

ORIGINAL ARTICLE

Physiological distinctions of pea symbiotic mutants with various nodulation level under inoculation by *Rhizobium leguminosarum*

Akimova G.P., Sokolova M. G., Maksimova L.A.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SD RAS 664033, Irkutsk, Lermontov sr., 132, p/b 317, Russia

*E-Mail: SokolovaMG@sifibr.irk.ru

Received July 4, 2012

The study was focused on morphological and physiological peculiarities of pea plants with various nodulation ability under the infection by *Rhizobium leguminosarum*. Microscopic studies identified distinct features in formation of root nodules in different pea mutants. We revealed differences in the content of indole-acetic acid (IAA) in mutants in the root zones differing by sensibility to *R. leguminosarum*. It was concluded that hormonal system of plants plays an important role in control of nodulation process, and emergence of mutations inducing disturbance of nodule-forming ability apparently depends on root hormonal status, in particular, IAA concentration ensuring both formation of nodule meristem and further organogenesis of the nodule.

Key words: *Rhizobium leguminosarum* / *Pisum sativum* L. / indole-acetic acid / nodulation / pea mutants

ORIGINAL ARTICLE

**Физиологические отличия симбиотических мутантов
гороха с разной степенью нодуляции при инокуляции
*Rhizobium leguminosarum***

Акимова Г.П., Соколова М.Г., Максимова Л.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН), 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317, Россия

*E-Mail: SokolovaMG@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 4 июля 2012 г.

Изучали морфологические и физиологические особенности развития растений гороха с разной способностью к нодуляции при инфицировании *Rhizobium leguminosarum*. Микроскопические исследования выявили отличия при формировании корневых клубеньков у разных мутантов гороха. Обнаружены отличия в содержании индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) у мутантов в зонах корня, отличающихся по чувствительности к *R. leguminosarum*. Сделан вывод, что гормональная система растений играет значимую роль в контроле процесса нодуляции, а проявление мутаций, приводящих к нарушению способности формировать клубеньки, вероятно, зависит от гормонального статуса корня, в частности концентрации ИУК, обеспечивающей как закладку клубеньковой меристемы, так и дальнейший органогенез клубенька.

Key words: *Rhizobium leguminosarum* / *Pisum sativum* L. / indole-acetic acid / nodulation / pea mutants

Симбиотическая азотфиксация - высокоспециализированной структурой, многостадийный контролируемый физиолого-биохимический процесс взаимодействия между клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* и бобовым растением (Спайнк и др, 2002). Данные взаимодействия определяют различные стороны физиологической активности и специфичности процессов роста и развития инфицированного растения. Корневой клубенек является развивающейся в результате этих отношений. Важен каждый этап развития клубенька, начиная с самых ранних стадий. Сбой на любом из этапов может привести к нарушениям развития: его структуры, взаимодействия симбионтов, конечного результата симбиоза – эффективности азотфиксации, роста и продуктивности бобового растения.

Всестороннее исследование процесса становления симбиоза приводит к пониманию того, что клубенькообразование находится под контролем не только симбиотических генов, но и более общих систем управления развитием растения и прежде всего – фитогормональной системы (Bauer et al., 1995; Павлова, Лутова, 2000). К настоящему времени накоплено достаточно информации, свидетельствующей об участии фитогормонов в развитии симбиоза (Badenoch-Jones, 1984; Hirsch, Fang, 1994; Hirsch et al., 1997, 2001).

Для выяснения механизмов развития и функционирования такой сложной фитогормональной системы, требующей высокой степени регуляции, некоторые исследователи в качестве растительного материала используют генотипы с нарушенной симбиотической способностью (Сидорова и др., 1997; van Noorden, 2006). Это дает возможность обнаружить отличительные особенности развития, как на морфологическом, так и на физиологическом уровне. В частности, это позволяет вычлнить в многоступенчатом процессе развития бобово-ризобияльного симбиоза стадии, регулируемые фитогормонами (Павлова и др., 2000; Павлова, Лутова, 2000). Этими авторами показано, что динамика изменений уровня ИУК в корнях гороха в процессе взаимодействия с *Rhizobium* генотип-специфична. Высказано предположение, что мутации, нарушающие процесс клубенькообразования, могут влиять на содержание ауксина в корне.

