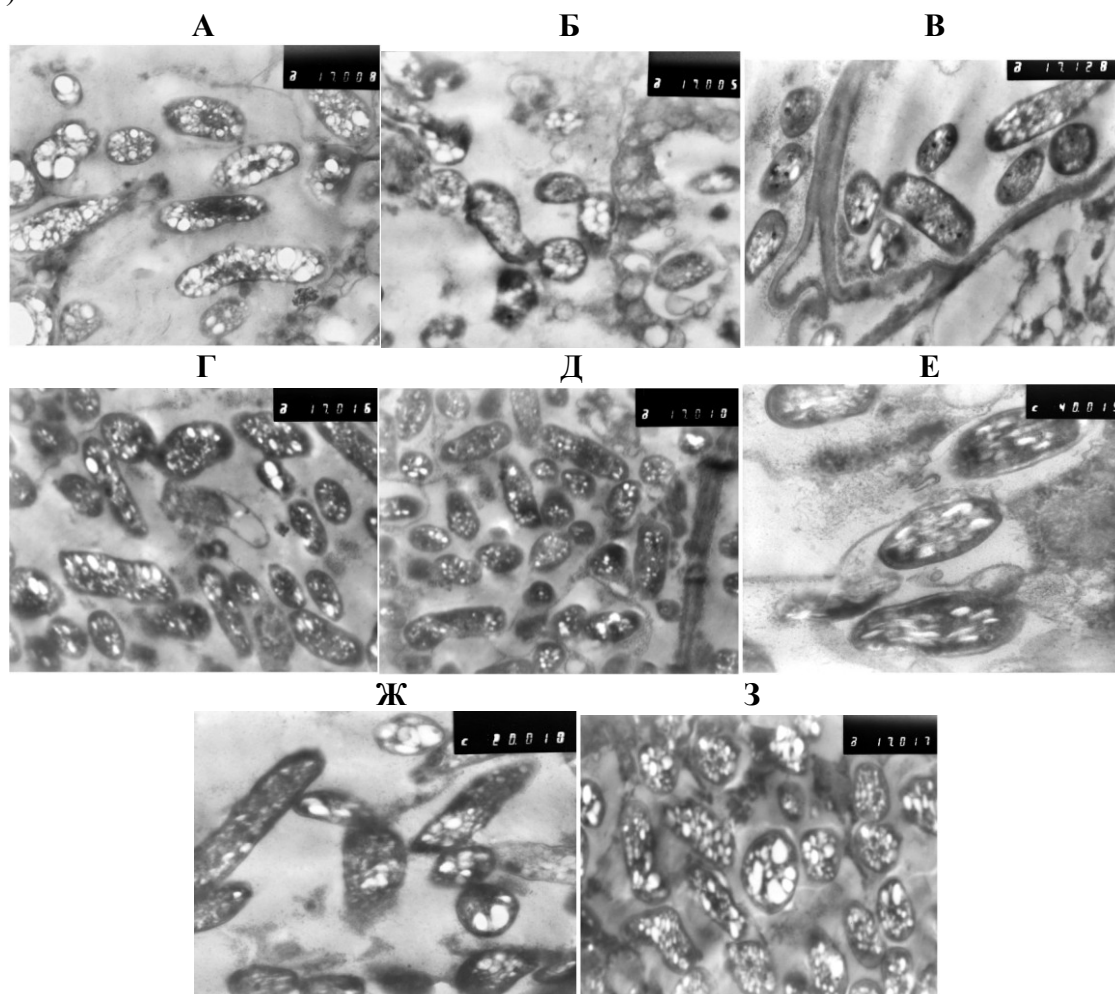


Рис. 1. Ультраструктура клубеньков фасоли:

А – клубеньки фасоли сорта Гелиада, образованные при инокуляции семян Ризоторфином, увеличение 17000; *Б* – клубеньки фасоли сорта Гелиада, образованные при обработке семян Альбитом, увеличение 17000; *В* – клубеньки фасоли сорта Гелиада, образованные при обработке семян Корневином, увеличение 17000; *Г* – клубеньки фасоли сорта Гелиада, образованные при обработке семян Эпином-Экстра, увеличение 17000; *Д* – клубеньки фасоли сорта Шоколадница, образованные при инокуляции семян Ризоторфином, увеличение 17000; *Е* – клубеньки фасоли сорта Шоколадница, образованные при обработке семян Альбитом, увеличение 40 000; *Ж* – клубеньки фасоли сорта Шоколадница, образованные при обработке семян Корневином, увеличение 20000; *З* – клубеньки фасоли сорта Шоколадница, образованные при обработке семян Эпином-Экстра, увеличение 17000

