

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЙ НУТА (*CICER ARIETINUM*) И ЕГО МИКРОСИМБИОНТОВ (*MESORHIZOBIUM* sp.)

О.Г. ВОЛОБУЕВА, доктор сельскохозяйственных наук

ORCID ID 0000-0002-5422-0792, E-mail: ovolobueva@list.ru

М.Ф. КРЫЛОВА, аспирантка кафедры микробиологии и иммунологии,

E-mail: mari-masalova@yandex.ru

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

В условиях лабораторного опыта с растениями нута сортов Золотой Юбилей, Аватар, Краснокутский 36, Приво изучено взаимодействие с различными штаммами рода Mesorhizobium – 039, 065, 068, 520, 527, 1305, А-44. Произведена сравнительная оценка фенотипических характеристик нута в т.ч. количества клубеньков, выделена и проанализирована методом saAFLP тотальная ДНК клубеньков. Наибольшее количество клубеньков у растений нута сорта Золотой Юбилей образовано при инокуляции штаммами 039 и 520; у сорта Краснокутский 36 при инокуляции штаммами 065, 520 и А-44, у сорта Приво при инокуляции штаммами 065, 068 и 1305. Выявлены наиболее эффективные пары «сорт-штамм». Штамм Mesorhizobium ciceri 039 преобладает в большинстве клубеньков на корнях растений всех исследуемых сортов, что позволяет рекомендовать данный штамм (генотип) в качестве основы биопрепарата для предпосевной обработки семян растений нута.

Ключевые слова: нут, сорт, штамм, *Mesorhizobium*, симбиоз, биопрепараты.

Для цитирования: Волобуева О.Г., Крылова М.Ф. Изучение особенностей взаимодействия растений нута (*Cicer arietinum*) и его микросимбионтов (*Mesorhizobium* sp.). *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2024; 1(49):19-27. DOI: 10.24412/2309-348X-2024-1-19-27

STUDYING THE INTERACTION FEATURES OF CHICKPEA PLANTS (*CICER ARIETINUM*) AND ITS MICROSymbionT (*MESORHIZOBIUM* sp.)

O.G.Volobueva, M.F.Krylova

RUSSIAN STATE AGRARIAN UNIVERSITY – MOSCOW TIMIRYAZEV AGRICULTURAL ACADEMY

Abstract: *In the conditions of laboratory experiment with chickpea plants of the varieties Golden Jubilee, Avatar, Krasnokutsky 36, the interaction with various strains of the genus Mesorhizobium was studied – 039, 065, 068, 520, 527, 1305, A-44. A comparative assessment of the phenotypic characteristics of chickpeas, including the number of nodules, was made, the total DNA of nodules was isolated and analyzed by the saAFLP method. The largest number of nodules in chickpea plants of the Golden Jubilee variety was formed during inoculation with strains 039 and 520; in the variety Krasnokutsky 36 when inoculated with strains 065, 520 and A-44, in the Privo variety when inoculated with strains 065, 068 and 1305. The most effective "variety-strain" pairs have been identified. The strain Mesorhizobium ciceri 039 prevails in most nodules on the roots of plants of all studied varieties, which allows us to recommend this strain (genotype) as the basis of a biological preparation for pre-sowing treatment of chickpea seeds.*

Keywords: chickpeas, variety, strain, *Mesorhizobium*, symbiosis, biologics.

Введение

Взаимодействие растений нута с клубеньковыми бактериями имеет большое значение для их развития, поскольку обеспечивает растение соответствующим питанием, физиологически активными веществами, защиту от патогенов и адаптацию к стрессам [1, 2]. В настоящее время в сельском хозяйстве, функционирующем в условиях сокращения использования минеральных форм удобрений, большое внимание уделяется проблеме экологического земледелия и поиску новых альтернативных источников [3, 4]. Одним из способов решения этой проблемы является применение микробных полифункциональных биопрепаратов. Биопрепараты на основе клубеньковых бактерий имеют большое практическое значение при выращивании зернобобовых культур и играют важную роль в создании альтернативы минеральным удобрениям и пестицидам [5, 6]. Поскольку нут является важной кормовой и пищевой бобовой культурой, широко распространенной не только за рубежом, но и в России, изучение взаимодействий данной культуры с потенциальными компонентами микробных полифункциональных биопрепаратов является актуальной и важной задачей.

Цель работы – оценка симбиотического потенциала нута (*Cicer arietinum*) и штаммов его микросимбионтов (*Mesorhizobium sp.*).

Материалы и методика исследований

Объектами исследования были растения нута сортов Аватар, Золотой Юбилей, Приво, Краснокутский 36, а также семь бактериальных штаммов: 039, 065, 068, 520, 527, 1305, А-44, относящиеся к роду *Mesorhizobium*.

