

## ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ШТАММОВ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICIAE* С РАСТЕНИЯМИ ГОРОХА И ЧИНЫ

**Красичкова Екатерина Дмитриевна**, аспирант, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, E-mail: [katyakrasi4ckova@yandex.ru](mailto:katyakrasi4ckova@yandex.ru)

**Волобуева Ольга Гавриловна**, доцент кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, E-mail: [ovolobueva@list.ru](mailto:ovolobueva@list.ru)

**Аннотация:** В условиях вегетационного опыта изучен полиморфизм штаммов азотфиксирующих бактерий *Rhizobium leguminosarum bv. viciae*. Определена клубенёк-образующая способность штаммов и выявлена специфичность взаимодействия штаммов бактерий *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* с растениями гороха и чины.

**Ключевые слова:** бобово-ризобияльный симбиоз, клубеньковые бактерии, специфичность, ПЦР.

**Введение.** Бобово-ризобияльный симбиоз играет важную роль в жизни бобовых культур. Он способствует улучшению питания растений-симбионтов, защите от патогенов и вредителей, повышению их стрессоустойчивости. Строго специфическое взаимодействие между микро- и макросимбионтом бобово-ризобияльного симбиоза позволит получить высокоэффективные, уникальные биопрепараты для определенного сорта бобовой культуры и уменьшить использование минеральных удобрений и пестицидов [1, 2].

**Цель исследования:** выявление штаммов *Rhizobium leguminosarum bv. viciae*, специфично взаимодействующих с чинной посевной (*Lathyrus sativus*) и горохом посевным (*Pisum sativum*) разных сортов.

**Материалы и методы.** Объектами исследования являлись горох посевной (*Pisum sativum*) сортов Софья, чина посевная (*Lathyrus sativus*) сортов Славянка, Сподивинка, а также 7 различных штаммов *Rhizobium leguminosarum bv. viciae*: Б-25, Б-18, 65, У-2, Ls 4, Ls 8, LMG 14904<sup>T</sup> *R. leguminosarum*, LMG 23997<sup>T</sup> *R. fabae*. Штаммы культивировали методом поверхностного посева микроорганизмов на агаризованной среде ТУ с сахаром. Вегетационный опыт закладывали в 0,5 л пластиковых стаканах в стерильном вермикулите, глубина заделки семян 1-1,5 см. Использовали метод выделения бактериальной ДНК и метод ПЦР. Проводили анализ нодулирующей способности.

**Результаты и их обсуждение.** В результате проведенных исследований анализа нодулирующей способности было установлено, что все обработанные семена образовывали клубеньки (таблица)

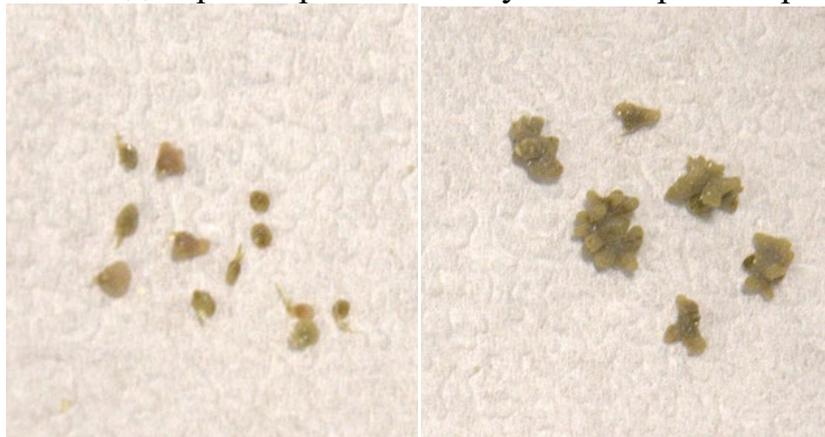
**Таблица. Анализ нодулирующей способности**

Инокулянты	Нодулирующая способность		
	Горох «Софья»	Чина «Славянка»	Чина «Сподивинка»
К - *	Nod-	Nod-	Nod-
К+ **	Nod+	Nod+	Nod+
Б-25	Nod+	Nod+	Nod+
65	Nod+	Nod+	Nod+
У-2	Nod+	Nod+	Nod+
Ls4	Nod+	Nod+	Nod+
Ls8	Nod+	Nod+	Nod+
LMG 14904	Nod+	Nod+	Nod+
LMG 23997	Nod+	Nod+	Nod+

\* контрольный вариант без внесения инокулятов

\*\* контрольный вариант с внесение всех инокулятов

Наблюдались различия в формах клубеньков. Отмечены недетерминированные клубеньки, полученные при моноинокуляции гороха сорта Софья штаммами 65, У-2, Б-25, LMG 14904, а также при взаимодействии чины различных сортов со штаммами Ls 4 и Ls 8. В остальных вариантах опыта наблюдались «химерные» формы, т.е. скопление недетерминированных клубеньков разных размеров (рис. 1).