ПБП отводится важная функция – регуляция транспорта веществ и метаболизма формирующихся и функционирующих симбиосом. ПБП было хорошо развито в клубеньках растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница, семена которых были обработаны Альбитом, а также у сорта Гелиада, семена которой были обработаны Эпином-Экстра. Процесс включения в биогенез перибактероидной мембраны (ПБМ) различных мембран растительной клетки имеет не только пространственную, но и временную организацию. Она

в значительной мере типична для биогенеза всех растительных мембран. Сначала активизируется шероховатый эндоплазматический ретикулум. Затем везикулярный транспорт белков идет от эндоплазматического ретикулума через аппарат Гольджи к ПБМ симбиосом. ПБМ, а не бактериальная мембрана, реально контролирует поток и тип углеродных соединений для обеспечения азотфиксирующей активности бактериоидов. Поэтому, симбиосомная мембрана имеет ключевое значение во взаимоотношениях макро- и микросимбионтов [7].

Бактероиды также вносят свой вклад в процесс биогенеза ПБМ путём встраивания в неё мембранных везикул. Чаще всего это достигается за счёт прямой физической ассоциации микросимбионта с ПБМ. Способность бактериоидов к фиксации молекулярного азота теснейшим образом связана с глубокой не только количественной, но и качественной перестройкой их окислительно-восстановительных систем.

В клетках бактериоидов кроме постоянных компонентов, которыми являются рибосомы и внутриклеточные мембранные структуры, могут находиться и непостоянные. К таким непостоянным структурам бактериоидов, прежде всего, относятся различные включения. Это включения гликогена, волютина, липидов, в частности поли-β-оксимасляной кислоты. Волютин – запасное питательное вещество, являющееся источником фосфора и азота для бактерий. Включения волютина вовлекаются в процесс образования АТФ. Процесс симбиотической азотфиксации, осуществляемый клубеньковыми бактериями, достаточно энергозатратный. В результате фиксации азота ризобиями расходуется значительное количество энергии АТФ. В связи с этим, наличие гранул волютина можно рассматривать как один из возможных источников энергии для этого процесса. В наших исследованиях показано, что площадь и количество включений волютина было большим в клубеньках тех растений, в вариантах которых наблюдали наивысшие показатели азотфиксирующей активности в клубеньках растений. ПОМ – поли- β-оксимасляная кислота – липидные включения, которые являются источником энергии для бактерий. Роль ПОМ заключается в основном в регуляции использования фотоассимилятов, поступающих в бактериоиды и по содержанию полимера можно в определенной степени судить об обеспеченности бактериоидов углеводными субстратами. Низкий уровень азотфиксации в клубеньках может определяться неспособностью растения-хозяина ассимилировать весь азот, фиксированный бактериоидами, то есть недостаточным транспортом связанного азота из клубеньков в надземную часть растения. Содержание ПОМ обычно в бактериоидах незначительно именно тогда, когда клетки наиболее активно дышат и фиксируют азот. Обычно, наличие большого количества ПОМ свидетельствует о не высокой азотфиксации.

В наших исследованиях изучение ультраструктуры клубеньков растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница, семена которых были обработаны биопрепаратом и регуляторами роста, показало следующее. В клубеньках растений фасоли симбиосомы образовывались не во всех вариантах. У растений фасоли сорта Гелиада самая большая площадь симбиосом и их количество были в варианте с обработкой Эпином-Экстра на фоне инокуляции Ризоторфином (рис. 1, табл. 1, 2). В этом же варианте отмечено наличие большого количества включений волютина, имеющих большую площадь. Самая большая площадь бактериоидов была в клубеньках растений фасоли сорта Гелиада при обработке Корневином на фоне инокуляции Ризоторфином. Однако количество бактериоидов в клубеньках растений этого сорта было наибольшим в варианте с обработкой только Ризоторфином. В клубеньках растений фасоли сорта Шоколадница наибольшая площадь и количество бактериоидов отмечено в варианте с обработкой биопрепаратом Ризоторфин. У растений фасоли сорта Гелиада наибольшая площадь включений ПОМ и их количество отмечено при обработке Ризоторфином. У растений фасоли сорта Шоколадница большая площадь ПОМ и их количество отмечено в варианте с обработкой Корневином на фоне инокуляции Ризоторфином. Большая площадь включений волютина и их количество отмечены у растений фасоли этого сорта при обработке только Ризоторфином (рис. 1, табл. 1, 2).