Целью настоящего исследования было выявление морфологических и физиологических изменений, в том числе содержания индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), у растений гороха с

разной способностью к нодуляции при развитии симбиоза с *Rhizobium leguminosarum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения гороха (*Pisum sativum* L.) исходного сорта Рондо - с обильной, хорошей нодуляцией и его мутантов, резко отличающихся между собой по нодуляции: Nod3 - суперклубеньковый (формирующий много мелких клубеньков) и K14a - бесклубеньковый. Генетика и отдельные морфологические особенности мутантов описаны ранее (Сидорова и др., 1997; Сидорова, Шумный, 1998).

Семена гороха промывали теплой водой с мылом и замачивали в растворе 3% H₂O₂ в течение 20 мин для поверхностной стерилизации семян.

Веgetационные опыты проводили в условиях станции искусственного климата при температуре воздуха днем (22±1) °C, ночью (17±1) °C и относительной влажности (60±5)%. Интенсивность освещения 200 Вт/м² при 16-часовом фотопериоде. Растения гороха выращивали в вегетационных сосудах на прокаленном керамзите с внесением питательной смеси Кнопа (со сниженной в 5 раз дозой минерального азота для инокулированных растений) и комплекса необходимых микроэлементов.

В модельных экспериментах семена проращивали в кюветах на фильтровальной бумаге, смоченной водой, в термостате при температуре 22°C в течение двух суток.

Инокуляцию проводили водной суспензией 3-х суточной культуры клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* эффективного штамма 250a (CIAM 1026) (из коллекции ВНИИ

сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, С-Петербург - Пушкин), в концентрации $2 \cdot 10^7$ кл/мл. Объем бактериальной суспензии во всех вариантах составлял 1 мл на корень. В качестве контроля использовали инокулированные растения.

В отдельных опытах исследования проводились на отрезках корней, отличающихся по восприимчивости к *Rhizobium*. Корни делили на участки 0-20 мм от кончика корня - чувствительный к инфекции и 20-40 мм - нечувствительный (Акимова и др., 2002а).

Микроскопические исследования проводили с использованием микроскопа "Peraval interphako" (Carl Zeiss, Jena, ГДР). Продольные срезы корней и клубеньков окрашивали 1% витальным красителем крезильным голубым 2-3 мин, далее отмывали водой, наносили глицерин и покрывали препарат покровным стеклом. Снимки препаратов получали с использованием фотопленки Fujicolor Superia X-TRA, 400 (Нидерланды) или с помощью цифрового фотоаппарата Nikon Coolpix 4300 (Япония), в обоих случаях применяли фотонасадку МФН-11 (Россия).

Определение содержания индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) после выделения и очистки по Савинскому (1989) проводили методом высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и методом (Методические рекомендации по определению фитогормонов, Киев, 1988).

Эксперименты проводили в трех-шестикратной повторности. Полученные результаты обработаны статистически. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические величины и стандартные

ошибки (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроскопические исследования показали, что уже через 3-6 ч после инокуляции ризобии плотно прилипали к корневым волоскам, то есть наблюдалась колонизация бактерий на корнях растений гороха. Через 1 сутки после инокуляции слизистые колонии бактерий на поверхности корня были хорошо видны в области растущих корневых волосков. Это область проникновения бактерий в ткани корня. Здесь четко видна деформация и искривление корневых волосков. При этом у бесклубенькового мутанта K14a корневые волоски появлялись позднее, медленнее росли и искривленных корневых волосков было значительно меньше, чем у растений сорта Рондо и суперклубенькового мутанта Nod3. У последнего мутанта область со скрученными корневыми волосками была самой большой по длине корня. Если сравнивать эти растения между собой, то у сорта Рондо 40% корневых волосков были скручены, у мутанта Nod3 – более 50% и у мутанта K14a – менее 10%. Важно отметить, что искривление корневых волосков по внешнему виду отличалось у бесклубенькового мутанта: головка корневого волоска не утолщалась как обычно. Тогда как у сорта Рондо и мутанта Nod3 искривление корневых волосков было типичным для растений, инокулированных *Rhizobium leguminosarum* и образующих клубеньки. На более поздних стадиях через 3-5 сут инокуляции корневые волоски могли скручиваться между собой.

