

## ГАБИТУС И ПРОДУКТИВНОСТЬ ЛЮЦЕРНЫ (*Medicago sativa* L.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНОКУЛЯЦИИ ШТАММАМИ *Sinorhizobium meliloti*, РАЗЛИЧАЮЩИМИСЯ ПО СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ\*

Н.А. ПРОВОРОВ, О.П. ОНИЩУК, О.Н. КУРЧАК

Симбиотическая эффективность (СЭ) клубеньковых бактерий (ризобий) характеризует их адаптивный потенциал и практическую значимость. Этот признак связан в первую очередь с фиксацией молекулярного азота ( $N_2$ ), которая осуществляется ризобиями в корневых клубеньках и контролируется генотипами обоих партнеров. Наибольшая интенсивность  $N_2$ -фиксации характерна для быстрорастущих ризобий (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*). Однако СЭ (влияние инокуляции ризобиями на биомассу растений) определяется многими генными системами ризобий, в том числе не участвующими в работе нитрогеназы, в связи с чем  $N_2$ -фиксирующую активность и СЭ следует рассматривать как два разных симбиотических признака. Так, ризобии способны синтезировать биологически активные вещества (фитогормоны, витамины, люмохром), которые влияют на развитие растений-хозяев. Нашей целью было изучение влияния штаммов ризобий *Sinorhizobium meliloti*, активно фиксирующих  $N_2$ , но контрастно различающихся по солеустойчивости, на показатели габитуса (соотношения различных морфометрических показателей) и продуктивности у многолетней тетраплоидной люцерны (*Medicago sativa* L.) при действии солевого стресса, а также при мутациях микросимбионтов, снижающих СЭ. В работе использовали штаммы *S. meliloti* 1021 (стандартный лабораторный штамм), СХМ1-188 (УФ-индуцированный мутант штамма СХМ1, обладающий повышенной СЭ) и СА67 (штамм, выделенный из почвы в Таджикистане). Кроме того, исследовали Tn5-индуцированные мутанты с пониженной СЭ — F (получен от штамма СА67 в настоящей работе) и GL1 (получен от штамма 1021 в университете г. Дальхаус, Канада). Семена люцерны посевной сорта Агния, устойчивого к эдафическим стрессам, были получены во Всероссийском НИИ кормов им. В.Р. Вильямса (г. Лобня, Московская обл.). Бобово-ризобияльный симбиоз изучали в микровегетационных опытах, анализируя различные морфометрические показатели (масса и длина побегов и корней) и их соотношения. Для анализа действия на СЭ солевого стресса люцерну выращивали на среде с добавлением 0,6 % NaCl. Показано, что в отсутствие стресса инокуляция всеми штаммами *S. meliloti* вызывала увеличение массы и длины побегов, однако длина корней люцерны снижалась. Это приводило к резкому изменению габитуса растений (соотношение длин побегов и корней возрастало в 2-3 раза), которое, по-видимому, обеспечивало высокую интенсивность их симбиотрофного развития. В условиях солевого стресса существенного изменения в соотношении длин побегов и корней при инокуляции ризобиями выявлено не было, однако соотношение массы побегов к их длине возрастало от 0,16-0,34 мг/мм до 0,52-0,68 мг/мм. У растений люцерны, инокулированных солеустойчивым штаммом *S. meliloti* СА67 (не способен расти в присутствии 3 % NaCl), утрата СЭ сопровождалась удлинением побегов и корней соответственно на 36 и 79 %, хотя их масса не изменялась по сравнению с таковой у неинокулированных растений. У растений, инокулированных солеустойчивыми штаммами СХМ1-188 и 1021, при воздействии стресса СЭ сохранялась, однако стимулирующего действия ризобий на рост побегов и корней не обнаружили. Tn5-мутанты F и GL1, несмотря на сниженную СЭ, оказывали такое же влияние на габитус растений, как и родительские штаммы. В настоящей работе мы впервые показали, что проявление СЭ зависит от факторов двух типов — трофических (определяются интенсивностью симбиотической  $N_2$ -фиксации) и регуляторных (предположительно связаны с модификациями гормонального статуса растений, влияющими на активность корневых и побеговых меристем). Генетические модификации регуляторной (ростстимулирующей) активности ризобий могут быть важным подходом для оптимизации симбиотрофного питания бобовых культур азотом, а также для их адаптации к эдафическим (осмотическим) стрессам.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии (ризобии), бобовые растения, азотфиксация, ростстимулирующая активность, симбиотическая эффективность, солевой стресс, габитус растений, *Medicago sativa*, *Sinorhizobium meliloti*.