Исследования проведены в условиях лабораторного опыта в климатической камере. Растения выращивали в небольших полиэтиленовых сосудах. В качестве субстрата использовали предварительно простерилизованный увлажненный вермикулит, забитый в пластиковые сосуды с поддонами. Семена нута перед инокуляцией обрабатывали 90% раствором этанола в течение 3 мин., для предотвращения грибковой инфекции, далее промывали дистиллированной водой и просушивали. Обработка препаратами клубеньковых бактерий проводилась в объеме 0,02 мл на одно семя. После сосуды помещали в климатические камеры с искусственным светодиодным освещением с целью создания благоприятных условий для прорастания и поддержания температуры +26...30°C. Длительность опыта составила 30 дней.

Схема опыта: 1 вариант – контроль (без обработки) – К⁻; 2 вариант – обработка семян штаммом 1305; 3 вариант – обработка семян штаммом 068; 4 вариант – обработка семян штаммом 039; 5 вариант – обработка семян штаммом 527; 6 вариант – обработка семян штаммом 520; 7 вариант – обработка семян штаммом 065; 8 вариант – обработка семян штаммом А-44; 9 вариант – обработка смесью препаратов всех вышеперечисленных штаммов – К⁺. Повторность опыта двукратная. В результате исследований проводили оценку штамм-сортовой специфичности, учитывая такие фенотипические показатели как высота растения, масса надземной части и корневой системы, количество образованных клубеньков; проводили выделение тотальной ДНК клубеньков, предварительно приготовив рабочие растворы инокулятов и проведя проверочный электрофоретический анализ (проверка качества ДНК), далее осуществлен метод ПЦР (полимеразная цепная реакция) и электрофоретический анализ, статистическая обработка материала осуществлялась с использованием программы Statistica for Microsoft Windows.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате проведенных исследований по оценки штамм-сортовой специфичности бобово-ризобияльного симбиоза установлено различие между вариантами с инокуляцией и без неё, различия между вариантами в пределах одного сорта. Все анализируемые штаммы образовывали клубеньки на исследуемых сортах нута (Nod⁺), при этом в вариантах без предпосевной обработки семян инокулятами, клубеньков не выявлено (табл. 1).

Оценка количества клубеньков при моноинокуляции и совместной инокуляции показала, что при совместной инокуляции количество клубеньков у всех сортов больше, чем при моноинокуляции (рис. 1).

Таблица 1

Результаты измерений фенотипических характеристик нута

Сорт	Вариант	Высота, см	Масса зеленой части, г	Масса корневой системы, г	∑ масс, г	Количество клубеньков, шт/раст
Золотой Юбилей	К ⁻ - контроль	14,6±2,1	1,41±0,13	4,37±0,42	5,77±0,55	0±0
	Штамм 1305	14,7±1,7	1,07±0,1	4,87±0,75	5,94±0,85	19±4
	Штамм 068	16±0,5	0,89±0,23	5,52±0,18	6,4±0,06	13±1
	Штамм 039	14,2±1,2	1,02±0,66	3,91±1,34	4,93±2	21±9
	Штамм 527	13,4±1,5	1,09±0,21	3,96±1	5,05±1,21	25±6
	Штамм 520	13±2,8	0,54±0,11	3,19±0,13	3,73±0,02	7±3
	Штамм 065	12,8±1,1	0,97±0,35	4,14±0,57	5,11±0,92	9±1
	Штамм А-44	14,3±1,4	0,79±0,11	2,96±0,32	3,75±0,21	6±1
	К ⁺	15,7±0,8	1,38±0,25	4,81±1,15	6,18±1,4	23±6
Аватар	К ⁻ - контроль	13±1,4	1,04±0,21	4,84±1,63	5,87±1,84	0±0
	Штамм 1305	15,3±1,8	1,24±0,04	3,83±0,53	5,06±0,49	11±5
	Штамм 068	14,3±1,6	0,87±0,1	3,18±0,68	4,05±0,78	14±4
	Штамм 039	12,5±1,3	1,06±0,21	3,38±0,42	4,44±0,63	25±6
	Штамм 527	16±2,3	0,98±0,01	3,41±0,47	4,39±0,49	15±1
	Штамм 520	15,6±1,6	1,43±0,11	4,35±0,66	5,78±0,77	12±0
	Штамм 065	15,6±2,6	1,04±0,28	2,72±0,86	3,76±1,15	12±4
	Штамм А-44	9,9±1,3	0,57±0,21	1,87±0,52	2,44±0,73	6±2
	К ⁺	13,5±0,7	1,45±0,22	4,86±0,41	6,31±0,63	30±5
Краснокутский 36	К ⁻ - контроль	15,5±0,7	0,94±0,52	4,05±1,68	4,98±2,19	0±0
	Штамм 1305	16±1,8	1,28±0,03	5,09±0,04	6,37±0,07	11±3
	Штамм 068	14,6±1,3	1,14±0,19	3,87±0,62	5±0,81	17±1
	Штамм 039	14,8±3,3	1,32±0,02	5,9±0,45	7,22±0,47	14±3
	Штамм 527	14,3±3,6	0,96±0,6	4,13±2,65	5,08±3,25	15±6
	Штамм 520	13,7±3,7	1,18±0,01	5,62±0,41	6,8±0,42	13±2
	Штамм 065	15,3±1,6	1,1±0,28	4,61±1,29	5,71±1,57	16±2
	Штамм А-44	14,7±0,6	0,87±0,23	4,38±1,9	5,24±2,14	15±5
	К ⁺	15,5±0,7	1,53±0,08	4,88±0,39	6,41±0,3	29±1
Приво	К ⁻ - контроль	20,5±2,1	1,84±0,23	5,76±0,4	7,6±0,17	0±0
	Штамм 1305	14,3±3	1,06±0,12	4,07±0,82	5,13±0,94	18±4
	Штамм 068	13,8±1,1	1,12±0,41	4,59±2,67	5,71±3,08	19±5
	Штамм 039	12,5±2,1	0,93±0,05	3,15±0,18	4,08±0,23	19±9
	Штамм 527	13,3±1,1	1,15±0,13	2,53±1,32	3,67±1,46	4±1
	Штамм 520	13,9±3	0,86±0,51	4,14±1,65	5±2,16	10±2
	Штамм 065	14,9±1,6	1,15±0,16	4,37±1,68	5,52±1,83	17±6
	Штамм А-44	14,2±1,1	0,91±0,53	2,58±1,42	3,48±1,95	7±2
	К ⁺	19±4,2	1,49±0,16	5,74±2,26	7,23±2,41	13±3

