

УДК 581.1:579.262

ЕФЕКТИВНІСТЬ СИМБІОЗУ РОСЛИН ГОРОХУ ІЗ ТРАНСПОЗАНТАМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. VICIAE 263Б

© 2007 р. Н. М. Мандровська, О. Д. Кругова, С. Я. Коць

Інститут фізіології рослин і генетики

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Методом транспозонового мутагенезу з активного штаму *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263Б отримані Tn5 мутанти, які за симбіотичними показниками перевищували вихідний штам. Встановлено, що у польових умовах серед досліджених штамів лише транспозант – M₁ бульбочкових бактерій гороху достовірно підвищував урожай зерна районованих сортів гороху порівняно із вихідним 263Б і виробничим 245а штамми. Tn5 мутант бульбочкових бактерій M₁ є високоактивним симбіонтом гороху, який можна рекомендувати для виробництва бактеріальних добрив.

Ключові слова: *Pisum sativum* L., транспозанти, симбіоз, азотфіксація

Підвищення зернової продуктивності гороху пов'язане із сукупністю генетичних, екологічних, економічних і агрономічних факторів. Сучасні технології вирощування гороху передбачають обробку насіння препаратами, які містять активні виробничі штами бульбочкових бактерій. На жаль, горох у багатьох випадках слабо відгукується на інокуляцію біопрепаратами, виготовленими на основі промислових штамів. Це пов'язано з багатьма причинами, однією з яких є наявність у ґрунті великої кількості спонтанних, здебільшого надзвичайно агресивних рас бульбочкових бактерій, які створюють конкуренцію виробничим штамам.

Для виробництва бактеріальних добрив під горох, як і під інші бобові культури, використовують штами бульбочкових бактерій, одержані методами аналітичної селекції [3, 10]. Завдяки бурхливому розвитку генетики мікроорганізмів і бульбочкових бактерій, зокрема, з'явилася можливість цілеспрямованого конструювання активних конкурентоспроможних штамів ризобій. У багатьох лабораторіях світу використовують нові генно-інженерні методи одержання штамів ризобій [9, 11, 12]. Одним із

таких методів є транспозоновий мутагенез [1, 8, 14].

Метою нашої роботи було вивчення ефективності симбіозу нових штамів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263Б, отриманих методом транспозонового мутагенезу, з рослинами гороху.

МЕТОДИКА

У роботі використовували нові штами бульбочкових бактерій гороху селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, отримані протягом 2002–2004 рр. за допомогою транспозонового мутагенезу з активного штаму *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263Б з використанням вектора від *E. coli* pSUP2021:Tn5. Відбір Tn5 мутантів із підвищеною симбіотичною ефективністю проводили у мікровеgetаційних дослідках в умовах піщаної культури з внесенням 0,25 н азоту за Гельрігелем. Для проведення дослідів використовували насіння гороху сорт Мінгір, інокульоване транспозантами бульбочкових бактерій. Контролем був варіант з інокуляцією штамом-реципієнтом 263Б. Повторність дослідів 5-ти разова. На 30-й день після появи сходів визначали ефективність симбіозу за приростом надземної маси, азотфіксувальною активністю корневих бульбочок

Адреса для кореспонденції: Мандровська Наталія Михайлівна, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна

[13], їх кількістю та характером розташування на корені.

Польові випробування транспозантів бульбочкових бактерій гороху проводили у 2004–2006 рр. у дослідному господарстві Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (сmt. Глеваха Васильківського району Київської області) на світло-сірих опідзолених, легкосуглинистих ґрунтах, рН – 6,0 – 6,7; вміст гумусу 1,6–1,7 %, азоту- 13,6 мг/кг, P₂O₅ – 36,6 мг/кг, K₂O – 134 мг/кг. Контрольні та дослідні ділянки розміщували у чотирьох рендомізованих повтореннях. Площа облікових ділянок – 5 м². Азотні добрива не вносили. Насіння гороху районованих сортів Дамір 2 та Камелот перед посівом інокулювали транспозантами бульбочкових бактерій, відібраними у мікроевтаційних дослідках за ознакою підвищеної ефективності симбіозу. Культури бульбочкових бактерій вирощували у рідкому середовищі – бобовому відварі протягом трьох діб при температурі 28°C. Інокуляційний титр бактеріальних суспензій становив 10⁹ клітин/мл.