Симбиотическая эффективность (СЭ), или способность увеличивать продуктивность (массу, накопление азота, количество семян) у бобо-

\* Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-26-00094.

вых растений-хозяев, — важнейший признак клубеньковых бактерий (ризобий), характеризующий их адаптивный потенциал и практическую значимость (1, 2). Этот признак определяется в первую очередь фиксацией молекулярного азота ( $N_2$ ), которая осуществляется ризобиями в корневых клубеньках и контролируется генотипами обоих партнеров (3). Однако генетические механизмы контроля СЭ до сих пор остаются малоизученными.

Наибольшая интенсивность  $N_2$ -фиксации характерна для быстрорастущих ризобий (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*), которые в условиях симбиоза способны к трансформации в нежизнеспособные внутриклеточные бактериоиды. Их высокая  $N_2$ -фиксирующая активность достигается благодаря необратимому ингибированию клеточных функций, необходимых для автономного существования, включая ряд стадий азотно-углеродного обмена и биогенеза клеточных структур (4).

Известно, что СЭ определяется многими генными системами ризобий, в том числе не связанными с работой нитрогеназы (фермента, катализирующего восстановление  $N_2$  в  $NH_3$ ), поэтому следует рассматривать  $N_2$ -фиксирующую активность и СЭ как два разных симбиотических признака (2).

Так, анализ Tn5-мутантов ризобий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*), обладающих повышенной СЭ (5), выявил серию негативных регуляторов симбиоза (*eff*-генов), ни один из которых не входит в состав *nif*- и *fix*-оперонов, кодирующих структуру нитрогеназы, активацию ее синтеза и снабжение энергией (6). Функциональная связь с  $N_2$ -фиксацией выявлена лишь для некоторых *eff*-генов, например для гена *phbA*, инактивация которого нарушает синтез предшественника поли- $\beta$ -гидроксibuтирата (ацетоацетил-КоА), увеличивая количество углерода, направляемого бактериальной клеткой на энергоснабжение нитрогеназы (7).

Ризобии способны синтезировать множество биологически активных веществ, которые влияют на развитие растений-хозяев: фитогормоны (8-10), витамины (11-12), люмихром (14-15). Липохитоолигосахаридные Nod-факторы, с помощью которых ризобии активируют развитие клубеньков, резко изменяют синтез растениями фитогормонов, повышая соотношение цитокининов к ауксинам в корнях, в результате чего активируется деление клеток кортекса и перицикла, приводящее к закладке клубеньковых примордиев (16). Модификации гормонального статуса бобовых, вызываемые ризобиями, могут изменять соотношения ключевых морфометрических параметров надземных и подземных органов (габитус растений), связанных с СЭ (17).

Ранее мы установили, что у однолетней диплоидной люцерны (*Medicago truncatula*) под действием солевого стресса резко уменьшается длина побегов (в 3-14 раза) при сохранении их массы (18). У некоторых линий *M. truncatula* габитус нормализуется при инокуляции  $N_2$ -фиксирующими штаммами *Sinorhizobium meliloti*, что подтверждает сходство механизмов развития симбиоза и реакции растений на солевой стресс. Логично предположить, что регуляторные воздействия микросимбионтов на растения будут наиболее выраженными на фоне влияния генотипических или средовых факторов, снижающих интенсивность  $N_2$ -фиксации.

В настоящей работе мы впервые показали, что проявление СЭ ризобий зависит от факторов двух типов — трофических (определяются интенсивностью симбиотической  $N_2$ -фиксации) и регуляторных (предположительно связаны с модификациями гормонального статуса растений, влияющими на активность корневых и побеговых меристем).