Примечание: К⁻ – контроль, без обработки семян, К⁺ - обработка семян смесью всех штаммов

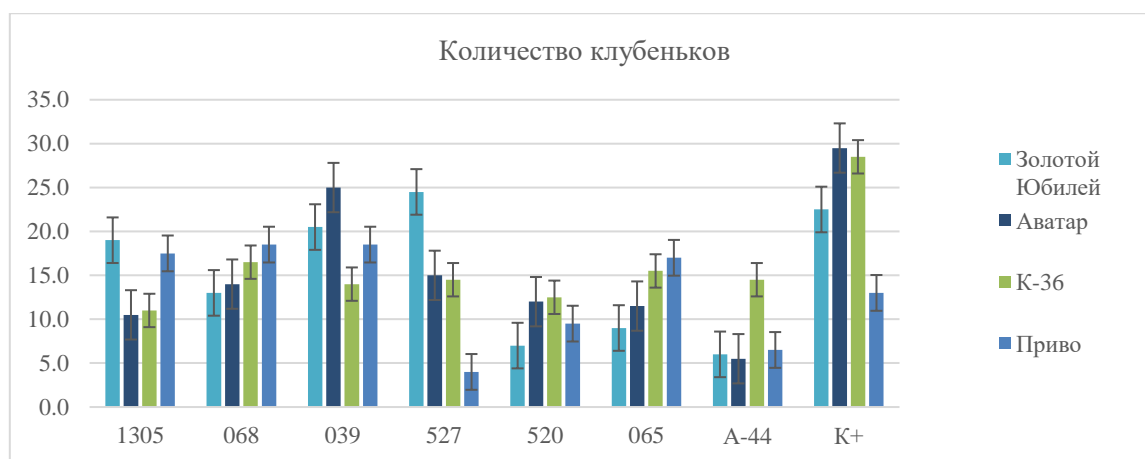


Рис. 1. Сравнительная оценка количества клубеньков

Различия между количеством клубеньков в одном варианте у разных сортов характеризует их специфичность к тем или иным штаммам *Mesorhizobium ciceri*, что позволяет говорить о сорт-штаммовой специфичности данных растительно-микробных взаимодействий. Наибольшее количество клубеньков у сорта нута Золотой Юбилей наблюдалось при обработке штаммами 039, 527 и 1305, у сорта Аватар – штаммами 039, у сорта Краснокутский 36 (К-36) – штаммом 520 и А-44, а у сорта Приво – штаммами 065 и 068. В варианте с обратной всеми штамми (K⁺) у всех растений образовывались клубеньки, что вероятно связано с синергическим эффектом, возникающим при обработке семян бобовых растений смесью нескольких штаммов *Mesorhizobium sp.*

Анализ высоты растений (рис. 2) не выявил статистически достоверных различий, однако в контроле отмечается значительная прибавка у сорта Приво. В варианте с обработкой штаммом А-44 наблюдается снижение высоты, по сравнению с другими растениями сорта Аватар и в этом варианте также отмечено наименьшее число клубеньков. Вероятно, это связано с проявлениями антагонизма растения и бактерий этого штамма.