Через 1-3 сут в корневых волосках видна инфекционная нить у сорта Рондо и

суперклубенькового мутанта. У бесклубенькового мутанта инфекционная нить не обнаружена.

Через 3-5 сут после инокуляции происходит деление клеток внутреннего кортекса корня у Рондо и Nod3. Через 10 сут (фаза 1 листа) на микроскопических срезах наблюдали образование примордия клубенька, который в это время на наружной поверхности корня визуально практически не был виден. Через 16 сут (фаза 4 листа) появлялись белые мелкие клубеньки на корнях растений сорта Рондо и мутанта Nod3. Зрелые розовые клубеньки обнаружены в фазе развития 7 листа (рис. 1А, Б). Внешне у суперклубенькового мутанта они практически не отличались от Рондо, но были более мелкие и их было больше по количеству.

Что касается бесклубенькового мутанта K14a, через 10 сут у 50% растений наблюдали небольшие утолщения на корнях, которые и через 16 сут в фазе 4 листа остались в виде многочисленных бугорков на боковых корнях растений. Затем эти бугорки в фазе развития 7 листа (29 дней) становились, как и корни серыми, в отличие от мощной корневой системы белого цвета с розовыми клубеньками у сорта Рондо и мутанта Nod3. На продольном срезе розовой окраски, характерной для зрелых клубеньков, у мутанта K14a не наблюдали (рис. 1В).

Таким образом, через 29 дней вегетации у инокулированных растений сорта Рондо и суперклубенькового мутанта формировались и были видны полностью развитые клубеньки. У мутанта K14a небольшие бугорки на корнях к этому времени были серого цвета.

Симбиоз растений гороха (*Pisum sativum L.*) с

Rhizobium leguminosarum является одним из наиболее изученных и представляет последовательность процессов его развития, типичную для многих бобово-ризобияльных систем. Инфицирование происходит через корневые волоски, которые характерно скручиваются и выглядят в виде "ручки зонтика" с утолщенной головкой; ризобии проникают в кортекс внутри инфекционных нитей; во внутренней коре происходит деление клеток, образующих примордий клубенька; формируется симбиотический клубенек.

На примере растений гороха сорта Рондо и мутанта Nod3 видно, что первые шаги во взаимодействии растение-бактерии эффективны: ризобии адсорбировались на поверхности корня, индуцировали искривление корневого волоска, образование инфекционной нити, дедифференцировку и пролиферацию клеток внутренней коры корня, образование примордия и далее самого клубенька. У ненодулирующего мутанта K14a ризобии также адсорбировались на поверхности корня, но в значительно меньшей степени. Частота искривленных корневых волосков у мутанта K14a существенно снижена, изменяется и характер искривления, инфекционная нить не обнаруживается. Деление клеток, если и происходит, то не значительно, это дает только небольшие утолщения на корнях, может, за счет изодиаметрического роста клеток на внешнее воздействие ризобияльной ИУК. Дальнейшего развития настоящего клубенька не происходит. Это может указывать на то, что отсутствие ризобий в утолщениях корня мутанта K14a есть результат происшедшего сбоя в сигналинге взаимодействия растения и бактерий.

