

Я.В. Пухальский¹ ✉,
С.И. Лоскутов²,
Н.И. Воробьев¹,
Ю.В. Лактионов¹,
А.П. Кожемяков¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ puhalskyan@gmail.com

Поступила в редакцию:
22.04.2023

Одобрена после рецензирования:
11.07.2023

Принята к публикации:
25.07.2023

Yan V. Puhalsky¹ ✉,
Svyatoslav I. Loskutov²,
Nikolay I. Vorobyov¹,
Yuri V. Laktionov¹,
Andrey P. Kozhemyakov¹

¹ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

² All-Russian Research Institute of Food Additives — branch of the V.M. Gorbato Federal Scientific Center of Food Systems of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

✉ puhalskyan@gmail.com

Received by the editorial office:
22.04.2023

Accepted in revised:
11.07.2023

Accepted for publication:
25.07.2023

Особенности развития уникальной бобово-ризобияльной симбиосистемы в условиях металл-индуцированного стресса

РЕЗЮМЕ

В условиях летнего тепличного опыта оценили развитие бобово-ризобияльных симбиосистем на основе мутантного генотипа гороха SGECDt (*Pisum sativum* L.) и его дикой линии SGE, выращенных на среде с добавлением токсичных концентраций Cd и Co. Для инокуляции растений использовали консорциум из эндомикоризного гриба *Glomus* sp.1Fo, клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и ассоциативных АЦК-утилизирующих ризобактерий *Variovorax paradoxus* 5C-2. Токсические элементы значительно ингибировали рост инокулированных и инокулированных растений дикой линии SGE по сравнению с растениями SGECDt.

Содержание Cd в побегах растений обоих генотипов повышалось в присутствии токсичной концентрации Co, последняя, напротив, снижалась. Тот же эффект сохранялся и при инокуляции микроорганизмами. Внесение микробов нивелировало токсичное воздействие ксенобиотиков и увеличивало биомассу у обоих генотипов гороха в отсутствии внесения изучаемых ксенобиотиков. Микробный консорциум также способствовал увеличению транспортировки биофильных микроэлементов-антагонистов в надземные органы гороха.

В целом на основании результатов фрактального расчета, несмотря на ингибирование роста, дикая линия показала более высокие значения степени организации микроэлементов внутри побегов и семян, нежели мутантный генотип. Стагнацию или уменьшение индексов биоконсолидации микроэлементов в гомеостазе побегов мутантной линии, вероятно, можно истолковать перераспределением поступления источников питания между партнерами симбиосистемы в пользу микросимбионтов. Увеличение показателей индекса биоконсолидации в семенах можно считать положительным эффектом, поскольку наилучшая мобилизация микроэлементов в их семядолях, помимо повышения энергии прорастания у потомков, благоприятно скажется и на увеличении адаптационного потенциала растений.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., токсические элементы, микроэлементы, SGECDt, симбиоз, микробный консорциум, азотфиксация

Для цитирования: Пухальский Я.В., Лоскутов С.И., Воробьев Н.И., Лактионов Ю.В., Кожемяков А.П. Особенности развития уникальной бобово-ризобияльной симбиосистемы в условиях металл-индуцированного стресса. *Аграрная наука*. 2023; 373(8): 106–114. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-373-8-106-114>

© Пухальский Я.В., Лоскутов С.И., Воробьев Н.И., Лактионов Ю.В., Кожемяков А.П.

Features of the development of a unique legume-rhizobium symbiosystem under conditions of metal-induced stress

ABSTRACT

The development of legume-rhizobium symbiosystems based on the mutant pea genotype SGECDt (*Pisum sativum* L.) and its wild line SGE grown on a medium supplemented with toxic concentrations of Cd and Co was evaluated under the conditions of a summer greenhouse experiment. Plants were inoculated with a consortium of endomycorrhizal fungus *Glomus* sp.1Fo, nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and associative ACC-utilizing rhizobacteria *Variovorax paradoxus* 5C-2. Heavy metals significantly inhibited the growth of uninoculated and inoculated wild line SGE plants compared to SGECDt plants. The content of Cd in the shoots of plants of both genotypes increased in the presence of a toxic concentration of Co, while the latter, on the contrary, decreased. The same effect persisted after inoculation with microorganisms. The introduction of microbes leveled the toxic effect of heavy metals and increased the biomass in both pea genotypes in the absence of the introduction of heavy metals. The microbial consortium also contributed to an increase in the transport of biophilic microelement antagonists to the aerial organs of the pea. In general, based on the results of fractal calculation, despite growth inhibition, the wild line showed higher values of the degree of organization of microelements inside shoots and seeds than the mutant genotype. The stagnation or decrease in the microelement bioconsolidation indices in the homeostasis of shoots of the mutant line can probably be interpreted by the redistribution of the supply of food sources between the partners of the symbiosystem, in favor of microsymbionts. An increase in the indicators of the bioconsolidation index in seeds can be considered a positive effect, since the best mobilization of trace elements in their cotyledons, in addition to increasing the germination energy of the offspring, will favorably affect the increase in the adaptive potential of plants.

Key words: *Pisum sativum* L., heavy metals, trace elements, SGECDt, symbiosis, microbial consortium, nitrogen fixation

For citation: Puhalsky J.V., Loskutov S.I., Vorobyov N.I., Laktionov Yu.V., Kozhemyakov A.P. Features of the development of a unique legume-rhizobium symbiosystem under conditions of metal-induced stress. *Agrarian science*. 2023; 373(8): 106–114 (In Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-373-8-106-114>

© Puhalsky J.V., Loskutov S.I., Vorobyov N.I., Laktionov Yu.V., Kozhemyakov A.P.

Введение/Introduction

Известно, что представители семейства бобовых (*Fabaceae*) более чувствительны к воздействию токсичных элементов (ТЭ), нежели мятликовые (*Poaceae*) или капустные (*Brassicaceae*). Однако растения типовых родов более экологически пластичны и способны к образованию множественного симбиоза с представителями полезной почвенной микрофлоры (PGPR-микроорганизмы), повышающих адаптационный потенциал макросимбионтов к воздействию различных абиотических стрессов [1, 2]. Ризобактерии способны уменьшать отрицательное влияние ТЭ на растения за счет иммобилизации токсичных ионов вне или на поверхности своей клеточной стенки. Инокуляция также способствует лучшему усвоению растением труднодоступных форм минеральных элементов из субстрата.

О детерминизме усвоения эссенциальных микроэлементов в репродуктивных органах бобово-ризобиальных систем, особенно в семенах на фоне стрессов, известно относительно мало. Между тем понимание стехиометрических изменений, происходящих в метаболизме надземных органов растений, произрастающих на загрязненной почве, позволит исследовать уровень организации пищевого режима бобово-ризобиальной симбиосистемы в ответ на металл-индуцированный стресс и более точно вносить в среду необходимые организму ионы-антагонисты ТЭ для поддержания его стабильного гомеостаза [3]. Для проведения подобных исследований относительно недавно был уникальным мутант гороха посевного (*Pisum sativum* L.) SGECDt, обладающий повышенной устойчивостью к токсичным ионам Cd и Co [4, 5].

