

УДК 631.46:579.64

**АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ РИЗОБИАЛЬНЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ
НА СЕМЕНА И ПРОРОСТКИ КЛЕВЕРА КРАСНОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE*)**

А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, З.Р. Вершинина, Ал.Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, owlwoman@mail.ru

Полученные данные подтверждают предположение, что синтез полисахаридов, стимулирующих симбиотические взаимоотношения, могут способствовать адаптации к меняющимся условиям окружающей среды штаммов *Rhizobium* и эффективно взаимодействовать с бобовыми растениями, внося вклад в их рост и прорастание.

Ключевые слова: *Rhizobium*, ризобии, экзополисахариды (ЭПС), биоудобрения, ростостимулирующая активность.

Сложные и специфичные взаимодействия между клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* и их ризобиями-хозяевами являются частью многоэтапного процесса координированного взаимодействия бакте-

рий и растений, в ходе, которого происходит обмен молекулярными сигналами между партнерами, приводящий к дифференциальной экспрессии генов у обоих симбионтов. В результате такого взаимодействия образуются азотфиксирующие клубеньки. Для правильного развития клубеньков требуется синтез и восприятие сигнальных молекул. Показано, что на ранних этапах симбиоза роль специфических сигнальных факторов у бактерий играют липохитоолигосахариды (Nod- факторы). Синтез Nod-факторов необходим, но недостаточен для морфогенеза клубеньков. Не менее важным фактором при образовании клубенька является синтез бактериями экзополисахаридов (ЭПС). Исследования штаммов с нарушенным синтезом ЭПС позволило выдвинуть предположение об их участии в узнавании макросимбионтов, а также в сигнальных процессах при дифференцировке бактериальных и растительных клеток. Кроме того накопленные данные свидетельствуют о том, что экзополисахариды вовлечены в инфицирование и образование клубеньков, в процесс бактериального освобождения от инфекционных нитей, развития бактериоидов, подавления реакции защиты растений и синтеза ими противомикробных соединений. Согласно результатам, полученным при исследовании влияния штаммов ризобий на всхожесть семян различных растений, показано что инокуляция растений штаммами ризобий, синтезирующими экзополисахариды значительно увеличивает всхожесть семян и рост проростков растений. В виду этого целью данной работы являлось создание и исследование свойств симбиотической системы клевера с ризобиями, у которых были идентифицированы исследуемые гены клубеньковых бактерий, регулирующие биосинтез экзополисахаридов.

В качестве объекта исследования был выбран клевер красный (*T. pratense*), так как этот сорт отличается высокой степенью всхожести и устойчивостью к болезням. Для данного исследования нами были выбраны следующие гены: *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, так как данные гены хорошо изучены, участвуют в синтезе экзополисахаридов и процессах сигналинга, а также формировании клубеньков. Для определения наличия у исследуемых штаммов ризобий генов экзополисахаридов нами был проведен скрининг 34 штаммов *R. leguminosarum*. В результате скрининга были выявлены 5 штаммов ризобий, у которых были идентифицированы все исследуемые нами гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов.

С целью анализа влияния ризобий, на семена клевера, нами была проведена оценка ростостимулирующего эффекта 2 штаммов *Pseudomonas aureofaciens*, 1 штамма *R. galegae* и 7 штаммов *R. leguminosarum*, один из которых являлся природным симбионтом *T. pratense*. У 5 из 7 штаммов были идентифицированы все исследуемые гены, ответственные за синтез экзополисахаридов. Для того чтобы избежать негативного воздействия на исследуемые растения, были проведены опыты по инокуляции растений различными концентрациями ризобий. Таким образом, были выявлена оптимальная концентрация, при которой штаммы обладают ростостимулирующим эффектом, не оказывая негативного влияния на растения клевера – 10⁴

КОЕ/мл. Далее семена инокулировали суспензией данных штаммов. Через неделю подсчитывали процент всхожести семян, а также длину корней и гипокотилей растений.

Выбранные нами семена клевера показали довольно высокую всхожесть 93.3%. Было выявлено, что инокуляция семян клевера штаммами ризобий, у которых были идентифицированы исследуемые нами гены, ответственные за синтез экзополисахаридов в большинстве случаев благоприятно влияли на всхожесть растений клевера. Всхожесть при их применении достигла 100%, что можно объяснить синтезом ризобиями экзополисахаридов и фитогормонов согласно результатам, полученным зарубежными авторами при исследовании влияния штаммов ризобий на всхожесть семян различных бобовых растений. Однако в 2х случаях мы отметили ухудшение всхожести семян клевера (на 3% и 13% ниже показателя контрольных растений). Это явление может быть связано с тем, что растения клевера были инокулированы высокой концентрацией ризобий, это и оказало негативное воздействие на растения.

Далее нами было показано положительное влияние исследуемых штаммов ризобий на рост проростков клевера красного. При анализе длины корней проростков мы отметили, что растения, обработанные *P. aureofaciens* показали меньшую длину корней проростков (от 17 до 37%), чем растения, инокулированные штаммом *R. galegae* (39%). Инокуляция семян клевера ризобиями, у которых были идентифицированы все исследуемые нами гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов приводит к увеличению длины корней проростков (от 7 до 53% больше контрольных). Значения длин гипокотилей проростков, инокулированных ризобиями, синтезирующими экзополисахариды, также были значительно больше по сравнению с контролем, в том числе и обработанные *R. galegae* (на 72%). Опытные проростки были длиннее контрольных на 38%–103%, в зависимости от того каким штаммом было обработано растение. Однако эти значения были меньше тех, что получены при обработке растений *P. aureofaciens* максимум на 16%. Значения показателей природного симбионта красного клевера указывают на то, что обработка бобовых растений «дикими» штаммами, обладающими ростостимулирующим эффектом приводит к увеличению всхожести растений и их росту. В многочисленных работах по изучению, влияния ризобий на увеличение длины проростков различных растений, было доказано, что ризобии выделяют ростостимулирующие гормоны (индол-3-уксусную кислоту, цитокинины и гиббереллины), а синтез ими экзополисахаридов, способствует прикреплению ризобий к поверхности корней и их выживанию. Полученные данные подтверждают предположение о том, что синтез различных активизирующих симбиоз полисахаридов может позволить ризобияльным штаммам адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды и эффективно взаимодействовать с бобовыми растениями, способствуя их росту и всхожести.

Исследования проводились при финансовой поддержке грантов РФФИ-Поволжье № 14-04-97005 РФФИ-мол_а № 16-34-01076, РФФИ-Инициативный № 16-04-00902 А.

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 91–93

THE ANALYSIS OF THE IMPACT OF RHIZOBIAL EXOPOLYSACCHARIDES
ON SEEDS AND SEEDLINGS OF THE RED CLOVER (*TRIFOLIUM PRATENSE*)

A.M. Lavina, L.R. Nigmatullina, Z.R. Vershinina, Al.K. Baymiev

Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Scientific Centre RAS, owlwoman@mail.ru

The obtained data support the assumption that the synthesis of a variety activating symbiosis polysaccharides can afford to adapt to changing environmental conditions to *Rhizobium* strains and to interact effectively with leguminous plants, contributing to their growth and germination.