Целью нашей работы было изучение влияния активно фиксирую-

щих N<sub>2</sub>, но контрастно различающихся по солеустойчивости штаммов ризобий *Sinorhizobium meliloti* на показатели габитуса и продуктивности у многолетней тетраплоидной люцерны (*Medicago sativa* L.) при действии солевого стресса, а также при мутациях микросимбионтов, снижающих симбиотическую эффективность.

**Методика.** В работе использовали активно фиксирующие N<sub>2</sub> штаммы клубеньковых бактерий люцерны: 1021 — стандартный лабораторный штамм (19), СХМ1-188 — УФ-индуцированный мутант штамма СХМ1, обладающий повышенной СЭ (20), и СА67 — штамм, выделенный из почвы в Таджикистане (21). Кроме того, исследовали Tn5-индуцированные мутанты — F (получен от штамма СА67 в настоящей работе) и GL1 (получен от штамма 1021 в университете г. Дальхаус, Канада). Солеустойчивость штаммов определяли на плотной (1,5 % агар-агара) среде ТУ с разными концентрациями NaCl (от 2,0 до 4,5 %).

Семена люцерны посевной сорта Агния, устойчивого к эдафическим стрессам, получены во Всероссийском НИИ кормов им. В.Р. Вильямса (Московская обл., г. Лобня).

Бобово-ризобияльный симбиоз изучали в микровегетационных опытах при выращивании растений в стерильных пробирках на агаризованной (0,7 %) безазотной среде Красильникова-Кореняко в 8-10-кратной повторности в течение 30 сут (20). Показателем СЭ служила прибавка сухой массы побегов у инокулированных ризобиями растений по сравнению с контрольными (неинокулированными).

Для анализа действия солевого стресса на показатели развития (длина побегов, длина корней, сухая масса корней) растений люцерны их выращивали в среде с добавлением 0,6 % NaCl.

Статистическую обработку данных проводили посредством дисперсионного анализа (22) в программе Microsoft Office Excel 2007.

**Результаты.** Штаммы, использованные в работе, контрастно различались по устойчивости к солевому стрессу: 1021 и СХМ1-188 были способны расти на твердой агаризованной среде 79 при добавлении 3 % NaCl (R-фенотип), тогда как рост штамма СА67 на этой среде оказался подавлен (S-фенотип). Tn5-индуцированные мутанты проявляли пониженную СЭ (фенотип Eff<sup>+/-</sup>), причем мутант F штамма СА67 обладал также повышенной солеустойчивостью (был способен расти в присутствии 3,5 % NaCl).

При симбиозе с люцерной в отсутствие солевого стресса наибольшую СЭ проявил S-штамм СА67: у инокулированных им растений масса и длина побегов повышались соответственно на 163 и 169 % по сравнению с контролем, тогда как длина корней незначительно (на 7 %) снижалась (табл. 1).

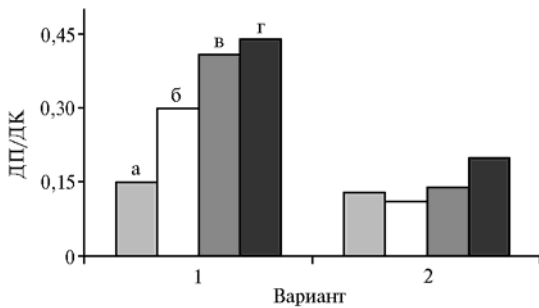
**1. Относительные изменения (%) показателей развития у растений люцерны *Medicago sativa* L., инокулированных штаммами ризобий *Sinorhizobium meliloti*, различающимися по солеустойчивости (микровегетационный опыт)**

Штамм	Без солевого стресса			В условиях солевого стресса (0,6 % NaCl)		
	МП	ДП	ДК	МП	ДП	ДК
СА67 (S)	+163*	+169*	-7	+5	+36*	+79*
1021 (R)	+73*	+90*	-28*	+138*	-1	-7
СХМ1-188 (R)	+96*	+56*	-21*	+160*	-24*	-6

Примечание. В скобках указана способность штаммов к росту на среде с 3 % NaCl: R — наличие, S — отсутствие роста. МП — сухая масса побегов, ДП — длина побегов, ДК — длина корней.  
\*P<sub>0</sub> < 0,05 (достоверное отличие от контроля без инокуляции).