Ранее в [6] на примере однократного внесения в дерново-подзолистую почву высокой дозы Cd было показано, что в сочетании с микробным консорциумом растения SGECDt по толерантности к накоплению поллютанта становились сопоставимы с известным его гипераккумулятором — горчицей сарептской (*Brassica juncea*). Однако в исследовании было мало уделено внимания оценке изменения в соотношении между разными биотическими микроэлементами и их роли в адаптационной лабильности симбиосистемы.

Цель работы — изучить взаимосвязь в изменении физиологических параметров развития бобово-ризобиальных симбиосистем, созданных на основе двух различных по степени толерантности к воздействию ТЭ генотипических линий растений гороха посевного, с закономерностями накопления в их вегетативных и генеративных органах полезных микроэлементов.

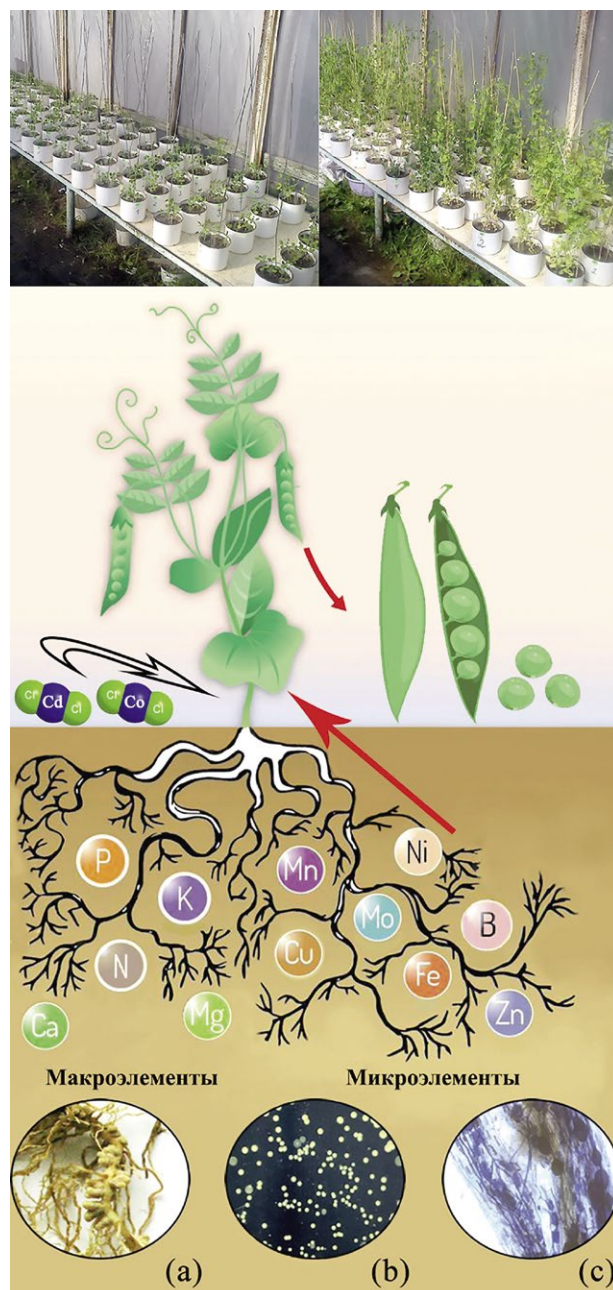
Материалы и методы исследований / Materials and methods

В качестве макросимбионтов для создания бобово-ризобиальных комплексов в исследовании использовали мутант гороха SGECDt, а также его чувствительную к воздействию ТЭ лабораторную дикую линию — SGE. В качестве микросимбионтов, повышающих устойчивость симбиосистем к токсичному загрязнению почв ТЭ, были выбраны штамм рост-стимулирующих ассоциативных АЦК-утилизирующих ризобактерий *Variovorax paradoxus* 5C-2, штамм клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1066 и штамм гриба арбускулярной микоризы (АМГ) *Glomus* sp. 1Fo, полученные из Российской государственной коллекции сельскохозяйственных микроорганизмов (ВКСМ ФГБНУ ВНИИСХМ, СПб, <http://www.arriam.ru/kollekciya-kul-tur1/>). Инокулят *Glomus* sp. 1Fo

получали из приготовленной смеси почвы и корней микоризированных растений плектрантуса (*Plectranthus australis* R.Br.).

Рис. 1. Репрезентативная схема выращивания растений гороха посевного в тепличных условиях в сосудах, заполненных залежной дерново-подзолистой почвой слабой степени окультуренности, загрязненной солями ТЭ (Cd и (или) Co) **Пояснения:** красной стрелкой показан переход микроэлементов в надземную зеленую биомассу (побеги и семена), черная стрелка указывает на процесс искусственного внесения ТЭ в почву; а — *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain RCAM1066, б — *Variovorax paradoxus* strain 5C-2, в — *Glomus* sp. 1Fo. Иллюстрация авторов

Fig. 1. A representative scheme of growing pea plants in greenhouse conditions in vessels filled with fallow sod-podzolic soil of a weak degree of cultivation, contaminated with salts of TM (Cd and (or) Co) **Explanations:** the red arrow shows the transition of trace elements into aboveground green biomass (shoots and seeds), the black arrow indicates the process of artificial introduction of TM into the soil; а — *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain RCAM1066, б — *Variovorax paradoxus* strain 5C-2, в — *Glomus* sp. 1Fo. Illustration by the authors



Вегетационный опыт проводили в пленочной теплице по общепринятой методике¹ при естественном освещении и температурном режиме в летний период (июнь — август 2022 года, Пушкин-8, Санкт-Петербург) (рис. 1).

Температура и влажность в теплице поддерживались на уровне 21 °C и 71% соответственно. Световой день равнялся 16–18 ч. Растения выращивали в эмалированных сосудах, заполненных 2,0 кг залежной дерново-подзолистой почвы слабой степени окультуренности, выдержанной после стерилизации, при комнатной температуре в течение одного месяца. Почва перед заполнением сосудов прошла предварительную стерилизацию и просеивание через сито с диаметром ячеек 5 мм.

Агрохимическая характеристика исходного состояния воздушно-сухой почвы проведена стандартными методами: pH_{KCl} — $4,63 \pm 0,62$, pH_{H_2O} — $5,43 \pm 0,32$, содержание гумуса — $1,67 \pm 0,01\%$, Нг — $1,89 \pm 0,02$ мг-экв / 100 г, сумма обменных оснований — $7,30 \pm 0,70$ мг-экв / 100 г, K_2O — $87,7 \pm 7,3$ мг/кг, P_2O_5 — $105,9 \pm 4,9$ мг/кг.

