

УДК 579.262

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАЗМЕР БАКТЕРОИДОВ
В КЛУБЕНЬКАХ РАСТЕНИЙ *GLYCINE MAX* И *GLYCINE SOJA*,
ИНОКУЛИРОВАННЫХ ШТАММОМ
BRADYRHIZOBIUM LIAONINGENSE RCAM 04656¹**

© 2025 г. В. С. Перцев^{a, b}, А. Б. Китаева^b, В. Е. Цыганов^{b, *}

^aСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

^bВсероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,

Санкт-Петербург, 196608, Россия

*e-mail: vetsyganov@arriam.ru

Поступила в редакцию 16.10.2024 г.

После доработки 01.12.2024 г.

Принята к публикации 02.12.2024 г.

Известно, что *Glycine max* и *G. soja*, вступая в симбиотические отношения с различными видами ризобий, образуют клубеньки детерминированного типа. В таких клубеньках бактериоды мало дифференцированы и незначительно отличаются от свободноживущих бактерий. Недавно было показано, что в клубеньках *G. soja* при инокуляции штаммом *Bradyrhizobium liaoningense* RCAM04656 бактериоды значительно превышали по размеру свободноживущие бактерии. В данном исследовании установлено, что пониженная температура (21°C) повышает вариативность длины бактериодов в клубеньках как *G. max*, так и *G. soja*, при этом отдельные бактериоды увеличивались в размерах более чем в 15 раз по сравнению с бактериями. При оптимальной температуре (28/24°C) размеры бактериодов варьировали в меньшей степени.

Ключевые слова: бобово-ризобиальный симбиоз, детерминированные клубеньки, бактериоды, *Glycine max*, *Glycine soja*

DOI: 10.31857/S0026365625020103

Симбиотические клубеньки бобовых растений принято разделять на два основных типа: детерминированные и недетерминированные, значительно различающиеся по механизмам развития (Guinel, 2009). Недетерминированные клубеньки, характерные для растений умеренного климата, приобретают цилиндрическую форму в результате продолжительной активности апикальной меристемы (Mergaert, 2020). В таких клубеньках бактерии в инфицированных клетках претерпевают необратимую дифференцировку в бактериоды, проходя несколько раундов эндоредупликации и значительно увеличиваясь в размерах. При этом бактериоды утрачивают способность к делению, что делает невозможным их выход в ризосферу после старения и деградации клубенька (Mergaert et al., 2006).

В детерминированных клубеньках, характерных для тропических бобовых растений, меристема и зона инфекции функционирует непродолжительное

время, а образовавшиеся клубеньки имеют округлую форму (Szczyglowski et al., 1998; Guinel, 2009; Tu et al., 2024). Бактериоды незначительно увеличиваются в размерах и напоминают свободноживущие бактерии. В ходе дифференцировки они сохраняют способность к делению, в результате чего в симбиосоме содержится несколько бактериодов (Szczyglowski et al., 1998). Тем не менее в некоторых исследованиях было описано увеличение размеров бактериодов в инфицированных клетках детерминированных клубеньков (Suganuma et al., 2003).

Более того, недавно было показано, что при инокуляции растений *G. max* штаммом *B. liaoningense* в некоторых симбиосомах наблюдались удлинённые, иногда разветвлённые бактериоды, а в клубеньках, образованных на корнях растений *G. soja*, отдельные бактериоды превышали размер бактерий в 15–17 раз (Kitaeva et al., 2022). Следует

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: DOI: 10.31857/S0026365625020103

отметить, что растения обоих видов сои выращивали в условиях пониженной (21°C) температуры.

Целью данной работы было проанализировать развитие симбиотических клубеньков *G. max* и *G. soja*, формируемых штаммом *B. liaoningense* RCAM 04656, при оптимальной (28°C) и пониженной (21°C) температурах.

В исследовании были использованы семена *Glycine max* (L.) Merrill формообразца К-5892 Fiskeby V и *Glycine soja* Siebold & Zucc. формообразца К-11570 из коллекции Федерального исследовательского центра “Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова”. Для инокуляции растений был использован штамм RCAM 04656 *Bradyrhizobium liaoningense* из коллекции Всероссийского

научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

Семена сои стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 6 мин (*G. max*) и 15 мин (*G. soja*) соответственно, затем промывали в дистиллированной воде 10 раз. Семена проращивали в чашках Петри при 28°C в темноте. Проростки помещали в стерильные горшки с вермикулитом, увлажненным безазотным питательным раствором FP (Fåhræus, 1957). Проростки инокулировали 1 мл водной суспензии бактерий, содержащей 10^7 – 10^8 клеток бактерий, на семя. Растения выращивали в климатической камере MLR-352H (“Sanyo Electric Co”, Япония) при продолжительности светового дня (день/ночь) – 16/8 ч, температуре – 21°C день/ночь или 28°C день/24°C ночь.