Инокуляция R-штаммами СХМ1-188 и 1021 повышала массу и

длину побегов на 56-96 %, а длина корней достоверно снижалась (на 21-28 %). При этом наблюдались резкие изменения габитуса люцерны: соотношение длины побегов и корней возрастало в 2-3 раза по сравнению с контролем без инокуляции (рис.).



**Соотношение длины побегов и корней (ДП/ДК) у люцерны *Medicago sativa* L. в отсутствие (1) и при действии солевого стресса (0,6 % NaCl) (2) при инокуляции различными штаммами *Sinorhizobium meliloti*:** а — КБИ (контроль без инокуляции), б — СХМ1-188, в — 1021, г — СА67 (микровеgetационный опыт).

достоверно уменьшалась (для штамма СХМ1-188), либо оставалась прежней (для штамма 1021). При этом наблюдалось недостоверное (на 6-7 %) снижение длины корней, поэтому габитус растений изменялся незначительно (см. рис.).

Поскольку в условиях стресса длина побегов и корней возрастала только при инокуляции люцерны S-штаммом СА67, логично предположить, что оптимальные условия для ростстимулирующего воздействия бактерий на растения создавались именно при подавлении СЭ. Однако у низкоэффективного ( $Eff^{+/-}$ ) мутанта F, несмотря на его повышенную солеустойчивость, воздействие на габитус растений оказалось таким же, как у родительского штамма CF67 (табл. 2).

## 2. Симбиотическая эффективность мутантного (F) и родительского (СА67) штаммов *Sinorhizobium meliloti* на растениях люцерны *Medicago sativa* L. в зависимости от действия солевого стресса (микровеgetационные опыты)

Инокулюм	МП, мг	ДП, мм	ДК, мм	Габитус растений	
				ДП/ДК	МП/ДП
Без солевого стресса					
СА67	23,7 <sup>a</sup>	86,1 <sup>a</sup>	195,3 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>
F	17,3 <sup>b</sup>	64,3 <sup>a</sup>	140,1 <sup>b</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>
Отсутствует	9,0 <sup>c</sup>	32,5 <sup>b</sup>	210,9 <sup>c</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a</sup>
НСР <sub>0,05</sub>	4,85	23,27	15,53	0,08	
В условиях солевого стресса (0,6 % NaCl)					
СА67	9,8 <sup>c</sup>	15,2 <sup>c</sup>	75,5 <sup>c</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,65 <sup>a</sup>
F	8,0 <sup>c</sup>	15,3 <sup>c</sup>	64,7 <sup>c</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,52 <sup>b</sup>
Отсутствует	9,3 <sup>c</sup>	11,0 <sup>d</sup>	42,8 <sup>d</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,85 <sup>c</sup>
НСР <sub>0,05</sub>	1,94	2,08	15,73	0,07	

Примечание. МП — масса побегов, ДП — длина побегов, ДК — длина корней. Разными буквами (а, в, с, d) обозначены достоверно ( $P_0 < 0,05$ ) различающиеся значения для каждого признака.

Не было выявлено изменений габитуса растений и у  $Eff^{+/-}$  мутанта штамма GL1, не отличающегося по солеустойчивости от родительского штамма 1021 (табл. 3).

Влияние инокуляции клубеньковыми бактериями на габитус люцерны (соотношение длины побегов и корней) проявлялось только в отсутствие солевого стресса. При стрессе этот показатель практически не менялся, однако соотношение массы побегов к их длине возрастало с 0,16-

0,34 до 0,52-0,68 мг/мм (см. табл. 2 и 3). Аналогичное изменение габитуса мы наблюдали ранее при воздействии солевого стресса на инокулированные ризобиями растения диплоидной люцерны *M. truncatula* (18). Поскольку количество клубеньков при солевом стрессе достоверно не меняется, очевидно, что у обоих видов люцерны активность побеговых меристем подавляется в большей степени, чем активность клубеньковых меристем (18).