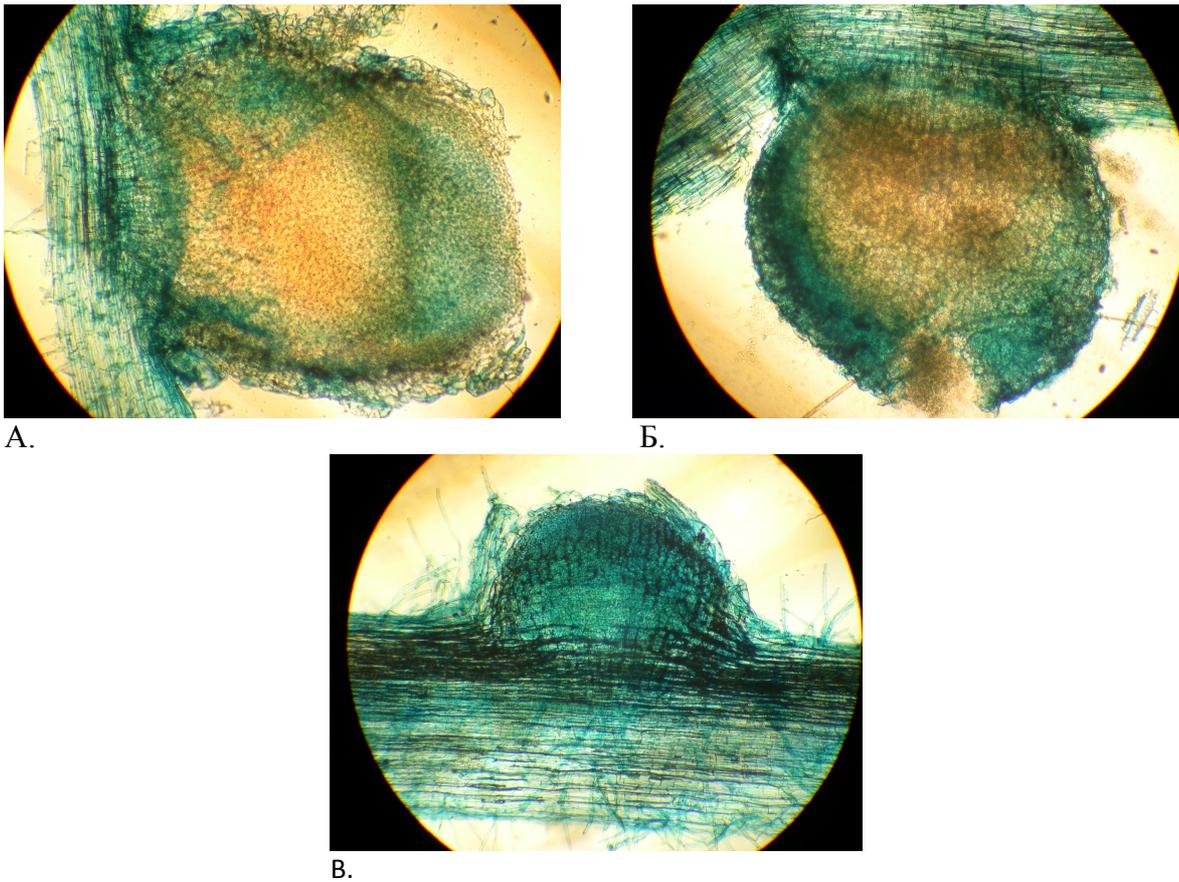


Рисунок 1. Продольный срез клубеньков на корнях гороха сорта Рондо (А) и его мутантов: суперклубеньковый –Nod 3 (Б) и бесклубеньковый - K14a (В). Фаза 7 листа. Увел. в 125 раз.