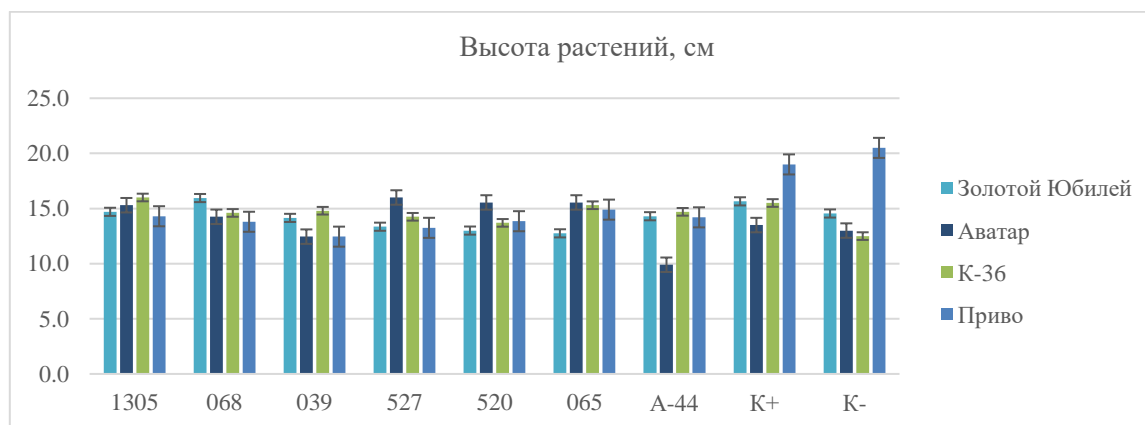
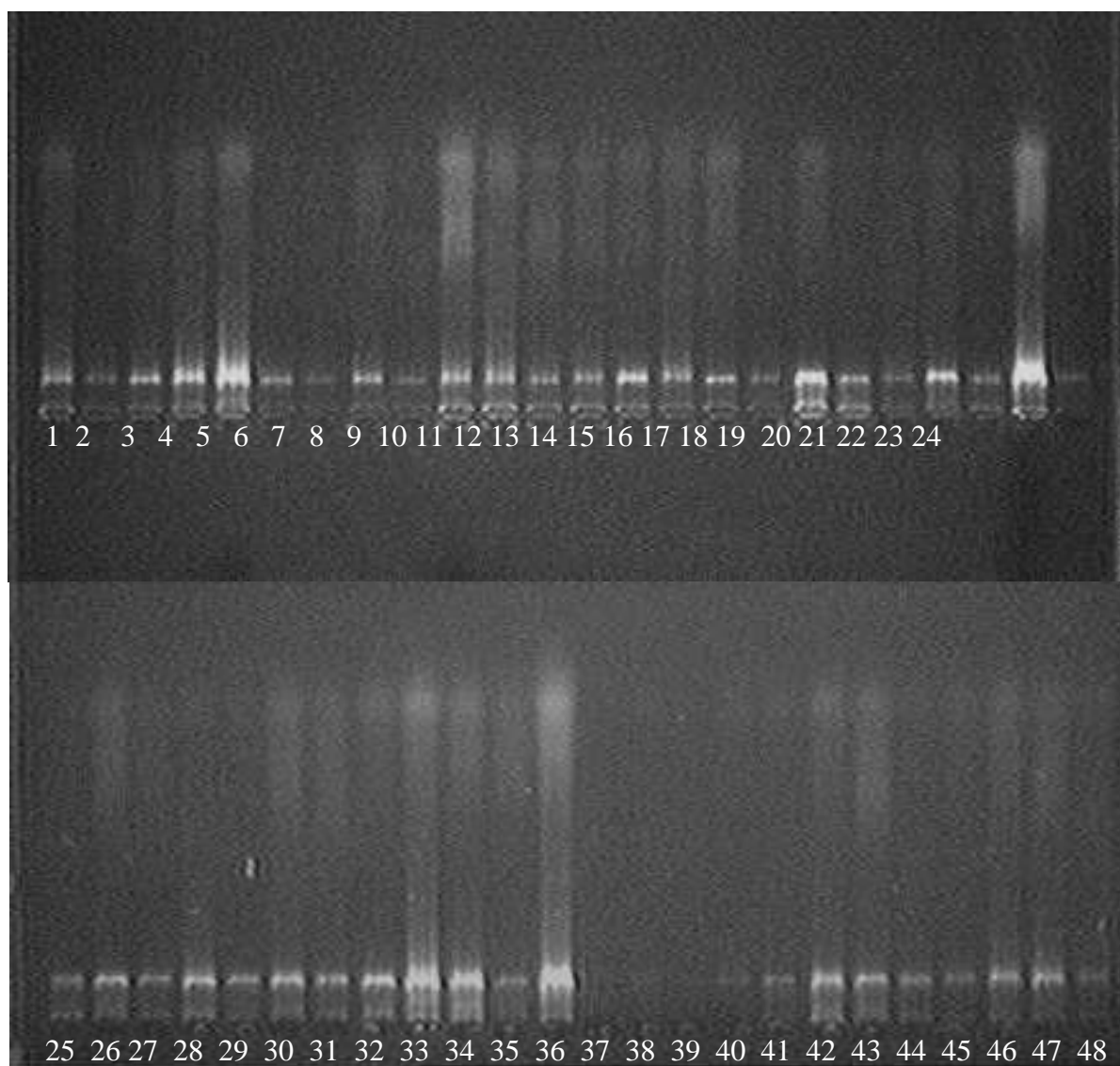


Рис. 2. Сравнительная оценка высоты растений нута

Анализ оценки биомассы растений нута показал прибавку при обработке всеми штаммами, по сравнению с контролем, кроме сорта Приво. Сорта Аватар и Краснокутский 36 показали прибавку биомассы, различающуюся по вариантам, что свидетельствует об их избирательности, специфичности по отношению к разным выбранным штаммам. Наибольшая прибавка биомассы отмечена у сорта Аватар при обработке инокулятом штамма 520, а у сорта Краснокутский 36 при обработке инокулятом штамма 039. Инокуляция штаммом А-44 не привела к прибавке биомассы ни на одном из сортов растений нута.