Схема польових дослідів включала варіанти з інокуляцією штамом-реципієнтом 263б, промисловим штамом 245а, окремими Tn5 мутантами. Контролем був варіант без інокуляції – насіння, замочене у стерильній воді. У польових дослідках у фазі цвітіння і зелених бобів визначали приріст надземної маси, кількість бульбочок на рослину, їх азотфіксувальну активність. Після закінчення вегетації з облікової площі підраховували кількість бобів, їх масу і масу зерна. Дані оброблені статистично [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Методом транспозонового мутагенезу із *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263б колекції інституту [3] нами отримані мутанти швидкорослих бульбочкових бактерій гороху, стійких до двох антибіотиків: стрептоміцину – 600 мкг/мл і канаміцину 200 мкг/мл. Симбіотичні властивості транспозантів вивчали в умовах мікроевтаційних дослідів.

У табл. 1 представлені дані, що відображають ефективність симбіозу деяких із досліджуваних транспозантів із різним рівнем азотфіксувальної активності. Штам M₆₈ перевищував за азотфіксувальною активністю вихідний штам 263б на 37%, M₅₆ – на 24%, а M₁ – 67%. Транспозанти M₉₃ і M₈₄ мали низьку азотфіксувальну активність. Мутант M₈₄, який утворював найбільшу кількість бульбочок і за цим показником майже у 1,9 рази перевищував контроль,

азотфіксувальну активність мав у 4 рази нижчу порівняно з вихідним штамом. Важливим показником при оцінці транспозантів бульбочкових бактерій є характер розташування бульбочок на коренях рослин. Як видно з даних табл. 1, у транспозантів M₆₈ і M₅₆ бульбочки були дрібними, гронаподібними, блідо-рожевого або білуватого кольору. У транспозанта M₁ утворилися великі рожеві бульбочки, розміщені вздовж кореня, як у вихідного штаму 263б. У транспозанта M₈₄, який відрізнявся від контролю підвищеною здатністю до утворення кореневих бульбочок, вони були дрібними, діаметром 1–2 мм, зеленуватими і розміщеними вздовж кореня.

Критеріями оцінки активності нових штамів бульбочкових бактерій гороху є не тільки рівень ацетиленвідновлюваної активності корневих бульбочок, а й показники наростання біомаси рослин [2]. Під впливом інокуляції транспозантами посилювалося наростання надземної маси рослин гороху. За даними табл. 2, на 30 день після появи сходів (фаза 7–8 листків) у варіанті з інокуляцією транспозантами M₅₆ і M₁ суха маса рослин була на 38–45% вищою ніж у контролі.

У варіанті з інокуляцією транспозантом M₈₄, який мав знижену азотфіксувальну активність, суха маса рослин гороху перевищувала контрольний варіант лише на 15%. Отримані дані свідчать, що транспозанти, які мали більш високий рівень азотфіксувальної активності, поліпшували азотне живлення рослин та сприяли збільшенню їх надземної маси.

Встановлено, що транспозанти в умовах мікроевтаційного дослідів за показниками сухої маси коренів перевищували вихідний штам 263б. Так, суха маса коренів у варіантах з інокуляцією транспозантами була у 1,5–2 рази вищою ніж у контрольному варіанті. Найбільший приріст маси коренів спостерігався за інокуляції мутантами M₁ і M₅₆ (табл. 2). Можливо, що ефект від інокуляції пов'язаний із впливом транспозантів на процес ризогенезу гороху. Таким чином, за азотфіксувальною активністю та показниками надземної маси і маси коренів були відбрані транспозанти, які перевищували вихідний штам 263б. До таких мутантів належать M₁, M₅₆ та M₉₃. Штами ризобій, отримані генно-інженерними методами, зокрема методом транспозонового мутагенезу, повинні характеризуватися здатністю конкурувати із аборигенними расами того самого виду бульбочкових бактерій, мати підвищену життєздатність у ґрунті [6, 7]. У зв'язку з цим виникла необхідність

ЕФЕКТИВНІСТЬ СИМБІОЗУ

Таблиця 1

Симбіотичні властивості транспозантів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* шт. 263б

Варіант	Кількість бульбочок на 1 рослину, шт.	Азотфіксувальна активність		Характер і розташування бульбочок
		мкмоль С ₂ Н ₄ / (росл. • год).	% до контролю	
Контроль шт. 263б	14,0 ± 1,0	2,48 ± 0,11	100	Великі рожевого кольору бульбочки розміщені вздовж кореня
Транспозант М ₁	18,0 ± 1,5	4,15 ± 0,14	+ 67	Бульбочки великі, рожевого кольору, поодинокі розміщені вздовж кореня
М ₆₈	12,0 ± 1,0	3,41 ± 0,12	+ 37	Бульбочки гронаподібні, дрібні, блідо-рожеві
М ₅₆	10,0 ± 0,8	3,09 ± 0,11	+ 24	Бульбочки зібрані по 3–4 у грони, блідо-рожевого кольору
М ₉₃	9,8 ± 0,9	1,66 ± 0,08	- 66	Дрібні білуваті бульбочки, розміщені вздовж кореня
М ₈₄	25,0 ± 2,1	0,57 ± 0,05	- 23	Бульбочки дрібні, зеленуватого кольору, розміщені на усьому корені