Конечная кислотность почвы с помощью известкования была доведена до нейтральной. Семена перед посевом ранжированы по весу, поверхностно обработаны концентрированной серной кислотой ($H_2SO_{4\text{конц}}$) в течение 10 мин., тщательно промыты дистиллированной водой и оставлены на проращивание в чашках Петри на увлажненной водой фильтровальной бумаге в темном термостате при 24 °C.

На третьи сутки проклюнувшиеся семена высаживали в количестве 5 шт./сосуд, что примерно соответствует норме высева (100 семян на 1 м²). Лабораторная всхожесть (энергия проращивания) семян составила 66% для SGE и 84% для SGECdt.

Одновременно с посевом каждый проросток инокулировали смесью микроорганизмов: 1,0 мл водной суспензии клубеньковых и ассоциативных ризобактерий (10^7 КОЕ/мл) и 1,0 г почвенно-корневой смеси из накопительной культуры гриба *Glomus sp. 1Fo*.

Удобрения вносили в почву в виде питательного раствора солей из расчета конечного содержания их в почве (мг/кг): NH_4NO_3 — 15, KNO_3 — 200, KH_2PO_4 — 200, $MgSO_4$ — 35, $CaCl_2$ — 25, H_3BO_3 — 3, $MnSO_4$ — 3, $ZnSO_4$ — 3, Na_2MoO_4 — 2. Дальнейшее внесение удобрений в виде подкормок в период вегетации в схеме опыта не предусматривалось, так как это могло нарушить развитие и полезное действие АМГ. Часть сосудов с почвой была искусственно загрязнена токсичными концентрациями ТЭ в виде водных растворов солей ($CdCl_2$ — 15 мг/кг — 4,5 г/м², $CoCl_2$ — 50 мг/кг — 15 г/м²).

Исходное содержание общего Cd в почве составляло $0,28 \pm 0,05$ мг/кг, Co — $5,00 \pm 0,90$ мг/кг. Естественное содержание подвижных форм ТЭ в почве: Cd — $0,09 \pm 0,01$, Co — $1,40 \pm 0,08$ мг/кг. Контролем служили сосуды с неинокулированными растениями и без внесения ТЭ. Влажность субстрата в опыте поддерживалась на уровне 70% от полной полевой влагоемкости (ППВ) путем ежедневного полива под корень согласно рас-

четным формулам по фазам онтогенеза, основанным на весовом методе.

В пределах каждого генотипа и варианта ставилось по четыре аналитических повторности. Общая продолжительность опыта составила 85 сут. (до фазы полной спелости бобов). Поскольку ТЭ оказывают ингибирующее действие на развитие репродуктивных органов и сроки прохождения фаз вегетации, точку съема устанавливали по развитию растений на контроле.

В конце эксперимента побеги извлекали из сосудов, сушили до воздушно-сухого состояния, взвешивали и измельчали до состояния порошка. По соотношению общих масс по вариантам определяли индексы устойчивости растений (Ib^2) согласно формуле:

$$Ib = a/b, \quad (1)$$

где: a — суммарная биомасса растения в опыте (поллютант присутствует) при инокуляции микробным консорциумом или без нее, мг; b — суммарная биомасса растения в контроле без инокуляции микробами, мг.

Далее проводили подсчет количества и биомассы образовавшихся семян и клубеньков на корнях. Семена также отбирали и измельчали в порошок для дальнейшего анализа накопления в них ТЭ и биофильных элементов.

Активность азотфиксации измеряли ацетилен-восстановительным методом на газовом хроматографе GC-2014 (Shimadzu, Япония) с использованием насадочных колонок, заполненных сорбентом ACM, и пламенно-ионизационного детектора нового поколения, обеспечивающего надежный и высокоточный анализ следовых количеств веществ. В качестве инертного газа-носителя использовался азот. По окончании на корнях велся подсчет количества сформировавшихся клубеньков.

Элементный анализ в полученной биомассе проводили с использованием масс-спектрометра Agilent 7500 (США) согласно МУК 4.1.1483-03³ в двух режимах — холодной и горячей плазме. В режиме холодной плазмы (800W) измерялись железо, марганец, кобальт, в режиме горячей плазмы (1350W) — цинк, медь, молибден, никель, бор, кадмий. Калибровочная линия строилась по показаниям миллиардной доли (ppb) группы элементов, содержащихся в покупных стандартных растворах.

Полученные данные обрабатывали с помощью статистической системы R (версия 4.1.0, <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>) для Windows⁴. Критерий Шапиро-Уилка использовали для оценки нормальности распределения параметров количественных переменных [7]. Анализ ANOVA⁵ с критериями Тьюки и Даннета использовался для оценки различий между средними значениями в выборках. Различия между группами считались достоверными при уровне вероятности (p), не превышающем 0,05.

Для визуализации данных и выявления сходства профилей таксономического состава микроэлементного по вариантам опыта был проведен кластерный анализ

¹ Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука. 1968; 265.

² Барсукова В.С. Физиолого-генетические аспекты устойчивости растений к тяжелым металлам. Аналитический обзор. Новосибирск. 1997; 67. ISBN 5-7623-1242-9 <https://www.elibrary.ru/akhaxj>

³ Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой и масс-спектрометрии. Методические указания. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. 2003; 56.

⁴ Weinberg S.L., Harel D., Abramowitz S.K. Statistics Using R: An Integrative Approach. Cambridge: Cambridge University Press. 2020; 692.

ISBN 978-1108719148 <https://doi.org/10.1017/9781108719148>

⁵ Гржибовский А.М. Анализ трех и более независимых групп количественных данных. Экология человека. 2008; 3. — URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-treh-i-bolee-nezavisimyh-grupp-kolichestvennyh-dannyh> (дата обращения: 25.02.2023).

с построением тепловой карты на основе матрицы корреляционных расстояний.

Основной отчетный критерий оценки изменения уровня структурированности микроэлементов в различных органах бобово-ризобияльной симбиосистемы состоял в расчете индексов их фрактальной организации по вариантам опыта.

Фрактальный триплет микроэлементов (ФТМ) — это три микроэлемента, из концентраций которых можно составить трехэлементную логарифметрическую числовую последовательность FL (1):

$$FL = \{\log_2(M3/M3) = 0, \log_2(M2/M3) = -W \log_2(M1/M3) = -2W\}, \quad (2)$$

где $M1 < M2 < M3$ — концентрации трех микроэлементов в растениях (моль / г растения), W — шаг логарифметрической числовой последовательности

Индекс фрактального состава (организации) микроэлементов (I_f) — это отношение числа микроэлементов во фрактальных триплетах к общему числу микроэлементов в растениях (2):

$$I_f = (N_f \cdot R) / N_t, \quad (3)$$

где N_f , N_t — число микроэлементов во ФТМ и общее число микроэлементов в растениях; R — коэффициент, который уменьшается от $R = 1,0$ до $R = 0,25$ при снижении точности представления микроэлементов во ФТМ

Поскольку на генетическом уровне все процессы формообразования растений запрограммированы, в том числе и результирующие соотношения химических элементов в клеточных структурах, эти индексы определяются одними и теми же химическими процессами, происходящими в каждой клетке. В итоге из концентраций химических элементов в растениях можно составить упорядоченные числовые ряды, убывающие по значениям концентраций химических элементов и в соответствии с фрактальным степенным законом [8, 9].