ДНК клубеньков была выделена из 12 клубеньков в варианте опыта с контролем для каждого сорта. После выделения ДНК клубеньков был проведен проверочный электрофоретический анализ. Его результаты представлены на рисунке 3.



*Рис. 3. Результат проверочного электрофореза тотальной ДНК клубеньков
1-12 – Золотой Юбилей, 13-24 – Аватар, 24-36 – Краснокутский 36, 37-48 – Приво*

После проверки ДНК был проведен анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов AFLP с одним адаптером (эндонуклеаза рестрикции *XmaI*). Посредством электрофореза в агарозном геле распределены сайты рестрикции эндонуклеаз и получены отпечатки (фингерпринты) нескольких генетических признаков, отражающих структуру генома и позволяющих осуществлять поиск вид-специфичных маркеров для дальнейшей идентификации бактерий.

Принадлежность фингерпринтов клубенек-образующих единиц (КлОЕ) к тому или иному штамму устанавливалась на основе сравнения с представленными на рисунке 4 данными.

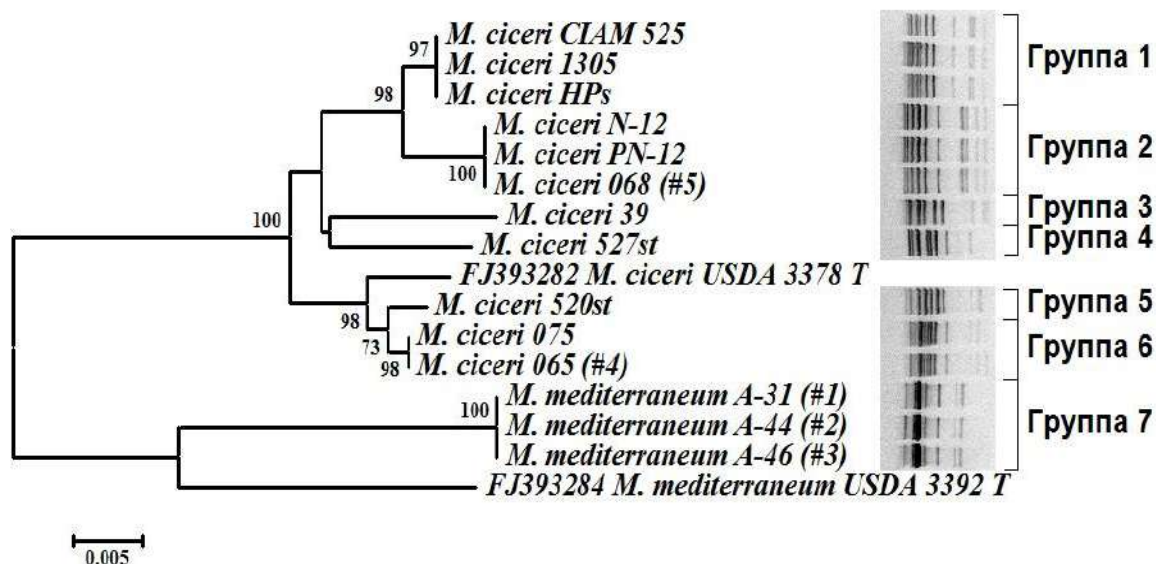


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основе данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *groV* и *saAFLP* анализа, проведенного с эндонуклеазой рестрикции *Xma*II, для штаммов видов *M.ciceri* и *M.mediterraneum*