Таблиця 2

Вплив транспозантів бульбочкових бактерій гороху на наростання надземної маси і маси коренів (г/рослину)

Варіант	Надземна маса		Маса коренів	
	сиря	суха	сиря	суха
Контроль-штам 263б	1,5 ± 0,02	0,71 ± 0,03	1,4 ± 0,09	0,21 ± 0,01
Транспозант М ₁	2,1 ± 0,01	0,98 ± 0,02	1,7 ± 0,02	0,53 ± 0,02
М ₆₈	2,1 ± 0,02	0,72 ± 0,03	1,6 ± 0,01	0,32 ± 0,01
М ₅₆	2,3 ± 0,03	1,03 ± 0,02	1,4 ± 0,01	0,48 ± 0,04
М ₉₃	1,8 ± 0,03	0,92 ± 0,04	1,6 ± 0,03	0,45 ± 0,03
М ₈₄	2,2 ± 0,01	0,85 ± 0,03	1,3 ± 0,02	0,46 ± 0,01

Таблиця 3

Вплив транспозантів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263б на ефективність симбіозу із рослинами гороху сорту Дамір 2 у польових умовах (фаза бутонізації – початку цвітіння, 2005 р.)

Варіант	Азотфіксувальна активність бульбочок, мкмоль С ₂ Н ₄ / (росл. • год)	Надземна маса			
		г/рослину	% до контролю	% до шт. 245а	% до шт. 263б
Контроль без інокуляції	0,81 ± 0,04	16,1 ± 0,2			
Штам: Шт. 245а	1,84 ± 0,09	18,2 ± 0,1	+13,0		
Шт. 263б	2,11 ± 0,12	19,3 ± 0,3	+19,8		
М ₁	4,10 ± 0,16	21,3 ± 0,5	+32,2	+17,0	+10,3
М ₆₈	3,30 ± 0,09	20,7 ± 0,2	+22,3	+8,2	+2,0
М ₉₃	1,10 ± 0,05	17,3 ± 0,4	+7,4	-9,5	-8,9

перевірити отримані Тп5 мутанти гороху у польових умовах і порівняти їх ефективність не тільки із ефективністю вихідного, а й промислового штамів. Тому наступний етап роботи був пов'язаний з випробуванням відібраних Тп5 мутантів в умовах польових дослідів із різними районованими сортами гороху.

Як відомо, ефективність бобово-ризобіального симбіозу пов'язана із багатьма факторами і, перш за все, із активністю штамів бульбочкових бактерій [5].

У польовому досліді 2005 р. із сортом гороху Дамір 2 вплив інокуляції активними

Таблиця 4

Урожай зерна гороху сорту Дамір 2 при інокуляції новими транспозантами бульбочкових бактерій (польовий дослід, 2005 р.)

Варіант	Середній урожай, ц/га	Прибавка до контролю		Прибавка до штаму 245 а		Прибавка до штаму 263 б	
		ц/га	%	ц/га	%	ц/га	%
Контроль без інокуляції	34,9						
Штам:							
шт. 245а	42,6	7,7	22,0				
шт. 263б	47,6	12,7	36,0				
М ₁	51,3	16,4	46,9	8,7	20,4	3,7	7,8
М ₆₈	48,2	13,3	38,1	5,6	13,1	0,6	1,2
М ₉₃	40,1	5,2	14,8	-2,5	-9,4	-7,5	-8,4
НІР ₀₅	2,4						

Таблиця 5

Вплив інокуляції новими штамми бульбочкових бактерій на урожай зерна гороху сорту Камелот (польовий дослід, 2006 р.)

Варіант	Середній урожай, ц/га	Прибавка до контролю		Прибавка до штаму 245а		Прибавка до штаму 263б	
		ц/га	%	ц/га	%	ц/га	%
Контроль	27,6						
Штам:							
Шт. 245 а	33,9	6,3	22,8				
Шт. 263 б	34,6	7,0	25,3				
М ₁	39,8	12,2	44,3	5,9	17,4	5,2	15,0
М ₆₈	36,4	8,8	31,8	2,5	7,4	1,8	5,2
НІР ₀₅	2,2						

штамами і Tn5 мутантами на ефективність симбіозу особливо чітко виявився у фази бутонізації – початку цвітіння рослин.