### 3. Симбиотическая эффективность мутантного (GL1) и родительского (1021) штаммов *Sinorhizobium meliloti* на растениях люцерны *Medicago sativa* L. в зависимости от действия солевого стресса (микровегетационный опыт)

Инокулюм	МП, мг	МК, мг	ДП, мм	ДК, мм	Габитус растений		
					МП/МК	ДП/ДК	МП/ДП
Без солевого стресса							
1021	17,9 <sup>a</sup>	4,3 <sup>a</sup>	53,1 <sup>a</sup>	129,6 <sup>a</sup>	4,16 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,34 <sup>a</sup>
GL1	10,5 <sup>b</sup>	2,4 <sup>b</sup>	65,6 <sup>a</sup>	145,5 <sup>a</sup>	4,38 <sup>a</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,16 <sup>b</sup>
Отсутствует	7,5 <sup>bd</sup>	6,5 <sup>c</sup>	27,9 <sup>b</sup>	181,1 <sup>b</sup>	1,15 <sup>b</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,27 <sup>a</sup>
В условиях солевого стресса (0,6 % NaCl)							
1021	10,7 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	20,7 <sup>b</sup>	145,2 <sup>a</sup>	2,14 <sup>c</sup>	0,14 <sup>b</sup>	0,52 <sup>c</sup>
GL1	10,4 <sup>b</sup>	5,3 <sup>a</sup>	15,2 <sup>c</sup>	151,8 <sup>a</sup>	1,96 <sup>c</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,68 <sup>d</sup>
Отсутствует	4,5 <sup>cd</sup>	7,3 <sup>c</sup>	20,8 <sup>b</sup>	156,0 <sup>a</sup>	0,61 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,22 <sup>ab</sup>
HCP <sub>0,05</sub>	4,23	1,27	5,11	32,54	0,97		0,08

Примечание. МП — масса побегов, МК — масса корней, ДП — длина побегов, ДК — длина корней. Разными буквами (a, b, c, d) обозначены достоверно ( $P_0 < 0,05$ ) различающиеся значения для каждого признака.

Логично предположить, что увеличение длины побегов в сочетании с укорочением корней, которое мы наблюдали при инокуляции люцерны ризобиями в отсутствие стресса, улучшало усвоение фиксированного азота, способствуя его транслокации в надземные органы и использованию для развития вегетативной массы и семян. Удлинение побегов и укорочение корней могли быть обусловлены выявленной ранее (16) выработкой ризобиями ингибиторов синтеза ауксинов, которая приводила к снижению соотношения ауксин:цитокнины, стимулируя развитие меристем побегов и клубеньков (сходных по тканевой структуре с побегами), но ингибировала активность корневых меристем. Действительно, у ризобий сои (*Bradyrhizobium japonicum*) интенсивность синтеза цитокининов коррелирует с числом образуемых клубеньков и с СЭ (23). Выявленное нами возрастание длин корней и побегов у *M. sativa* при инокуляции S-штаммом СА67 в условиях стресса могло быть обусловлено тем, что при подавлении нитрогеназной активности усиливался синтез фитогормонов, который осуществляют либо бактерии, либо растительные клетки, подвергшиеся воздействию бактериальных сигналов (16, 25).

Описанные нами эффекты, возможно, были обусловлены системной регуляцией клубенькообразования, которая у модельного бобового *Lotus japonicus* L. начинается с индукции бактериями синтеза сигнальных СЛЕ-пептидов в корнях (16). Воздействие СЛЕ-пептидов на рецепторную киназу HAR1, синтезируемую в побегах, вызывало продукцию ответных сигналов, которые перемещались в корни и блокировали формирование избытка клубеньков. При этом в надземной части растений активировался синтез цитокининов (под контролем белка LjIPT3), которые повышали активность побеговых меристем, но снижали активность меристем корня (24).

Модификации габитуса у растений *M. sativa*, наблюдаемые нами при сочетании солевого стресса и инокуляции чувствительным к нему штаммом *S. meliloti* СА67, могли быть связаны с различной направленностью изменений гормонального статуса, вызываемых этими воздействиями в надземных и подземных органах. Известно, что нарушения синтеза фитогормонов, выявленные у сои (26) и у ряда небобовых растений (27) при солевом стрессе, носят сложный характер: они включают изменения со-

держания салициловой и жасмоновой кислот, участвующих в реакции растений на инокуляцию фитопатогенными и симбиотическими микроорганизмами. Эти изменения могут отражать эволюционную связь ризобий с ризосферными и эндофитными симбионтами, ростстимулирующая активность которых обусловлена главным образом синтезом фитогормонов (28, 29).