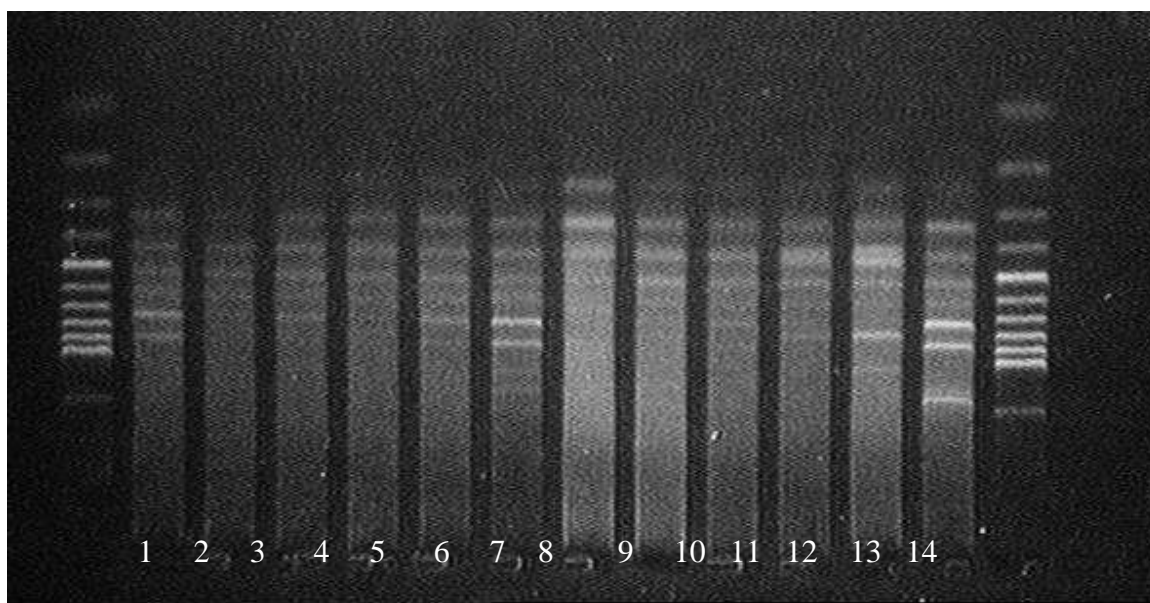


Рис. 5. Результат *saAFLP* с адаптером *Ad.2.un1* и эндонуклеазой рестрикции *Xma*II. Сорт Краснокутский 36; 1 и 14 – маркеры длин фрагментов (100+ bp DNA Ladder), 2-13 – ДНК КЛОЕ

На рисунке 5 наблюдаются различия между фингерпринтами нескольких образцов КЛОЕ сорта Краснокутский 36. Судя по маркерам, в данном случае среди образцов присутствуют два отличающихся фингерпринта, относящихся к штаммам 068 (дорожки 11, 12) и 039.

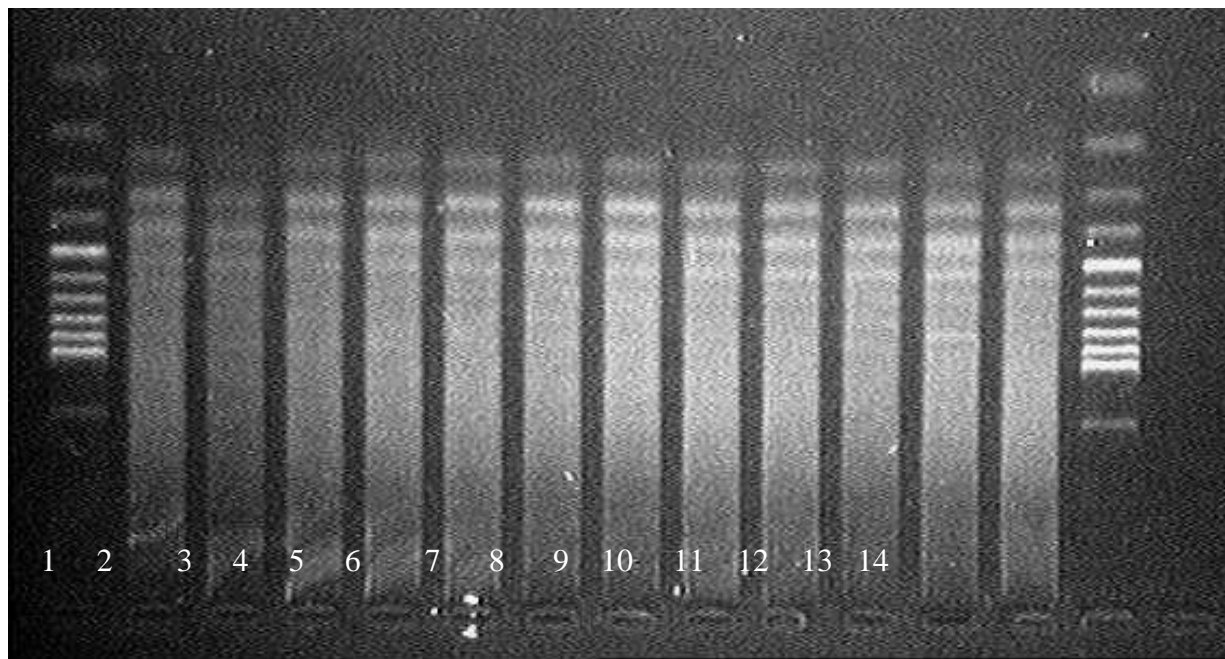


Рис. 6. Результат saAFLP с адаптером Ad.2.un1 и эндонуклеазой рестрикции XmaII. Сорт Аватар; 1 и 14 – маркеры длин фрагментов (100+ bp DNA Ladder), 2-13 – ДНК КлОЕ