Фрактальная степенная закономерность присутствует в числовых рядах химических элементов не случайно, так как она запрограммирована на генетическом уровне в химических формулах белков. Это свойство рядов подтверждается, например, разветвленной формой корневой системы растений, которая является классическим геометрическим фракталом.

Таким образом, упорядоченные степенные ряды концентраций химических элементов в растениях — это проявление фундаментальных фрактальных законов развития всех живых организмов и биосистем.

В отсутствии внешних воздействий и при достаточном количестве питательных и энергетических ресурсов в окружающей среде растения способны беспрепятственно и в точном соответствии со своей генетической программой формировать надземные органы, наполняя их химическими элементами в соответствии с фрактальными степенными закономерностями. Однако в реальных условиях внешние воздействия могут нарушить нормальную динамику биохимических процессов. В результате и происходит неполная или излишняя комплекция растительных клеток химическими элементами, что наблюдаем по изменению показателей расчетных индексов их соотношения.

Приближение показателя индекса организации к единице означает, что ионы микроэлементов наилуч-

шим образом распределяются внутри локации клеточной стенки и полимерных молекул клеток, то есть эти элементы находятся в связанном виде, отсутствует некомпенсированность питательного режима у растущего или сформированного растительного организма.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Загрязнение почвы ТЭ в модельном опыте отрицательно сказалось на биомассе урожая и количестве сформировавшихся семян на вариантах с отсутствием микробных инокулянтов. На варианте с внесением Cd у SGE снижение биомассы и количества семян составило 44,4% и 50,0% по сравнению с контролем. У мутанта SGECDt значения были на уровне 40,0% и 37,5% соответственно. На варианте с внесением Co — на уровне 40,0% и 37,5% снижения у SGE и на 40,0% и 25,0% снижения у SGECDt. При совместном внесении токсикантов — на уровне 60,0% и 50,0% снижения у SGE и на 64,0% и 37,5% снижения у SGECDt (рис. 2).

Анализ морфометрических данных, приведенный в таблице 1, показал, что в присутствии ТЭ показатели I_b для генотипов и вариантов равнялись, соответ-

Рис. 2. Биомасса и количество сформировавшихся семян с одного растения гороха, выращенного на дерново-подзолистой почве: а — без инокуляции; б — с инокуляцией микробным консорциумом, загрязненной ТЭ; 1 — SGE, 2 — SGECDt, 3 — SGE + Cd , 4 — SGECDt + Cd , 5 — SGE + Co , 6 — SGECDt + Co , 7 — SGE + Cd + Co , 8 — SGECDt + Cd + Co . Столбцы показывают средние ошибки

Fig. 2. Biomass and number of formed seeds from one pea plant grown on soddy-podzolic soil: a — without inoculation; b — with inoculation with a microbial consortium, contaminated with HM; 1 — SGE, 2 — SGECDt, 3 — SGE + Cd , 4 — SGECDt + Cd , 5 — SGE + Co , 6 — SGECDt + Co , 7 — SGE + Cd + Co , 8 — SGECDt + Cd + Co . Bars show mean errors

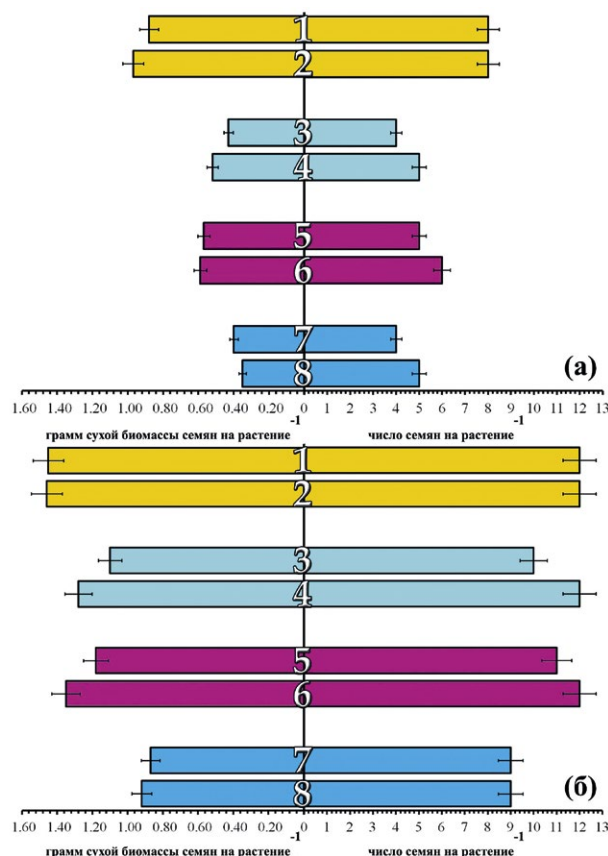


Таблица 2. Биомасса побегов и корней растений гороха, выращенных в модельном эксперименте на дерново-подзолистой почве, обогащенной ТЭ ($n = 20$, $X \pm S_x$)
 Table 2. Biomass of shoots and roots of pea plants grown in a model experiment on soddy-podzolic soil enriched with HM ($n = 3$, $X \pm S_x$)

Вариант, t	Сухая биомасса побегов, г	Сухая биомасса корней, г	Побег/Корень	Общая биомасса культивара, г	lb
SGE	0,94 ± 0,06	0,28 ± 0,01	3,43 ± 0,27	1,22 ± 0,07	1,00
SGE + M	1,75 ± 0,12***	0,41 ± 0,02***	4,53 ± 0,40	2,16 ± 0,12***	—
SGE + Cd	0,58 ± 0,09*	0,15 ± 0,01***	4,10 ± 0,68	0,73 ± 0,09*	0,60
SGE + Cd + M	1,05 ± 0,09	0,27 ± 0,01	3,87 ± 0,27	1,32 ± 0,09	—
SGE + Co	0,80 ± 0,09	0,22 ± 0,01*	3,65 ± 0,47	1,02 ± 0,09	0,84
SGE + Co + M	1,00 ± 0,09	0,25 ± 0,01	3,97 ± 0,34	1,25 ± 0,09	—
SGE + Cd + Co	0,78 ± 0,08	0,15 ± 0,01***	5,86 ± 0,82**	0,93 ± 0,08	0,76
SGE + Cd + Co + M	0,79 ± 0,04	0,23 ± 0,01	3,84 ± 0,51	1,03 ± 0,04	—
SGECDt	0,83 ± 0,02	0,30 ± 0,01	2,86 ± 0,13	1,12 ± 0,02	1,00
SGECDt + M	1,76 ± 0,18***	0,52 ± 0,05***	3,87 ± 0,49	2,28 ± 0,18***	—
SGECDt + Cd	0,86 ± 0,08	0,30 ± 0,02	3,32 ± 0,53	1,16 ± 0,08	1,03
SGECDt + Cd + M	1,63 ± 0,11***	0,43 ± 0,04**	4,02 ± 0,35	2,07 ± 0,13**	—
SGECDt + Co	0,82 ± 0,02	0,27 ± 0,01	3,01 ± 0,11	1,09 ± 0,02	0,97
SGECDt + Co + M	1,05 ± 0,07	0,45 ± 0,01**	2,37 ± 0,17	1,49 ± 0,07	—
SGECDt + Cd + Co	0,80 ± 0,03	0,28 ± 0,01	2,98 ± 0,18	1,07 ± 0,04	0,95
SGECDt + Cd + Co + M	1,36 ± 0,08***	0,48 ± 0,04***	3,53 ± 0,67	1,83 ± 0,08***	—