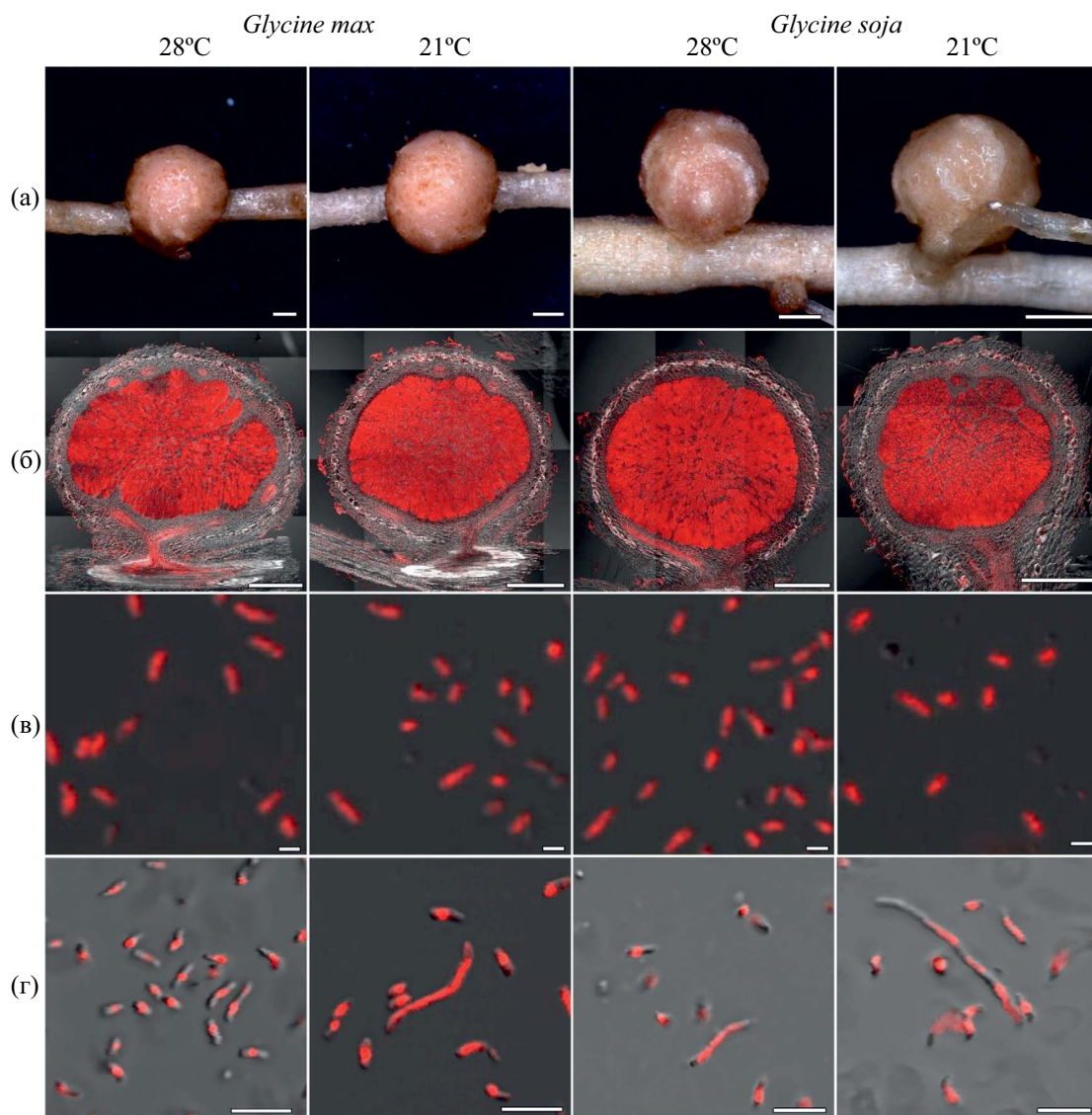


Рисунок. Общий вид клубеньков (а); гистологическое строение клубеньков (б); общий вид бактерий *Bradyrhizobium liaoningense* RCAM04656 (в); общий вид бактериоидов (г). Масштабная линейка – 1 мм (а); 500 мкм (б); 1 мкм (в); 5 мкм (г).