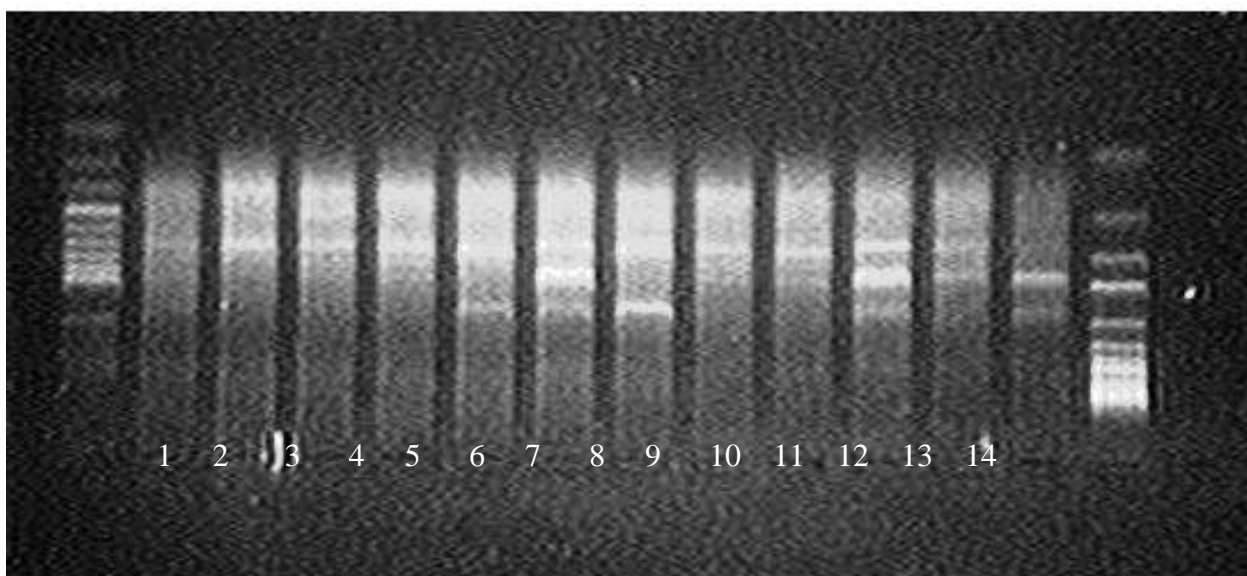


Рис. 7. Результат saAFLP с адаптером Ad.2.un1 и эндонуклеазой рестрикции XmaII. Сорт Золотой Юбилей; 1 и 14 – маркеры длин фрагментов (1 kb DNA Ladder), 2-13 – ДНК КлОЕ.

На рисунке 7 также наблюдается различие между фингерпринтами. В данном случае образцы представлены генетическим материалом КлОЕ штаммом 527 (дорожки 11, 12, 13) и 039 на растениях сорта Золотой Юбилей.

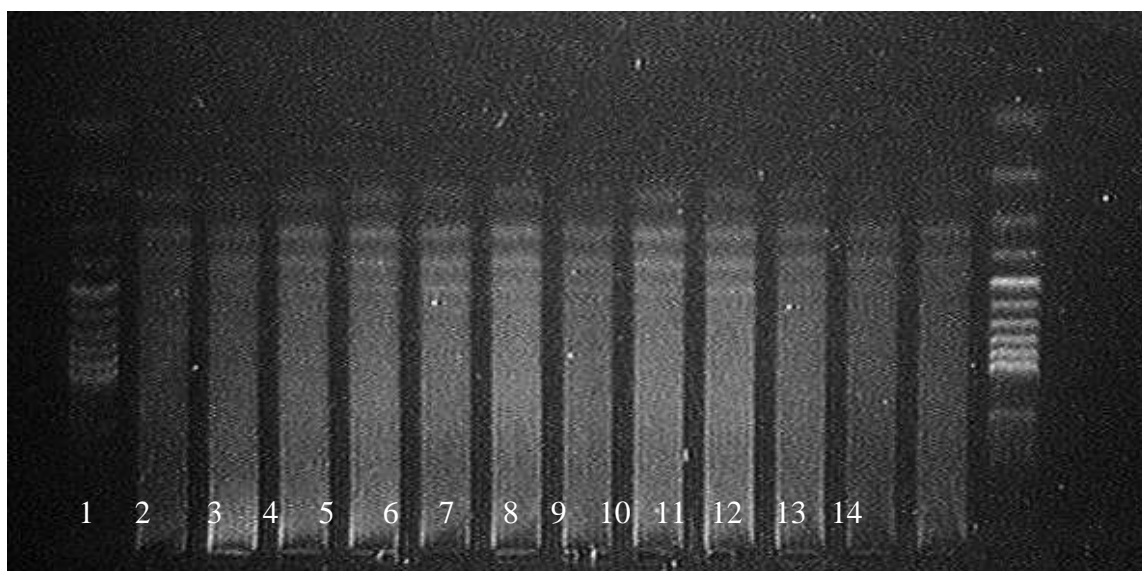


Рис. 8. Результат saAFLP с адаптером *Ad.2.un1* и эндонуклеазой рестрикции *Xma*II. Сорт Приво; 1 и 14 – маркеры длин фрагментов (100+ bp DNA Ladder), 2-13 – ДНК КлОЕ

Рисунки 6 и 8 демонстрируют отсутствие различий между фингерпринтами. Здесь при инокуляции растений всеми представленными штаммами в случае с сортами Аватар и Приво клубеньки образуют бактерии одного штамма, наиболее конкурентного в данных условиях. Этим штаммом, судя по фингерпринтам на рисунках 6 и 8, является штамм 039.

Таким образом, штамм *M. ciceri* 039 преобладал в большинстве клубеньков на корнях растений нута всех исследуемых сортов.