Таблица 1

**Изменение ультраструктуры клубеньков растений фасоли
сортов Гелиада и Шоколадница**

Вариант	Площадь, мкм ²			
	Симбиосом	Бактероидов	ПОМ	Волютина
Сорт Гелиада				
Ризоторфин	-	0,091±0,0027	0,033±0,0019	0,014±0,0002
Альбит	1,21±0,05	0,21±0,0058	0,037±0,0020	0,015±0,0004
Корневин	-	0,58±0,027	0,021±0,0013	0,012±0,0003
Эпин-Экстра	2,7±0,13	0,47±0,017	0,023±0,0013	0,018±0,0004
Сорт Шоколадница				
Ризоторфин	-	0,56±0,028	0,023±0,0012	0,033±0,0007
Альбит	2,08±0,085	0,40±0,011	0,40±0,0026	0,016±0,0004
Корневин	-	0,46±0,021	0,057±0,0017	0,016±0,0005
Эпин-Экстра	-	0,51±0,013	0,031±0,0009	0,026±0,0007

Примечание: < – > прочерк здесь и в табл. 2 – отсутствие структур

Таким образом, содержание ПОМ, волютина, ПБП, может служить для некоторых видов *Rhizobium* новой дополнительной характеристикой активности симбиотической системы.

Таблица 2

**Изменение ультраструктуры клубеньков растений фасоли
сортов Гелиада и Шоколадница**

Вариант	Количество			
	Симбиосом	Бактероидов	ПОМ	Волютина
Сорт Гелиада				
Ризоторфин	-	23,56±2,28	1,62±0,08	9,51±0,37
Альбит	10,83±0,78	3,46±0,12	3,21±0,15	8,01±0,46
Корневин	-	11,4±1,49	2,48±0,14	7,40±0,49
Эпин-Экстра	14,22±0,42	4,28±0,14	0,62±0,10	10,41±0,28
Сорт Шоколадница				
Ризоторфин	-	24,70±1,93	1,09±0,06	9,08±0,37
Альбит	7,2±0,61	3,88±0,11	1,69±0,06	6,44±0,25
Корневин	-	15,85±1,97	1,72±0,12	6,10±0,22
Эпин-Экстра	-	16,41±1,05	1,52±0,09	7,58±0,37

Электронно-микроскопическое изучение клубеньков растений сои сортов Магева и Свапа показало наличие во всех вариантах симбиосом и находящихся в них бактериоидов (рис. 2, табл. 3).

В клубеньках растений сои сорта Свапа, семена которой были обработаны препаратом Эпин-Экстра на фоне инокуляции Ризоторфином, наблюдали наличие большого числа симбиосом, бактериоидов, включений волютина, которые имели большую площадь и минимальное количество включений ПОМ.