Таким образом, анализ изменений габитуса растений люцерны *Medicago sativa* при инокуляции штаммами ризобий *Sinorhizobium meliloti* и под действием солевого стресса показал, что эффективность бобово-ризобиального симбиоза зависит не только от интенсивности N<sub>2</sub>-фиксации, но и от регуляторных воздействий микросимбионтов, которые определяют гормональный статус растений-хозяев. Логично предположить, что в системе клубенькового симбиоза регуляторные воздействия ризобий на бобовые растения существенно активируют их симбиотрофное развитие (например, улучшая ассимиляцию продуктов N<sub>2</sub>-фиксации активно растущими надземными органами). Гены, контролирующие эти воздействия, могут быть использованы для конструирования штаммов ризобий с повышенной симбиотической эффективностью, которая определяется активностью усвоения бобовыми фиксированного азота, а также их устойчивостью к эдафическим стрессам.

Авторы признательны Л.А. Лутовой за критические замечания по статье и С.Н. Юргель, предоставившей мутант *GL1*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Л., 1970.
2. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М., 1973.
3. Terpolilli J.J., Hood G.A., Poole P.S. What determines the efficiency of N<sub>2</sub>-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.*, 2012, 60: 325-389 (doi: 10.1016/B978-0-12-398264-3.00005-X).
4. Haag A.F., Arnold M.F., Myka K.K., Kerscher B., Dall'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G.P. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2013, 37(3): 364-383 (doi: 10.1111/1574-6976.12003).
5. Шарыпова Л.А., Онишчук О.П., Чеснокова О.Н., Фомина-Ещенко J.G., Симаров В.В. Isolation and characterization of *Rhizobium meliloti* Tn5 mutants showing enhanced symbiotic effectiveness. *Microbiology*, 1994, 140: 463-470.
6. Проворов Н.А., Онишук О.П., Юргель С.Н., Курчак О.Н., Чижевская Е.П., Воробьев Н.И., Затовская Т.В., Симаров В.В. Конструирование высокоэффективных симбиотических штаммов бактерий: эволюционные модели и генетические подходы. *Генетика*, 2014, 50(11): 1273-1285 (doi: 10.7868/S0016675814110113).
7. Затовская Т.В. Получение и анализ Tn5-мутантов *Sinorhizobium meliloti* с измененными поверхностными полисахаридами. Автореф. канд. дис. СПб, 2012.
8. Phillips D.A., Joseph C.M., Yang G.P., Martinez-Romero E., Sanborn J.R., Volpin H. Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *PNAS USA*, 1999, 96(22): 12275-12280 (doi: 10.1073/pnas.96.22.12275).
9. Gouws L.M., Botes E., Wiese A.J., Trenkamp S., Torres-Jerez I., Tang Y., Hills P.N., Usadel B., Lloyd J.R., Fernie A.R., Kossmann J., van der Merwe M. The plant growth promoting substance, lumichrome, mimics starch, and ethylene-associated symbiotic responses in lotus and tomato roots. *Front. Plant Sci.*, 2012 (doi: 10.3389/fpls.2012.00120).
10. Khan W., Prithviraj B., Smith D.L. Nod factor [Nod Bj V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. *J. Plant Physiol.*, 2008, 165: 1342-1351 (doi: 10.1016/j.jplph.2007.11.001).
11. Phillips D.A., Torrey J.G. Studies on cytokinin production by *Rhizobium*. *Plant Physiol.*, 1972, 49(1): 11-15 (doi: 10.1104/pp.49.1.11).
12. Palacios O.A., Bashan Y., de-Bashan L.E. Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria — an overview. *Biol. Fer-*