Примечание: М — инокуляция микробным консорциумом; * различия статистически значимы по сравнению с контролем (SGE, SGECDt), порог ниже которого наблюдаемое различие групп можно считать статистически достоверным $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

ственно, для SGE — 0,60 (Cd), 0,84 (Co), 0,76 (Cd + Co), для SGECDt — 1,03 (Cd), 0,97 (Co), 0,95 (Cd + Co).

Внесение микробов нейтрализовало негативное действие ТЭ, при этом инокуляция (в отсутствие ТЭ) в среднем увеличивала накопление общей биомассы у генотипов в 1,89 раза. Показатели накопления биомассы растений в сравнении с контролем при внесении Cd и Co у SGE снижались в среднем в 1,39 раза, при ино-

куляции — лишь в 1,03 раза; у мутанта ТЭ лишь немного снижали рост (в 1,03 раза), тогда как при инокуляции микробами на фоне токсичного загрязнения биомасса возрастала в среднем в 1,59 раза.

Внесение ТЭ при инокуляции микробов снижало количество клубеньков и ацетиленредуктазную активность дикой линии гороха в 3,8 раза и 2,9 раза на варианте с Cd Cd (кадмием кадмием), в 2,5 раза и 1,7 раза на вариан-

Рис. 3. Параметры симбиотической активности растений гороха линии SGE (a) и мутанта SGECDt (б), инокулированных микробным консорциумом и выращенных на незагрязненной или обогащенной ТЭ дерново-подзолистой слабокультуренной почве. Бары указывают ошибки средних; М — инокуляция микробным консорциумом.

Примечание: +++ статистически значимые отличия от контроля (SGE, SGECDt) по числу клубеньков при $p < 0,05$ (ANOVA, тест Даннета); *** статистически значимые отличия от контроля (SGE, SGECDt) по ацетиленредуктазной активности при $p < 0,05$ (ANOVA, тест Даннета)

Fig. 3. Parameters of symbiotic activity of SGE (a) pea plants and SGECDt (b) mutant plants inoculated by a microbial consortium and grown on uncontaminated or TM-enriched sod-podzolic poorly cultivated soil. Bars indicate mean errors; M is inoculation by microbial consortium.
 Note: +++ statistically significant differences from the control (SGE, SGECDt) in the number of nodules at $p < 0.05$ (ANOVA, Dunnet test); *** statistically significant differences from the control (SGE, SGECDt) in acetylene reductase activity at $p < 0.05$ (ANOVA, Dunnet test)

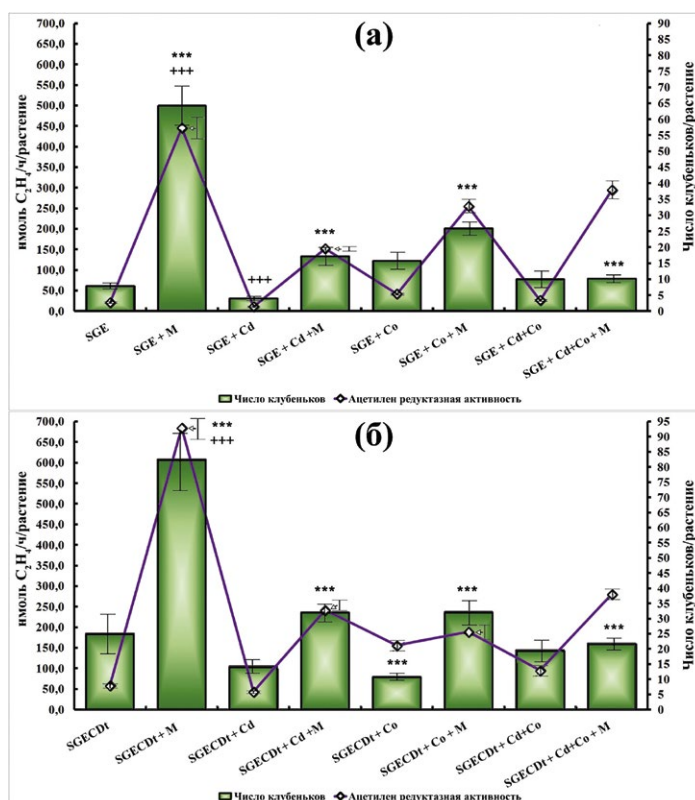
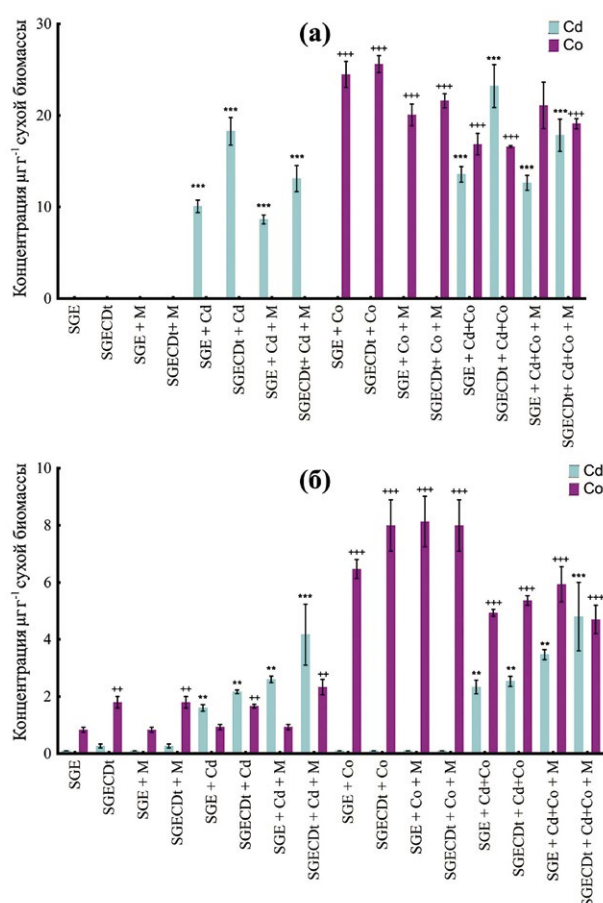


Рис. 4. Концентрация токсических элементов в побегах (а) и семенах (б) гороха, выращенного на дерново-подзолистой слабокультуренной почве с добавками Cd и (или) Co. Столбцы указывают на ошибки средних; M — инокуляция микробным консорциумом.