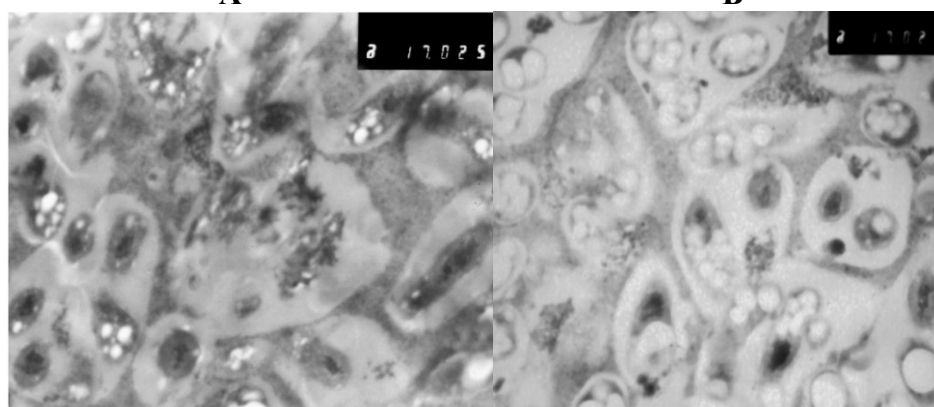
Таблица 3

**Изменение ультраструктуры клубеньков растений сои
сортов Магева и Свапа**

Вариант	Площадь (мкм ²), AREA				Количество, POINT			
	Симбиосом	Бактероидов	ПОМ	Воллутина	Симбиосом	Бактероидов	ПОМ	Воллутина
Магева, Ризоторфин	1,89 ± 0,088	0,33 ± 0,012	0,023 ± 0,001	0,039 ± 0,002	8,43 ± 0,410	3,60 ± 0,18	1,19 ± 0,040	3,25 ± 0,130
Магева, Эпин-Экстра	1,33 ± 0,049	0,26 ± 0,008	0,026 ± 0,001	0,026 ± 0,002	7,23 ± 1,430	2,57 ± 0,082	1,46 ± 0,074	2,51 ± 0,140
Свапа, Ризоторфин	1,55 ± 0,070	0,34 ± 0,013	0,021 ± 0,002	0,030 ± 0,002	5,64 ± 0,800	2,73 ± 0,140	1,6 ± 0,110	3,98 ± 0,230
Свапа, Эпин-Экстра	3,30 ± 0,240	0,49 ± 0,054	0,016 ± 0,001	0,034 ± 0,001	8,08 ± 0,87	3,63 ± 0,220	1,61 ± 0,098	6,30 ± 0,49

А

Б



В

Г

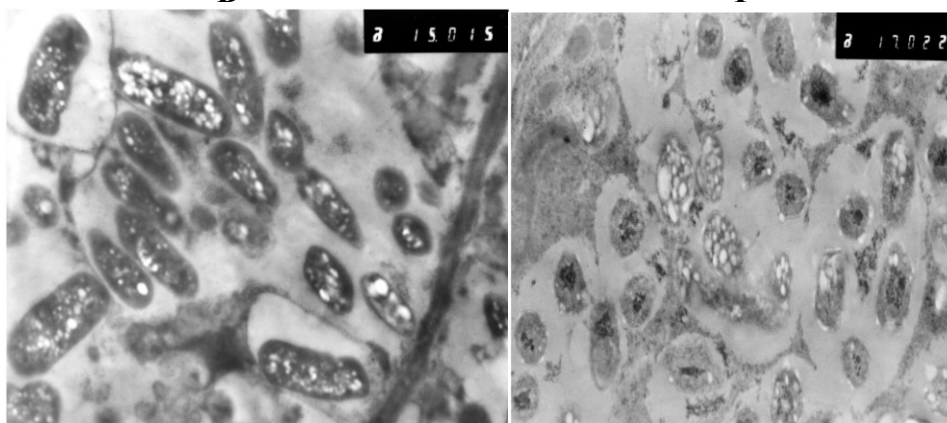


Рис. 2. Ультраструктура клубеньков сои

А – клубеньки сои сорта Магева, образованные при инокуляции семян Ризоторфином, увеличение 17000; Б – клубеньки сои сорта Магева, образованные при обработке семян Эпином-Экстра, увеличение 20000; В – клубеньки сои сорта Свапа, образованные при инокуляции семян Ризоторфином, увеличение 15000; Г – клубеньки сои сорта Свапа, образованные при обработке семян Эпином-Экстра, увеличение 17000.

Таким образом, наличие в симбиосах включений волютина и ПОМ для некоторых видов *Bradyrhizobium japonicum* может служить дополнительным признаком активности симбиотической соево-ризобияльной системы.

Заключение

Исследования особенностей ультраструктуры клубеньков растений фасоли и сои разных сортов при обработке семян этих растений биопрепаратом Ризоторфин и регуляторами роста Альбит, Корневин, Эпин-Экстра показало, что у растений фасоли сорта Гелиада под влиянием Корневина происходило увеличение площади бактериоидов и включений волютина, при минимальном количестве ПОМ. Эти показатели у растений фасоли сорта Шоколадница и сои сорта Магева увеличивались под влиянием Ризоторфина. Обработка семян Эпином-Экстра повышала площадь и количество бактериоидов, включений волютина и снижала площадь и количество ПОМ у растений фасоли сорта Гелиада и сои сорта Свапа. Параметры строения симбиосом: наличие включений волютина, ПОМ, ПБП для некоторых видов *Rhizobium* могут рассматриваться как новый дополнительный показатель активности симбиотической системы и использоваться селекционерами при создании сортов бобовых растений, способных формировать эффективный азотфиксирующий симбиоз.