- til. *Soils*, 2014, 50: 415-432 (doi: 10.1007/s00374-013-0894-3).
13. Kanu S.A., Matiru Y.N., Dakora F.D. Strain and species differences in rhizobial secretion of lumichrome and riboflavin, measured using thin-layer chromatography. *Symbiosis*, 2007, 43: 37-43.
  14. Sierra S., Rodelas B., Martinez-Toledo M.V., Pozo C., Gonzalez-Lopez J. Production of B-group vitamins by two *Rhizobium* strains in chemically-defined media. *J. Appl. Microbiol.*, 1999, 86: 851-858 (doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00765.x).
  15. Streit W.R., Joseph C.M., Phillips D.A. Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1996, 5: 330-338.
  16. Ferguson B., Mathesius U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *J. Chem. Ecol.*, 2014, 40: 770-790 (doi: 10.1007/s10886-014-0472-7).
  17. Ogutcu H., Kasimogly C., Elkoca E. Effect of *Rhizobium* strains isolated from wild chickpeas on the growth and symbiotic performance of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) under salt stress. *Turkish J. Agric. Res.*, 2010, 34: 361-371 (doi: 10.3960/tar-0940-34).
  18. Курчак О.Н., Проворов Н.А., Онищук О.П., Воробьев Н.И., Румянцева М.Л., Симаров Б.В. Воздействие солевого стресса на генетически полиморфную систему *Sinorhizobium meliloti*—*Medicago truncatula*. *Генетика*, 2014, 50(7): 777-786 (doi: 10.7868/S001667581406006X).
  19. Meade H.M., Long S.R., Ruvkun G.B., Brown S.E., Ausubel F.M. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.*, 1982, 149: 114-122.
  20. Федоров С.Н., Симаров Б.В. Получение мутантов с измененными симбиотическими свойствами у *Rhizobium meliloti* под действием УФ-лучей. *Сельскохозяйственная биология*, 1987, 9: 44-49.
  21. Roumiantseva M.L., Andronov E.E., Sharypova L.A., Damman-Kalinovskii T., Keller M., Young J.P.W., Simarov B.V. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the Central Asian alfalfa gene center. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(9): 4694-4697 (doi: 10.1128/AEM.68.9.4694-4697.200).
  22. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М., 1980.
  23. Драговоз И.В., Леонова Н.О., Иутинская Г.А. Синтез фитогормонов штаммами *Bradyrhizobium japonicum* различной симбиотической эффективности. *Микробиол. журн.*, 2011, 3: 29-35.
  24. Okamoto S., Ohnishi E., Sato S., Takahashi H., Nakazono M., Tabata S., Kawaguchi M. Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HARI-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.*, 2009, 50: 67-77 (doi: 10.1093/pcp/pcn194).
  25. Theunis M., Kobayashi H., Broughton W., Prinsen E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2004, 17(10): 1153-1161 (doi: 10.1094/MPMI.2004.17.10.1153).
  26. Hamayun M., Khan S.A., Khan A.L., Shinwari Z.K., Hussain J., Song E.Y., Kang S.M., Kim Y.H., Khan M.A., Lee I.J. Effect of salt stress on growth attributes and endogenous growth hormones of soybean cultivar Hwangkeumkong. *Pakist. J. Bot.*, 2010, 42(5): 3103-3112.
  27. Ryu H., Cho Y.G. Plant hormones and salt stress tolerance. *J. Plant Biol.*, 2015, 58: 147-155 (doi: 10.1007/s12374-015-0103-z).
  28. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. *Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза* /Под ред. И.А. Тихоновича. СПб, 2012.
  29. Yang J., Kloepper J.W., Ryu C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Sci.*, 2009, 14(1): 1-4.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
микробиологии,  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: provorovnik@yandex.ru

Поступила в редакцию  
30 декабря 2015 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, V. 51, № 3, pp. 343-350

## IMPACTS OF INOCULATION WITH *Sinorhizobium meliloti* STRAINS DIFFERING IN SALT TOLERANCE ON THE PRODUCTIVITY AND HABITUS OF ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