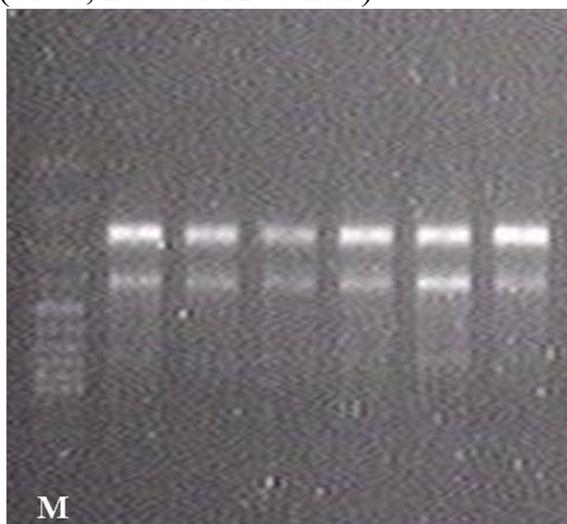


**Рисунок 1. Недетерминированные (слева) и «химерные» (справа) формы клубеньков**

Инокуляция семян различными штаммами повлияла на показатели роста растений. Самые высокие средние показатели длины (19 см) и массы (0,76 г) растений гороха сорта Софья установлены при инокуляции всеми штаммами (К+). Самые высокие значения длины (61 см) выявлены в III варианте опыта, где проводилась моноинокуляция штаммом У-2 растений чины сорта Славянка. Однако наибольшая средняя масса 1,51 г отмечена в отрицательном контроле (К-). Варьирование длин в пределах 10 см, массы – 0,41 г. Наибольшая средняя длина растений чины сорта Сподивинка наблюдается в варианте К- и составляет 63 см. По средней массе этот вариант опыта уступает только К+ на несколько сотых грамма. Среднее значение К- составляет 1,45 г, а К+ равно 1,49 г. Определено значительное варьирование длин в пределах 24 см, массы - 0,45 г.

В результате проведенных исследований были получены фрагменты нуклеотидных последовательностей. На рис. 2, 3 представлены результаты

амплификации хромосомного маркера *hin*-регион. Родоспецифичная ПЦР *hin*-региона позволяет идентифицировать бактерии рода *Rhizobium*, а определение их нуклеотидных последовательностей дает информацию о внутривидовом разнообразии [3]. Сравнивая обе фотографии (рис.2, рис.3), можно полагать, что горох сорта Софья специфично взаимодействует с LMG 14904, а также сходным с ним Б-25, так как имеет по данному показателю одинаковые набор длин ДНК, состоящий из 3 полос (6100, 2500 и 1200 п.н.).



**Рисунок. 2** Электрофоретическое разделение продукта *hin*-регион ПЦР КЛОЕ из варианта К+ (6 повторности). М – маркер 1 kb DNA Ladder

Аналогичные фотографии были сделаны для чины сортов Славянка и Сподивинка. На основе полученных данных можно полагать, что чина взаимодействует с несколькими штаммами. Сорт Славянка специфично отзывается на инокуляцию штаммов Ls 8. Данный микроорганизм был выделен из этой культуры.



**Рисунок 3** Электрофоретическое разделение продукта *hin*-регион ПЦР инокулятов. М – маркер 1 kb DNA Ladder; 1 - Б-25; 2 – 65; 3 - У-2; 4 – Ls 4; 5 – Ls 8; 6 - LMG 14904; 7 - LMG 23997

**Заключение.** Особенности взаимодействий между микро- и макросимбионтом бобово-ризобияльного симбиоза, обеспечивающие строго специфичное узнавание партнера, позволяют создавать уникальные, высокоэффективные биопрепараты для определенного сорта бобовой культуры. Их разработки и дальнейшее использование дает возможность вырастить растение с повышенной азотфиксирующей способностью, высоким содержанием белка в зерне.

### **Библиографический список**

1. Волобуева О.Г. Роль биопрепаратов и регуляторов роста в повышении эффективности бобово-ризобияльного симбиоза / Волобуева О.Г. // Сборник статей к Всероссийской конференции с международным участием «Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений: от молекул до экосистем». – 2017. – С. 65-73.
2. Тихонович И.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем / И.А. Тихонович, Н.А. Проворов. – СПб.: Изд-во С.- Петерб. ун-та. - 2009. – 210 с.
3. Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф., и др. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* с растениями трибы *Viciae* // Экологическая генетика. – 2018. – Том 16. – № 4. – С. 51–60.

### **STUDY OF THE SPECIFICITY OF THE INTERACTION OF RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICEA STRAINS WITH PLANTS PEAS AND RANKS**

*Krasichkova Ekaterina Dmitrievna, post-graduate student, K.A. Timiryazev Moscow State Agricultural Academy,*

*E-mail: katyakrasi4ckova@yandex.ru*

*Volobueva Olga Gavrilovna, Associate Professor of the Department of Microbiology and Immunology of the FSBI VO RGAU-MSHA named after K.A. Timiryazev,*

*E-mail: ovolobueva@list.ru*

**Abstract:** *The polymorphism of strains of nitrogen-fixing bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* was studied in the conditions of vegetation experiment. The nodule-forming ability of the strains was determined and the specificity of the interaction of bacterial strains *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* with pea and chin plants was revealed.*

**Keywords:** *bean-rhizobial symbiosis, nodule bacteria, specificity, PCR.*