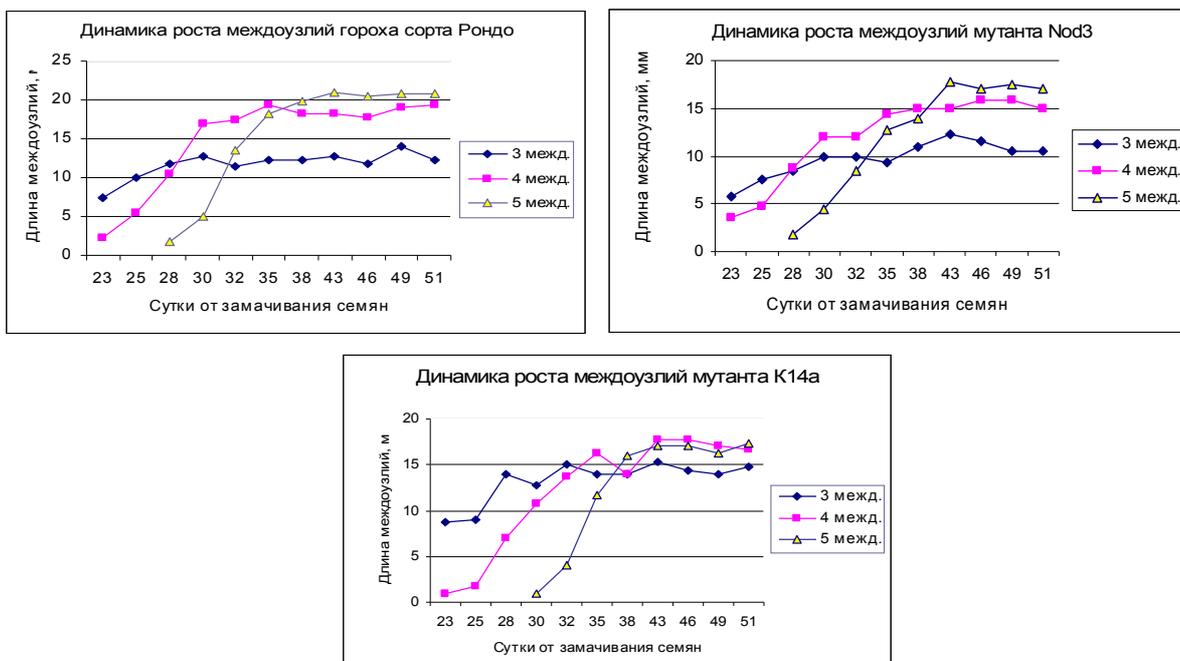


Рисунок 2. Динамика роста стебля гороха сорта Рондо и его мутантов: суперклубенькового Nod3 и бесклубенькового K14a. Обозначения: 3, 4, 5 межд. – 3, 4, 5 междоузлия.

Таблица 1. Морфометрические параметры и продуктивность гороха сорта Рондо и его мутантов (80 суток от замачивания семян).

	Сорт Рондо	Мутант Nod3 суперклубеньковый	Мутант K14a бесклубеньковый
Длина стебля, см	65,2±6,2	34,2±3,3	38,1±2,2
Число междоузлий	21,3±1,7	17,8±1,0	19,0±0,5
Число бобов	3,0±0,4	1,8±0,3	2,6±0,3
Длина боба	42,8±1,6	51,3±2,5	46,6±3,2
Ширина боба	11,5±0,3	13,5±0,4	13,1±0,5
Число семязачатков	5,6±0,2	6,0±0,4	5,8±0,2
Число семян в бобе	2,8±0,1	3,7±0,2	2,9±0,3
% завязываемости	49,8±3,5	62,8±6,3	50,4±5,7
Вес 1 боба, г	0,9±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1
Продуктивность, г	2,4±0,2	1,6±0,4	2,5±0,6

Таблица 2. Сроки наступления фаз онтогенеза гороха сорта Рондо и его мутантов (в сутках от замачивания семян).

Фаза онтогенеза	Сорт Рондо	Мутант Nod3 суперклубеньковый	Мутант K14a бесклубеньковый
Всходы	7,0±1	7,0±1	7,0±1
Начало цветения	69±1	73±1	72±2
Начало образования плодов	74±2	77±2	76±2
Начало образования клубеньков (микроскопические примордии) (1 лист)	9,0±1	9,0±1	9,0±1 на корнях нет корневых волосков
Появление первых клубеньков (4 лист)	16,2±1	16,0±2	16,0±2 небольшие бугорки
Зрелые клубеньки (7 лист)	29,0±1	28,0±1	29,0±2 небольшие бугорки серого цвета

Характеристика исследованных форм гороха по морфометрическим параметрам и продуктивности показала, что исходный сорт Рондо значительно превосходит мутантные формы по длине стебля (рис. 2; табл. 1). На несколько суток раньше начинается цветение и формирование плодов (табл. 2). Вместе с тем, как по общей продуктивности, так и по ее составляющим параметрам мутант K14A не уступает Рондо. Nod 3, однако, значительно уступая по темпам развития и продуктивности (в 1,5 раза ниже, чем у исходного сорта), отличается более высоким процентом завязываемости семян по сравнению с

анализируемыми линиями, тогда как бесклубеньковый мутант имеет продуктивность на уровне сорта Рондо. Вероятно, это объясняется большими энергетическими затратами у мутанта Nod3, связанными с формированием и азотфиксацией чрезмерного количества клубеньков, что негативно сказывается не только на продуктивности, но и на общем росте растения. Надо отметить, что продуктивность Nod3 была ниже за счет меньшего количества бобов, но число семян в них было больше.