Выводы

1. Наибольшее количество клубеньков у растений нута сорта Золотой Юбилей образовано при инокуляции штаммами 039, 527 и 1305; у сорта Аватар при инокуляции штаммами 039 и 520; у сорта Краснокутский 36 при инокуляции штаммами 065, 068 и 1305.

2. Анализ результатов исследований выявил некоторые особенности взаимодействия бактерий и растений, так у сорта Приво, при взаимодействии с отдельными штаммами вероятно наблюдается эффект антагонизма. У других сортов нута, в целом наблюдаются высокие показатели по биомассе и количеству клубеньков в варианте К⁺, что свидетельствует о синергическом эффекте при взаимодействии нескольких штаммов *Mesorhizobium sp.*

3. Генотипирование КлОЕ с помощью фингерпринтинга saAFLP позволило выявить наиболее конкурентоспособный штамм рода *Mesorhizobium* в условиях конкретного бобово-ризобияльного симбиоза.

4. Штамм *Mesorhizobium ciceri* 039 преобладает в большинстве клубеньков на корнях растений всех исследуемых сортов, что позволяет предлагать данный штамм (генотип) в качестве основы биопрепарата для предпосевной обработки семян растений нута. Кроме этого штамма, у растений сорта Аватар клубеньки были образованы также штаммом 068, а у сорта Золотой Юбилей – штаммом 527.

Таким образом, проведенные исследования с инокуляцией семян растений нута штаммом *Mesorhizobium sp.* позволили выявить наиболее эффективно взаимодействующие пары сорт-штамм, что в дальнейшем может использоваться при создании биопрепаратов, на основе соответствующих бактерий, эффективно вступающих в симбиоз с различными сортами растений нута.

Литература

1. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Маркова О.В., Иванчина Н.В., Хайфулина Р.М. Изучение бактериальных ассоциаций эндофитов клубеньков, способствующих увеличению продуктивности бобовых растений //Агрохимия. – 2010. – № 11. – С. 50-58.
2. Волобуева О.Г. Влияние биопрепаратов Ризоторфин и Альбит на содержание фитогормонов в растениях гороха разных сортов и эффективность симбиоза //Зернобобовые и крупяные культуры. – 2019. – № 2 (30). – С.14-20. DOI: 10.24412/2309-348X-2019-2-11082
3. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Владимирова А.А. и др. Искусственная активация экспрессии *nif*-генов у клубеньковых бактерий *ex planta* // Экологическая генетика. – 2019. – Т.17. – № 2. – С.35-42
4. Зотиков В.И., Полухин А.А., Грядунова Н.В. Развитие инновационных технологий в растениеводстве на основе селекционных достижений //Зернобобовые и крупяные культуры. – 2023. – №2(46). – С. 5-9. DOI: 10.24412/2309-348X-2023-2-5-9
5. Волобуева О.Г. Биопрепараты и регуляторы роста как фактор повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза //Сахар. – 2023. - №7. – С.40-47.
6. Донская М.В., Донской М.М., Якубовская А.И., Пташкин О.П., Каменева И.А. Сравнительная продуктивность нута и чины в условиях Орловской области и республики Крым //Зернобобовые и крупяные культуры. – 2023. – № 4 (48). – С.71-79. DOI: 10.24412/2309-348X-2023-4-71-79

References

1. Garipova S.R., Garifullina D.V., Markova O.V., Ivanchina N.V., Khaifulina R.M. Study of bacterial associations of nodule endophytes contributing to increased productivity of legume plants //Agrokhimiya. - 2010. - no. 11. - Pp. 50-58.
2. Volobueva O.G. Effect of biopreparations Rizotorfin and Albit on the content of phytohormones in pea plants of different varieties and symbiosis efficiency //Zernobobovye i krupyanye kul'tury. - 2019. - no. 2(30). - Pp.14-20. DOI:10.24412/2309-348X-2019-11082
- 3 Baimiev An.Kh, Gumenko R.S., Vladimirova A.A. et al. Artificial activation of *nif* gene expression in tuberous bacteria *ex planta* //Ekologicheskaya genetika. - 2019. - V.17. - no. 2. - Pp.35-42
4. Zotikov V.I., Polukhin A.A., Gryadunova N.V. Development of innovative technologies in crop production based on breeding achievements //Zernobobovye i krupyanye kul'tury. - 2023. - no. 2(46). - Pp. 5-9. DOI: 10.24412/2309-348X-2023-2-5-9
5. Volobueva O.G. Biological preparations and growth regulators as a factor in increasing the efficiency of legume-ryzobium symbiosis //Sakhar. - 2023. - no. 7. - Pp.40-47.
6. Donskaya M.V., Donskoi M.M., Yakubovskaya A.I., Ptashkin O.P., Kameneva I.A. Of chickpea and grass pea comparative productivity when application of microbiological preparations in the Orel region and the republic of Crimea conditions //Zernobobovye i krupyanye kul'tury. - 2023. - no. 4(48). - Pp.71-79. DOI: 10.24412/2309-348X-2023-4-71-79