Примечание: **, *** — статистически значимые отличия от контроля (SGE, SGECdt) по аккумуляции Cd при $p < 0,01$ и $p < 0,001$ (ANOVA, тест Даннета); ++, +++ — статистически значимые отличия от контроля (SGE, SGECdt) по аккумуляции Co при $p < 0,01$ и $p < 0,001$ (ANOVA, тест Даннета)

Fig. 4. Concentration of heavy metals in shoots (a) and seeds (b) of peas grown on sod-podzolic poorly cultivated soil with Cd and (or) Co additives. The columns indicate mean errors; M is inoculation by a microbial consortium.

Note: **, *** — statistically significant differences from the control (SGE, SGECdt) on Cd accumulation at $p < 0.01$ and $p < 0.001$ (ANOVA, Dunnet test); ++, +++ — statistically significant differences from the control (SGE, SGECdt) on Co accumulation at $p < 0.01$ and $p < 0.001$ (ANOVA, Dunnet test)

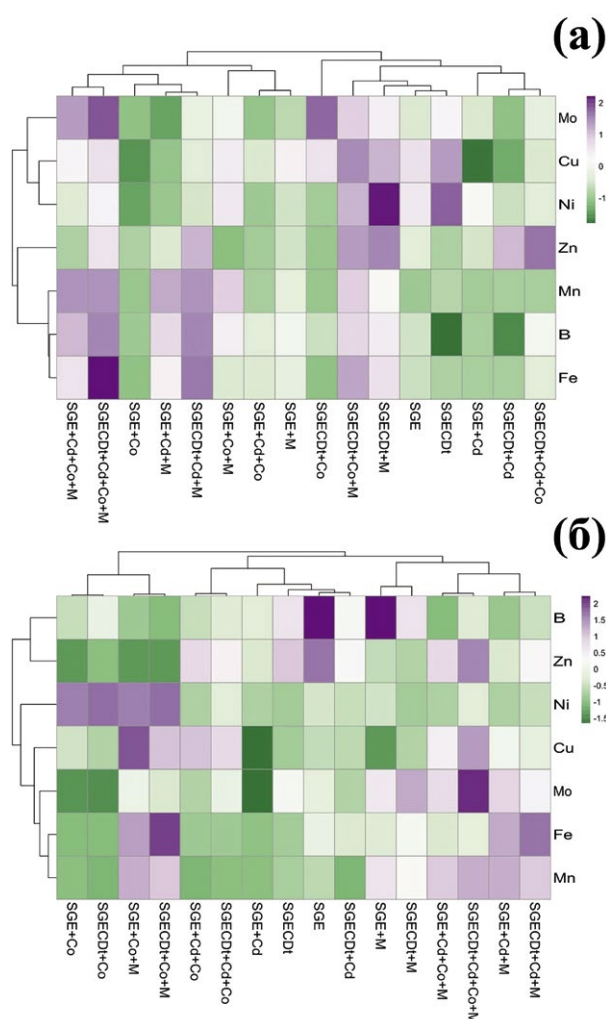


те с Co, 6,3 раза и 1,5 раза на биэлементном внесении по сравнению с контролем. Снижение этих же показателей у мутантного генотипа SGECdt: в 2,6 раза и 2,8 раза — на Cd, в 2,6 раза и 3,6 раза — на Co, в 3,8 раза и 2,4 раза на комбинации соответственно (рис. 3).

Меньшие параметры снижения ацетиленредуктазной активности у мутанта гороха SGECdt могут служить фактом повышенного накопления им азота в тканях, за счет чего поддерживается общая белковая биомасса растений при металл-индуцируемом стрессе. Содержание Cd в побегах растений обоих генотипов повышалось в присутствии токсических концентраций ионов Co, а последнего, напротив, снижалось (рис. 4). Похожие результаты уже отмечались ранее в другой научной работе [10], когда в результате совместного введения Cd и Co в почвенный раствор Co увеличивал концентрацию Cd в 4–6 раз, а влияние Cd уменьшало содержание Co в нем не более

Рис. 5. Тепловые карты изменчивости биофильных микроэлементов в побегах (а) и семенах (б) у разных генотипов гороха, выращенных на незагрязненной или обогащенной ТЭ дерново-подзолистой слабокультуренной почве. Более темный цвет указывает на высокую концентрацию, светлый — на низкую концентрацию элемента; M — инокуляция микробным консорциумом

Fig. 5. Heat maps of variability of biophilic microelements in shoots (a) and seeds (b) of different pea genotypes grown on uncontaminated or HM enriched soddy-podzolic poorly cultivated soil. A darker color indicates a higher concentration, a lighter color indicates a lower concentration of the element; M — Inoculation with microbial consortium



чем в 1,5 раза. По величине максимальной сорбции (Q_{max}) в дерново-подзолистой почве Co превосходит Cd, однако по значению параметра прочности связи функциональными центрами (K_L) уступает последнему [11]. Поэтому в течение первых 21–28 суток после добавления Cd в почвенный раствор токсикант быстро заполняет все свободные высокоселективные центры почвы с отрицательным зарядом.

По мере установления квазиравновесного состояния между ТЭ возникает парный антагонизм, эффект проявления которого наблюдался в виде отсутствия аддитивного негативного эффекта на рост растений и разнице аккумуляции токсикантов в биомассе при их совместной интродукции в среду. Важно отметить, что у мутанта имеется запас по устойчивости к внесению Cd. Ранее было показано, что растения способны выдерживать концентрацию металла в среде до 30 мг/кг [12].

Внесение ТЭ привело к изменению в содержании всех анализируемых микроэлементов в биомассе обоих генотипов гороха (рис. 5). Также влияние *Co* проявилось в увеличении концентрации ионов *K* на 8% в сравнении с контролем у генотипа SGE. У генотипа SGECDt это вызвало увеличение концентрации *K*

на 137%, а *B* и *Mo* — на 17% и 39% соответственно. Эффект от *Cd* у SGE был значим лишь в отношении увеличения ионов *Cu* и *K* (в среднем для обоих генотипов на 242% и 10%). Для мутанта это отразилось лишь в увеличении *Zn* (на 119%). При совместном внесении ТЭ в почву (в противовес возросшему стрессу) данные различия по генотипам сохранились либо еще более увеличились.

Фрактальный анализ показал, что инокуляция микробным консорциумом в отсутствие ТЭ повышает уровень организации микроэлементов в побегах растений, но снижает их уровень организации в семенах (рис. 6). За исключением вариантов с комбинированным влиянием ТЭ и микробов на побеги мутантной линии, при добавлении в почву токсикантов отмечена тенденция к возрастанию индексов детерминированности микроэлементов в обоих органах симбиосистемы. Несмотря на ингибирование роста, дикая линия SGE показала в среднем более высокие значения степени организации микроэлементов внутри побегов и семян, нежели мутантный генотип SGECDt.