Таблица. Ростовые параметры и параметры клубенькообразования у *Glycine soja* и *Glycine max*, инокулированных *Bradyrhizobium liaoningense*

Температура	Вес сухих побегов, мг		Число клубеньков на растение		Вес сухих клубеньков на растение, мг	
	<i>G. max</i>	<i>G. soja</i>	<i>G. max</i>	<i>G. soja</i>	<i>G. max</i>	<i>G. soja</i>
21°C	260 ± 16	82 ± 4	34.1 ± 2.3*	30.4 ± 1.8*	29.9 ± 2.2	11.1 ± 0.5
28/24°C	499 ± 35	195 ± 11	30.0 ± 2.2*	35.1 ± 1.6*	41.0 ± 3.5	17.5 ± 1.1

Примечание. Приведены средние значения с ошибкой среднего. * – отсутствие статистически значимых различий. Сравнения проводились с использованием критерия Тьюки.

На 28-ой день после инокуляции производили сбор растительного материала.

Для выявления влияния температуры на клубенькообразование растений сои были проанализированы число клубеньков и вес их сухой биомассы.

Пробоподготовка собранных клубеньков проводилась, как было описано ранее (Kitaeva et al., 2022). Визуализацию бактериоидов проводили на основе ранее разработанной методики (Tsyganova et al., 2021). Анализ препаратов срезов клубеньков и выделенных бактериоидов производили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META (“Zeiss”, Германия). Анализ полученных изображений производили с помощью программного обеспечения ZEN 2009 (“Zeiss”).

Клубеньки образовывались во всех изученных вариантах (рисунок). Они были розовато-коричневого цвета и имели сферическую форму. Во всех вариантах клубеньки, образовавшиеся при 28°/24°C, были крупнее, чем при 21°C.

Вес сухой биомассы побегов растений обоих видов сои был значительно больше при выращивании при температуре 28/24°C по сравнению с растениями, выращенными при температуре 21°C (таблица). Число клубеньков достоверно не различалось у растений обоих видов сои при выращивании в условиях как оптимальной, так и пониженной температуры (таблица). При этом вес сухих клубеньков был выше у растений в условиях выращивания при оптимальной температуре (таблица).

Длина бактериоидов была больше в клубеньках растений как *G. max*, так и *G. soja*, выращенных в условиях пониженной температуры. Такие бактериоиды характеризовались большой вариативностью размеров (рис. S1, дополнительные материалы).

В данном исследовании было показано, что температура влияла как на ростовые параметры растений, так и на параметры клубенькообразования. Ранее было показано, что температура влияет на развитие и функционирование симбиотических клубеньков у разных видов бобовых растений (Aranjuelo et al., 2014; Aranjuelo et al., 2015; Serova et al., 2023). Также было показано значительное увеличение длины бактериоидов в детерминированных клубеньках, формируемых обоими видами сои. При