Следует сказать, что некоторое увеличение

степени изменчивости у мутантных форм, можно трактовать как следствие дестабилизации процессов онтогенеза.

Регуляция механизмов взаимодействия партнеров ризобиального симбиоза происходит при участии фитогормонов, являющихся одними из основных регуляторов жизнедеятельности растений. Ранее нами было показано (Акимова и др., 2002а), что содержание ИУК в корнях нодулирующих растений гороха через 1 сут после инокуляции значительно возрастает, что подчеркивает участие этого гормона в процессах взаимодействия растений гороха с *Rhizobium* на ранних этапах инфицирования.

Определение содержания ИУК в корнях исходного сорта Рондо и его мутантов с измененной способностью к нодуляции показало, что через 1 сут после инокуляции содержание ИУК в корнях этих растений менялось по-разному и отличалось от исходной формы. У суперклубенькового мутанта Nod3 содержание ИУК возрастало в участках 0-20 и 20-40 мм от кончика корня, у Рондо – в 0-20 мм, а у мутанта K14a – не образующего клубеньки – не изменялось, по сравнению с неинокулированными растениями (табл. 3). Через 9-10 дней после инокуляции в фазе 1 листа содержание ИУК в корнях растений гороха возрастало у сорта Рондо и более чем в 4 раза у мутанта Nod3. В фазе 4 листа (через 16 дней после инокуляции) содержание ИУК у этих растений (Рондо и мутант Nod3) еще более возрастало, затем к фазе 7 листа у сорта Рондо снижалось, а у мутанта Nod3 продолжало возрастать. У мутанта K14a, необразующего клубеньки, содержание ИУК в фазе развития 1 листа возрастало, затем снижалось и в фазе 4 и 7 листьев было значительно ниже, чем у

контрольных растений.

Таким образом, направленность изменений содержания ИУК у форм гороха с разной степенью нодуляции позволяет сделать вывод, что увеличение уровня этого гормона обеспечивает стабильное развитие симбиотических отношений, а снижение его - приводит к нарушению этапов взаимодействия партнеров. В частности, это происходит у бесклубенькового мутанта K14a.

В ряде работ (Mathesius et al, 1997; Roudier et al., 2003) показано, что при воздействии *Rhizobium* уровень экспрессии ауксин-регулируемых генов становится очень высоким, что является следствием подъема концентрации ауксина. Это происходит в корне непосредственно перед делением кортикальных клеток, инициирующих появление клубенькового примордия.

Таким образом, увеличение содержания ИУК в корнях нодулирующих растений гороха (сорта Рондо и мутанта Nod3) является предпосылкой появления меристематической активности в клетках внутренней коры корня и обуславливает закладку клубеньковой меристемы. Отсюда можно заключить, что суперклубеньковый эффект у мутанта Nod3, вероятно, обусловлен индукцией меристематической активности клеток внутреннего кортекса в значительно большей части корня, чем у исходного сорта Рондо. Это происходит в результате повышения уровня ИУК и, как показано нами ранее (Акимова и др, 2002а, 2002б), снижения активности ферментов, находящихся под контролем ИУК, растворимых ПО и ИУКО в отрезках 0-20 и 20-40 мм от кончика корня.

Отсутствие увеличения в содержании ИУК в

корнях бесклубенькового мутанта K14a, вероятно, не обеспечивает стимуляцию меристематической активности кортикальных клеток корня и соответственно формирование клубенька. Образование утолщений на корне, обусловленных, возможно, изодиаметрическим ростом клеток в определенных частях корня, вероятно, является результатом реакции растягивающихся клеток на взаимодействие с *Rhizobium*, имеющих собственную ИУК. При этом, дедифференцировки клеток внутреннего кортекса не происходит.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что концентрация ИУК в корне инокулированных растений, контролируемая ферментами пероксидазного комплекса на начальных этапах взаимодействия, является сигналом, разрешающим или ограничивающим клубенькообразование и регулирующим количество клубеньков на всех более поздних стадиях развития симбиотических отношений.