Литература

1. Зотиков В.И., Полухин А.А., Грядунова Н.В., Сидоренко В.С., Хмызова Н.Г. Развитие производства зернобобовых и крупяных культур в России на основе использования селекционных достижений //Зернобобовые и крупяные культуры. - 2020. - № 4 (36). – С. 5-17. DOI:10.244111/2309-348X-2020-11198.
2. Волобуева О.Г. Симбиотическая азотфиксация как фактор экологической безопасности и плодородия почвы //Вестник Российского университета дружбы народов. - 2011. - № 1. – С. 53-60.
3. Зотиков В.И., Зубарева К.Ю., Варламов Н.В. Отзывчивость различных сортов сои на применение органоминеральных микроудобрений //Зернобобовые и крупяные культуры. - 2022. - № 2 (42). – С. 5-15. DOI:10.24412/2309-348X-2022-2-5-15.
4. Волобуева О.Г. Роль биопрепаратов и регуляторов роста в повышении эффективности бобово-ризобияльного симбиоза //В сборнике Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений: от молекул до экосистем /Под ред. Пузиной Т.И. – ОрелГУ им. И.С.Тургенева. - 2017. – С. 65-73.
5. Волобуева О.Г. Влияние препарата Эпин-Экстра на содержание фитогормонов в растениях сои разных сортов и эффективность симбиоза //Агрохимия. - 2015. - № 7. – С. 47-54.
6. Волобуева О.Г., Мирошникова М.П., Наумкина Т.С. Влияние биопрепаратов и регуляторов роста на эффективность бобово-ризобияльного симбиоза фасоли // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2016. - № 3 (19). – С. 56-62.
7. Измайлов С.Ф. Симбиосомная мембрана. – М.: Наука. - 2014. – 110 с.

References

1. Zotikov V.I., Polukhin A.A., Gryadunova N.V., Sidorenko V.S., Khmyzova N.G. Razvitie proizvodstva zernobobovykh i krupyanykh kul'tur v Rossii na osnove ispol'zovaniya selektsionnykh dostizhenii [Development of the production of legumes and groat crops in Russia based on the use of breeding achievements]. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*, 2020, no.4(36), pp.5-17. DOI: 10.244111/2309-348Kh-2020-11198. (In Russian)
2. Volobueva O.G. Simbioticheskaya azotfiksatsiya kak faktor ekologicheskoi bezopasnosti i plodorodiya pochvy [Symbiotic nitrogen fixation as a factor of environmental safety and soil fertility]. *Vestnik Rossiiskogo universiteta druzhby narodov*, 2011, no.1, pp.53-60. (In Russian)
3. Zotikov V.I., Zubareva K.Yu., Varlamov N.V. Otzyvchivost' razlichnykh sortov soi na primeneniye organomineral'nykh mikroudobrenii [Responsiveness of different soybean varieties to the use of organomineral microfertilizers]. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*, 2022, no.2(42), pp.5-15. DOI: 10.24412/2309-348Kh-2022-2-5-15. (In Russian)
4. Volobueva O.G. Rol' biopreparatov i regul'yatorov rosta v povyshenii effektivnosti bobovo-rizobial'nogo simbioza [The Role of Biological Products and Growth Regulators in Improving the Efficiency of Legume-Rhizobium Symbiosis]. V sbornike Sovremennyye aspekty strukturno-funktsional'noi biologii rastenii: ot molekul do ekosistem. Pod red. Puzinoi T.I. [In the collection Modern aspects of structural and functional biology of plants: from molecules to ecosystems. Ed. Puzina T.I.]. OrelGU im. I.S.Turgeneva, 2017, pp. 65-73. (In Russian)
5. Volobueva O.G. Vliyanie preparata Epin-Ekstra na sodержanie fitogormonov v rasteniyakh soi raznykh sortov i effektivnost' simbioza [The effect of Epin-Extra on the content of phytohormones in soybean plants of different varieties and the effectiveness of symbiosis]. *Agrokhiimiya*, 2015, no.7, pp.47-54. (In Russian)
6. Volobueva O.G., Miroshnikova M.P., Naumkina T.S. Vliyanie biopreparatov i regul'yatorov rosta na effektivnost' bobovo-rizobial'nogo simbioza fasoli [Influence of Biological Products and Growth Regulators on the Efficiency of Legume-Rhizobium Bean Symbiosis]. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*, 2016, no.3(19), pp.56 -62. (In Russian)
7. Izmailov S.F. Simbiosomnaya membrana [Symbiosomal membrane]. Moscow, Nauka Publ., 2014, 110 p. (In Russian)