Выводы/Conclusion

Неизменность или уменьшение индексов организации микроэлементов в гомеостазе побегов мутантной линии, вероятно, можно истолковать перераспределением поступления источников питания между партнерами симбиосистемы в пользу микросимбионтов. Растения менее устойчивы к ТЭ, чем микроорганизмы, что связано с более сложным уровнем их организации.

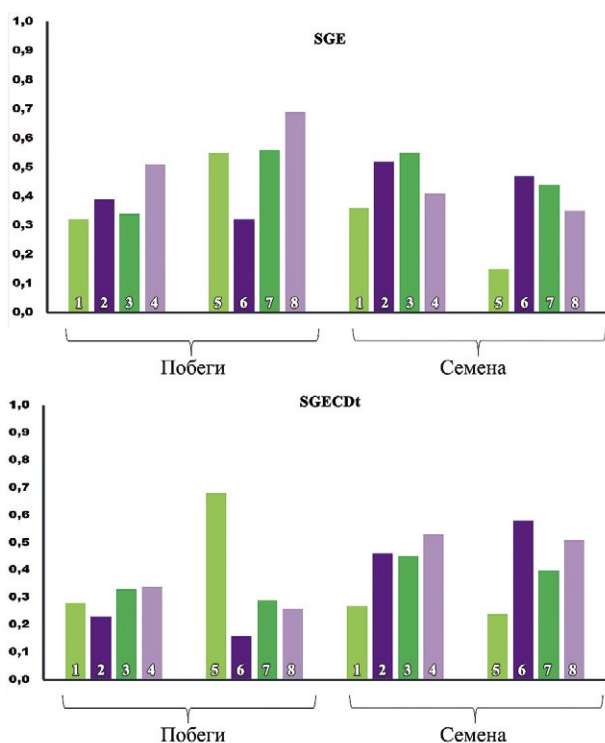
Таким образом, мутант, как генетически модифицированный организм, специально созданный для выживания в условиях металл-индуцированного стресса, за счет оптимизации схемы борьбы за источники питания, возможно, способствует лучшему привлечению полезных PGPR-микроорганизмов из ризосферы.

При формировании семян микроэлементы должны быть наилучшим образом мобилизованы в их запасующих семядолях, также результат увеличения показателей индекса организации можно считать положительным эффектом для последующего прорастания на начальном этапе онтогенеза.

Хотя полученные результаты и являются предварительными, они могут быть использованы в рамках первичного скрининга для сравнительной оценки использования симбиосистем на основе новых селекционных сортов зернобобовых культур, а также создания геоинформационной сети их дальнейшего возделывания в разных (по техногенной нагрузке) земледельческих районах России.

Рис. 6. Индекс фрактального состава микроэлементов в растительно-микробной системе разных генотипов *Pisum sativum* (SGE и SGECDt), выращенных на дерново-подзолистой почве с добавлением *Cd* и (или) *Co*; М — инокуляция микробным консорциумом. Варианты: 1) контроль (незагрязненная почва без инокуляции микробного консорциума), 2) + *Cd* – М, 3) + *Co* – М, 4) *Cd* + *Co* – М, 5) незагрязненная почва и инокулированная микробным консорциумом, 6) + *Cd* + М, 7) + *Co* + М, 8) *Cd* + *Co* + М

Fig. 6. Index of the fractal composition of trace elements in the plant-microbial system of different genotypes of *Pisum sativum* (SGE and SGECDt) grown on soddy-podzolic soil with the addition of *Cd* and (or) *Co*; М — inoculation with microbial consortium. Options: 1) control (uncontaminated soil without microbial consortium inoculation), 2) + *Cd* – М, 3) + *Co* – М, 4) *Cd* + *Co* – М, 5) uncontaminated soil and inoculated with microbial consortium, 6) + *Cd* + М, 7) + *Co* + М, 8) *Cd* + *Co* + М



БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы признательны доктору биологических наук А.А. Белимову за предоставление семенного материала из коллекции лаборатории ризосферной микрофлоры Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Doctor of Biology A.A. Belimov for providing seed material from the collection of the Laboratory of Rhizospheric microflora of All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Статья подготовлена в рамках выполнения государственного задания № FGEW-2021-0004 «Выделение, изучение и скрининг перспективных штаммов симбиотических, ассоциативных бактерий и грибов арбускулярной микоризы для создания высокоэффективных и технологичных биопрепаратов широкого спектра действия и разработка подходов к созданию комбинированных биопрепаратов на основе геномного анализа и подбора штаммов, обладающих комплементарными наборами генов, ответственных за эффективное взаимодействие с растениями».

FUNDING

The article was prepared within the framework of the State Task No. FGEW-2021-0004 «Isolation, study and screening of promising strains of symbiotic, associative bacteria and fungi of arbuscular mycorrhiza for the creation of highly effective and technologically advanced biologics of a wide spectrum of action and the development of approaches to the creation of combined biologics based on genomic analysis and selection of strains with complementary sets of genes responsible for effective interaction with plants».

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные.

Все авторы внесли равный вклад в работу.

Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат.

Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

The authors declare no conflict of interest.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Леппянен И.В. и др. Анализ эффектов совместной инокуляции грибами арбускулярной микоризы и ризобиями на рост и развитие растений гороха *Pisum sativum* L. *Сельскохозяйственная биология*. 2021; 56(3): 475–486. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.475rus>
2. Штарк О.Ю., Борисов А.Ю., Жуков В.А., Неманкин Т.А., Тихонович И.А. Многокомпонентный симбиоз бобовых с полезными почвенными микроорганизмами: генетическое и эволюционное обоснование использования в адаптивном растениеводстве. *Экологическая генетика*. 2011; 9(2): 80–94. <https://www.elibrary.ru/ofytur>
3. Mulet J.M., Campos F., Yenush L. Editorial: Ion Homeostasis in Plant Stress and Development. *Frontiers in Plant Science*. 2020; 11: 618273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618273>
4. Belimov A.A., Malkov N.V., Puhalsky J.V., Safronova V.I., Tikhonovich I.A. High specificity in response of pea mutant SGECDt to toxic metals: Growth and element composition. *Environmental and Experimental Botany*. 2016; 128: 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.04.009>
5. Tsyganov V.E. et al. A Chemically Induced New Pea (*Pisum sativum*) Mutant SGECDt with Increased Tolerance to, and Accumulation of, Cadmium. *Annals of Botany*. 2007; 99(2): 227–237. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl261>
6. Belimov A.A. et al. Microbial Consortium of PGPR, Rhizobia and Arbuscular Mycorrhizal Fungus Makes Pea Mutant SGECDt Comparable with Indian Mustard in Cadmium Tolerance and Accumulation. *Plants*. 2020; 9(8): 975. <https://doi.org/10.3390/plants9080975>
7. Nanda A., Mohapatra B.B., Mahapatra A.P.K., Mahapatra A.P.K., Mahapatra A.P.K. Multiple comparison test by Tukey's honestly significant difference (HSD): Do the confident level control type I error. *International journal of statistics and applied mathematics*. 2021; 6(1-A): 59–65. <https://doi.org/10.22271/math.2021.v6.i1a.636>
8. Богатых Б.А. Фрактальная природа живого: системное исследование биологической эволюции и природа сознания. Москва: URSS. 201; 253. ISBN 978-5-397-02429-7 <https://www.elibrary.ru/qkuptt>
9. Розенберг Г.С. Фрактальные методы анализа структуры сообществ. *Принципы экологии*. 2018; (4): 4–43. <https://www.elibrary.ru/zcuftt>
10. Лаврентьева Г.В., Круглов С.В., Анисимов В.С. Динамика катионного состава почвенного раствора известкованной дерново-подзолистой почвы при загрязнении Co и Cd и изменении pH. *Почвоведение*. 2008; (9): 1092–1100. <https://www.elibrary.ru/jjwgn>
11. Круглов С.В., Анисимов В.С., Лаврентьева Г.В., Анисимова Л.Н. Параметры селективной сорбции Co, Cu, Zn и Cd дерново-подзолистой почвой и черноземом. *Почвоведение*. 2009; (4): 419–428. <https://www.elibrary.ru/jxoumv>
12. Belimov A.A. et al. Rhizobial ACC deaminase contributes to efficient symbiosis with pea (*Pisum sativum* L.) under single and combined cadmium and water deficit stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2019; 167: 103859. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103859>