Таким образом, гормональная система растений играет значимую роль в контроле процесса нодуляции, а проявление мутаций, приводящих к нарушению способности формировать клубеньки, вероятно, зависит от гормонального статуса корня, в частности концентрации ИУК, обеспечивающей как закладку клубеньковой меристемы, так и дальнейший органогенез клубенька.

ЛИТЕРАТУРА

- Badenoch-Jones J., Summons R.E., Rolfe B.G., Letham D.S. (1984) Phytohormones, *Rhizobium* mutants and nodulation in legumes. IV. Auxin metabolism in pea root nodules. *J. Plant. Growth Regul.*, **3**, 23-39.
- Bauer P., Coba D.L., Fruglier F., Poirier S., McKhann H.I., Ratet P., Brown S., Crespi M., Kondorosi A. (1995) Role of plant hormones and carbon/nitrogen metabolism in controlling nodule initiation on alfalfa roots. *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, St. Petersburg, Dordrecht, Boston, London, 443 pp.
- Hirsch A.M., Fang Y. (1994) Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Molec. Biology*, **26**, 5-9.
- Hirsch A.M., Fang Y., Asad S., Kapulnik Y. (1997) The role of phytohormones in plant-microbe symbiosis. *Plant Soil*, **194**, 171-184.
- Hirsch A.M., Lum M.R., Downie J.A. (2001) What makes the *Rhizobia*-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.*, **127**, 1484-1492.
- Mathesius U. (2001) Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J. Exp. Botany*, **52(90001)**, 419-426.
- van Noorden G. E., Ross J. J., Reid J. B., Rolfe B. G., and Mathesius U. (2006) Defective long-distance auxin transport regulation in the *Medicago truncatula* super numeric nodules mutant. *Plant Physiol.*, **140**, 1494-1506.
- Roudier F., Fedorova E., Lebris M., Lecomte P., Györgyey J., Vaubert D., Horvath G., Abad P., Kondorosi A., and Kondorosi E. (2003) The *Medicago species* A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication - associated developmental programs. *Plant Physiol.*, **131**, 1091-1103.
- Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В., Лузова Г.Б., Сидорова К.К. (2002) Роль

- пероксидазы во взаимодействиях растений гороха с *Rhizobium*. *Агрехимия*, **12**, 37-41.
- Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В., Лузова Г.Б., Мартынова Н.Г., Салаяев Р.К., Сидорова К.К. (2002) Пероксидаза во взаимодействиях растений гороха с *Rhizobium*. *Доклады РАН*, **385(2)**, 276-278.
- Лакин Г.Ф. (1980) Биометрия. М: Высшая школа, 294 с.
- Методические рекомендации по определению фитогормонов (1988). Киев, АН Укр.ССР, 78 с.
- Павлова З.Б., Добродумова В.В., Кравченко Л.В., Лутова Л.А. (2000) Характеристика некоторых симбиотических мутантов гороха по признакам, связанным с гормональным статусом. *Генетика*, **36(6)**, 799-804.
- Павлова З.Б., Лутова Л.А. (2000) Клубенькообразование как модель для изучения дифференцировки у высших растений. *Генетика*. **36(9)**, 1173-1188.
- Савинский С.В. (1989) Способ экспресс-очистки фитогормонов из одной растительной пробы. *Регуляторы роста и развития растений*, Киев: Наукова думка, С.288.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю. (1997) Исследование симбиотических мутантов гороха. *Генетика*, **33(5)**, 656-659.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. (1998) Исследование суперклубеньковых мутантов. *Генетика*. **34(10)**, 1452-1454.
- Спайнк Г., Кондороши А., Хукас П. (2002) *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями (Русский перевод под ред. Тихоновича И.А., Проворова Н.А.), СПб, 567 с.