N.A. Provorov, O.P. Onishchuk, O.N. Kurchak

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail provorov@newmail.ru

## Abstract

Symbiotic efficiency (SE) in nodule bacteria (rhizobia) characterizes their adaptive potential and practical significance. This trait is closely related to fixation of molecular nitrogen ( $N_2$ ) which is implemented by rhizobia in root nodules and is controlled by genotypes of both partners. The highest intensity of  $N_2$  fixation is typical for fast-growing rhizobia (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*). However, SE (impact of the rhizobia inoculation on the plant biomass) is determined by many gene systems of rhizobia including those not related to operation of nitrogenase. Therefore,  $N_2$ -fixing activity and SE should be considered as two different symbiotic features. Specifically, rhizobia can synthesize biologically active substances (phytohormones, vitamins, lumichrome) which influence the development of host plants. The aim of our research was to explore the impacts of *Sinorhizobium meliloti* strains which are fixing actively  $N_2$  but are contrasting in salt resistance on productivity and on the indices of habitus (ratios of different plant morphometric traits) in perennial tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). These impacts were studied under influences of the salinity stress and of the micro-symbiont mutations affecting SE. We used *S. meliloti* strains: 1021 (standard laboratory strain), CXM1-188 (UV-induced mutant of strain CXM1 possessing an increased SE) and CA67 (strain isolated from the Tajikistan soils). Besides, we used Tn5-induced mutants with a decreased SE: F (obtained from strain CA67 in this research) and GL1 (obtained from strain 1021 at Dalhousie University, Canada). Seeds of alfalfa cultivar Agnia resistant to edaphic stresses were obtained from All-Russia Research Institute of Fodders named after V.R. Williams (Lobnya, Moscow Province). The legume-rhizobia symbiosis was studied in the microvegetative trials by analyzing different morphometric traits (mass and length of shoots and roots) and their ratios as dependent on the salinity stress (0.6 % NaCl). In the absence of stress, all *S. meliloti* strains possessing the high  $N_2$ -fixing activities but contrasting in salt tolerance resulted in the increased mass and length of alfalfa shoots combined with the decreased length of roots. These effects lead to a drastic change in the plant habitus (shoot:root ratios for length increased 2-3 fold) which are perhaps responsible for the high intensity of symbiotrophic alfalfa development. Under the salinity stress, no significant changes of the shoot:root length ratio were revealed, while the mass:length ratio in shoots was increased from 0.16-0.34 mg/mm to 0.52-0.68 mg/mm. In plants inoculated with the salt-sensitive *S. meliloti* strain CA67 (unable to grow in the presence of 3 % NaCl), loss of SE induced by the salinity stress was accompanied by the increase of shoot and root length (by 36 % and 79 %, respectively) although their masses were not changed with respect to non-inoculated control. In plants inoculated with the salt-tolerant strains CXM1-188 and 1021, SE under the salinity stress was retained while the stimulatory impacts on the shoot and root growth were not revealed. The Tn5 mutants F and GL1 characterized by the decreased SE did not differ from parental strains in their influences on plant habitus. In this work we demonstrated for the first time that the SE depends on two factors — nutritional (determined by  $N_2$  fixation) and regulatory (possibly mediated by modulations of hormonal status in plants which influence the activities of shoot and root meristems). The genetic modifications of regulatory (growth-stimulatory) rhizobia activities may represent an important approach for optimizing the symbiotrophic nitrogen nutrition in the leguminous crops and for their adaptations to the edaphic (osmotic) stresses.

Keywords: nodule bacteria (rhizobia), leguminous plants,  $N_2$  fixation, growth-stimulatory activity, symbiotic efficiency, salinity stress, plant habitus, *Medicago sativa*, *Sinorhizobium meliloti*.

### Научные собрания

#### ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

#### «НОВЫЕ ПАРАДИГМЫ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ И КАЧЕСТВО РАСТЕНИЕВОДЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ»

(4-5 августа 2016 года, г. Саратов)

**Организаторы:** Вавиловское общество генетиков и селекционеров, Федеральное агентство научных организаций, Научный совет по генетике и селекции Российской академии наук, ФГБНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока.

**Тематика:** конференция посвящена состоянию и перспективам исследований по селекции растений в России. Одновременно пройдет Ярмарка сортов ведущих селекционных центров Российской Федерации. Будут обсуждаться вопросы, имеющие первостепенное значение для развития селекции растений в Российской Федерации в условиях жесткой конкуренции со стороны зарубежных селекционно-семеноводческих фирм, использование инновационных технологий в селекции растений, в том числе биотехнологии и генетической инженерии.

**Контакты и информация:** <http://www.arisersar.ru>; <http://www.vogis.org>