ОБ АВТОРАХ

Ян Викторович Пухальский, инженер-микробиолог I категории, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, шоссе Подбельского, д. 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург, 196608, Россия
<https://orcid.org/0000-0001-5233-3497>
puhalskyan@gmail.com

Святослав Игоревич Лоскутов, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук, Литейный пр-т, д. 55, Санкт-Петербург, 191014, Россия
lislask@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8102-2900>

REFERENCES

1. Leppyanen I.V. et al. Analysis of the effects of joint inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on the growth and development of pea plants *Pisum sativum* L. *Agricultural Biology*. 2021; 56(3): 475–486 (In Russian). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.475rus>
2. Shtark O.Yu., Borisov A.Yu., Zhukov V.A., Nemankin T.A., Tikhonovich I.A. Multicomponent symbiosis of legumes with beneficial soil microorganisms: genetic and evolutionary bases of application in sustainable crop production. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2012; 2(2): 177–189. <https://doi.org/10.1134/S2079059712020116>
3. Mulet J.M., Campos F., Yenush L. Editorial: Ion Homeostasis in Plant Stress and Development. *Frontiers in Plant Science*. 2020; 11: 618273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618273>
4. Belimov A.A., Malkov N.V., Puhalsky J.V., Safronova V.I., Tikhonovich I.A. High specificity in response of pea mutant SGECDt to toxic metals: Growth and element composition. *Environmental and Experimental Botany*. 2016; 128: 91–98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.04.009>
5. Tsyganov V.E. et al. A Chemically Induced New Pea (*Pisum sativum*) Mutant SGECDt with Increased Tolerance to, and Accumulation of, Cadmium. *Annals of Botany*. 2007; 99(2): 227–237. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl261>
6. Belimov A.A. et al. Microbial Consortium of PGPR, Rhizobia and Arbuscular Mycorrhizal Fungus Makes Pea Mutant SGECDt Comparable with Indian Mustard in Cadmium Tolerance and Accumulation. *Plants*. 2020; 9(8): 975. <https://doi.org/10.3390/plants9080975>
7. Nanda A., Mohapatra B.B., Mahapatra A.P.K., Mahapatra A.P.K., Mahapatra A.P.K. Multiple comparison test by Tukey's honestly significant difference (HSD): Do the confident level control type I error. *International journal of statistics and applied mathematics*. 2021; 6(1-A): 59–65. <https://doi.org/10.22271/math.2021.v6.i1a.636>
8. Bogatykh B.A. The fractal nature of the living: a systematic study of biological evolution and the nature of consciousness. Moscow: URSS. 2011; 253 (In Russian). ISBN: 978-5-397-02429-7 <https://www.elibrary.ru/qkuptt>
9. Rozenberg G.S. Fractal methods of the analysis of a community structure. *Principles of the Ecology*. 2018; (4): 4–43 (In Russian). <https://www.elibrary.ru/zcuftt>
10. Lavrent'eva G.V., Kruglov S.V., Anisimov V.S. Dynamics of the soil solution cationic composition in a limed soddy-podzolic soil contaminated with Co and Cd at variable pH. *Eurasian Soil Science*. 2008; 41(9): 965–972. <https://doi.org/10.1134/S106422930809007X>
11. Kruglov S.V., Anisimov V.S., Lavrent'eva G.V., Anisimova L.N. Parameters of selective sorption of Co, Cu, Zn, and Cd by a soddy-podzolic soil and a chernozem. *Eurasian Soil Science*. 2009; 42(4): 385–393. <https://doi.org/10.1134/S106422930904005X>
12. Belimov A.A. et al. Rhizobial ACC deaminase contributes to efficient symbiosis with pea (*Pisum sativum* L.) under single and combined cadmium and water deficit stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2019; 167: 103859. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103859>

ABOUT THE AUTHORS

Yan Viktorovich Puhalsky, Engineer-microbiologist of the 1st category, All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, 3 Podbelskogo Highway, Pushkin-8, St. Petersburg, 196608, Russia
<https://orcid.org/0000-0001-5233-3497>
puhalskyan@gmail.com

Svyatoslav Igorevich Loskutov, Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher, All-Russian Research Institute of Food Additives — branch of the V.M. Gorbatov Federal Scientific Center of Food Systems of the Russian Academy of Sciences, 55 Liteiny prospect, St. Petersburg, 191014, Russia
lislask@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8102-2900>

Николай Иванович Воробьев,

кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии,
шоссе Подбельского, д. 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург,
196608, Россия
nik.ivanvorobyov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8300-2287>

Юрий Владимирович Лактионов,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
заведующий лабораторией экологии симбиотических
и ассоциативных ризобактерий,
Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии,
шоссе Подбельского, д. 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург,
196608, Россия
laktionov@list.ru

Андрей Петрович Кожемяков,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии,
шоссе Подбельского, д. 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург,
196608, Россия
kojemayakov@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9657-2454>

Nikolay Ivanovich Vorobyov,

Candidate of Technical Sciences, Leading Researcher,
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
3 Podbelskogo Highway, Pushkin-8, St. Petersburg, 196608,
Russia
nik.ivanvorobyov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8300-2287>

Yuri Vladimirovich Laktionov,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher,
Head of the Laboratory of Ecology of Symbiotic
and Associative Rhizobacteria,
All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology,
3 Podbelskogo Highway, Pushkin-8, St. Petersburg,
196608, Russia
laktionov@list.ru

Andrey Petrovich Kozhemyakov,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher,
All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology,
3 Podbelskogo Highway, Pushkin-8, St. Petersburg,
196608, Russia
kojemayakov@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9657-2454>