этом следует отметить, что в клубеньках *G. soja* длина бактериоидов варьировала сильнее. Известно, что значительное увеличение бактериоидов в размерах в ходе их дифференцировки, характерное для ризобий, формирующих недетерминированные клубеньки, связано с действием цистеин-богатых пептидов (NCR пептидов), имеющих сходство с антимикробными пептидами дефензинами (Alunni, Gouillon, 2016). В детерминированных клубеньках такого рода пептиды не выявлены, хотя показано, что экспрессия гена, кодирующего пептид NCR035, в клубеньках *Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen вела к дифференцировке бактериоидов (Van de Velde et al., 2010). Очевидно, что выявление механизмов, лежащих в основе влияния пониженной температуры на длину бактериоидов в клубеньках *G. max* и *G. soja* при инокуляции штаммом *B. liaoningense* RCAM04656 требует дальнейшего изучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2021-1055 от 28 сентября 2021 г. о предоставлении гранта в форме субсидии из федерального бюджета на реализацию проекта “Мобилизация генетических ресурсов микроорганизмов на базе Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) при ФГБНУ ВНИИСХМ с использованием сетевого принципа организации”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alunni B., Gourion B. Terminal bacteroid differentiation in the legume–rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond // *New Phytol.* 2016. V. 211. P. 411–417.
- Aranjuelo I., Aldasoro J., Arrese-Igor C., Erice G., Sanz-Sáez Á. How does high temperature affect legume nodule symbiotic activity? // *Legume nitrogen fixation in a changing environment: Achievements and challenges* / Eds. Sulieman S., Tran L.-S.P. Cham: Springer International Publishing, 2015. P. 67–87.
- Aranjuelo I., Arrese-Igor C., Molero G. Nodule performance within a changing environmental context // *J. Plant Physiol.* 2014. V. 171. P. 1076–1090.
- Fåhræus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique // *J. Gen. Microbiol.* 1957. V. 16. P. 374–381.
- Guinel F.C. Getting around the legume nodule. I. The structure of the peripheral zone in four nodule types // *Botany.* 2009. V. 87. P. 1117–1138.
- Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., Kusakin P.G., Sadovskaya A.R., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Tubulin cytoskeleton organization in cells of determinate nodules // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. Art. 823183.
- Mergaert P. Differentiation of symbiotic nodule cells and their rhizobium endosymbionts // *Adv. Bot. Res.* 2020. V. 94. P. 149–180.
- Mergaert P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., Mausset A.-E., Barloy-Hubler F., Galibert F., Kondorosi A., Kondorosi E. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*–legume symbiosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 5230–5235.
- Serova T.A., Kusakin P.G., Kitaeva A.B., Seliverstova E.V., Gorshkov A.P., Romanyuk D.A., Zhukov V.A., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Effects of elevated temperature on *Pisum sativum* nodule development: I – Detailed characteristic of unusual apical senescence // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. Art. 17144. <https://doi.org/10.3390/ijms242417144>
- Suganuma N., Nakamura Y., Yamamoto M., Ohta T., Koiwa H., Akao S., Kawaguchi M. The *Lotus japonicus Sen1* gene controls rhizobial differentiation into nitrogen-fixing bacteroids in nodules // *Mol. Genet. Genomics.* 2003. V. 269. P. 312–320.
- Szczygłowski K., Shaw R.S., Wopereis J., Copeland S., Hamburger D., Kasiborski B., Dazzo F.B., de Bruijn F.J. Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1998. V. 11. P. 684–697.
- Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., Kusakin P.G., Sadovskaya A.R., Borisov Y.G., Tsyganov V.E. *Glycyrrhiza uralensis* nodules: histological and ultrastructural organization and tubulin cytoskeleton dynamics // *Agronomy.* 2021. V. 11. Art. 2508. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122508>
- Tu T., Gao Z., Li L., Chen J., Ye K., Xu T., Mai S., Han Q., Chen C., Wu S., Dong Y., Chen J., Huang L., Guan Y., Xie F., Chen X. Soybean symbiotic-nodule zonation and cell differentiation are defined by NIN2 signaling and GH3-dependent auxin homeostasis // *Dev. Cell.* 2024. V. 59. P. 2254–2269.
- Van De Velde W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Nagy A., Tiricz H., Satiat-Jeunemaître B., Alunni B., Bourge M., Kucho K., Abe M., Kereszt A., Maroti G., Uchiumi T., Kondorosi E., Mergaert P. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis // *Science.* 2010. V. 327. P. 1122–1126.

The Effect of Temperature on the Size of Bacteroids in Nodules of *Glycine max* and *Glycine soja* Plants Inoculated with the *Bradyrhizobium liaoningense* Strain RCAM 04656

V. S. Pertsev^{1, 2}, A. B. Kitaeva², V. E. Tsyganov^{2, *}

¹St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034, Russia

²All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg 196608, Russia

*e-mail: vetsyganov@arriam.ru

It is known that *Glycine max* and *G. soja*, entering into symbiotic relations with different rhizobia species, form nodules of determinate type. In such nodules, bacteroids are low differentiated and only slightly differ from free-living bacteria. Recently, it has been shown that in *G. soja* nodules when inoculated with *Bradyrhizobium liaoningense* strain RCAM04656, bacteroids were significantly larger than free-living bacteria. In this study, decreased temperature (21°C) was found to increase variation in the length of bacteroids in both *G. max* and *G. soja* nodules, with individual bacteroids increasing in size more than 15-fold over bacteria. At the optimal temperature (28°/24°C), the size of bacteroids varied to a lesser extent.

Keywords: legume–rhizobium symbiosis, determinate nodules, bacteroids, *Glycine max*, *Glycine soja*