Надземна маса рослин у варіантах із інокуляцією транспозантами була більшою від маси рослин контрольного варіанта на 7,4 – 32,2% (табл. 3). Якщо ці показники порівняти з даними інокуляції промисловим 245а або вихідним 263б штамми, то найбільший приріст надземної маси рослин гороху був притаманний тільки рослинам, інокерованим транспозантами М₆₈ і М₁, що відповідно становив 8,2 – 17,4% і 2,0 – 10,3%. Транспозант М₉₃ посилював приріст надземної маси тільки за відношенням до контролю, тоді як за відношенням до промислового 245а і вихідного 263б штамів цей показник був набагато нижчим. Що стосується азотфіксувальної активності бульбочок, утворених Tn5 мутантами, то вона перевищувала контрольний варіант у 1,3–4,8 рази, промисловий штам 245а – у 1,7–2,2 рази і вихідний штам 263б – у 1,5–1,9 рази. Бульбочки, які утворилися при інокуляції транспозантом М₉₃, за азотфіксувальною активністю перевищували тільки контрольний варіант.

Відомо, що інтегральним показником ефективності симбіозу бульбочкових бактерій і бобових рослин у польових умовах є урожай зерна [6]. За нашими даними, у польовому досліді передпосівна обробка насіння гороху активними штамми бульбочкових бактерій і Tn5 мутантами сприяла підвищенню продуктивності гороху. Як видно із даних табл. 4, інокуляція промисловим штамом 245а на 22% підвищувала масу зерна, а вихідним штамом 263б – на 36% порівняно із контрольним варіантом без інокуляції. Маса зерна при обробці насіння гороху сорту Дамір 2 транспозантами М₁ та М₆₈ достовірно перевищувала цей показник за відношенням до контролю, штаму-еталону і вихідного штаму. У відсотках це становило 46,4%, 20,0% і 7,8% відповідно. Що стосується транспозанта М₉₃, то достовірний ефект від інокуляції спостерігали лише на фоні контролю, прибавка урожаю до штамів 245а і 263б була недостовірною.

Доведено, що ефективність симбіозу залежить не тільки від активності штаму бульбочкових бактерій, а й від генетичного потенціалу мікро- та макросимбіонтів і їх комплементар-

ЕФЕКТИВНІСТЬ СИМБІОЗУ

ності [5], у зв'язку з чим симбіотичні властивості штамів, отриманих генно-інженерними методами, вивчали в дослідях з районованими сортами гороху. Зокрема, протягом вегетаційного періоду 2006 р. ефективність відібраних транспозантів перевіряли у польових умовах з іншим районованим сортом гороху Камелот.

Дані, наведені в табл. 5, свідчать про те, що прибавка урожаю зерна гороху за інокуляції транспозантами і активними штамми ризобій відносно контролю була достовірною в усіх варіантах дослідю. У варіантах із інокуляцією новими транспозантами приріст урожаю становив 2,5–5,9 ц/га порівняно зі штамом 245а і 1,8 – 5,2 ц/га відносно штаму 263б.

Таким чином, сукупність наших експериментальних даних, одержаних у вегетаційних та польових дослідях із районованими сортами гороху, дозволяє зробити висновок, що достовірно підвищувала урожай зерна порівняно із вихідним 263б і виробничим 245а штамми тільки передпосівна інокуляція зерна новим штамом М₁. Штам *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* М₁, отриманий методом – транспозонового мутагенезу, є високоактивним симбіонтом різних сортів гороху, який у подальшому може бути використаний у виробництві бактеріальних добрив.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции* / Под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. – СПб.: Наука, 1998. – С. 12-15.
2. *Генетические основы селекции клубеньковых бактерий* / Под ред. Б.В. Симарова. – Л.: Агропромиздат, 1990. – 190 с.
3. *Доросинский Л.М., Загорье И.В. и др.* Штамм клубеньковых бактерий гороха *R. leguminosarum* 250а ВНИИСХМ – активный симбиотический азотфиксатор. Авт. св. СССР № 48 9750, 1975.
4. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. - 351 с.
5. *Кругова Е.Д., Остапенко Д.Д., Мандровская Н.М.* Сортовая специфичность у гороха при инокуляции различными штаммами клубеньковых бактерий // Физиология и биохимия культ. растений. – 1999. – Т. 26, № 3. – С. 245-251.
6. *Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін.* Біологічний азот / За ред. В.П. Патики. – К.: Світ, 2003. – 424 с.
7. *Проворов Н.А., Симаров Б.В., Федоров С.Н.* Симбиотические свойства разных типов мутантов клубеньковых бактерий // Изв. АН СССР. – 1985. - № 6. – С. 870-884.
8. *Проворов Н.А., Симаров Б.В.* Направления конструирования штаммов клубеньковых бактерий с повышенной симбиотической эффективностью // Молекулярные механизмы генетических процессов. – М., 1991. - С. 140-194.
9. *Симаров Б.В., Тихонович И.А.* Генетические основы бобово-ризобияльного симбиоза // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. - М.: Наука. – 1985. – С. 165-174.
10. *Старченков Ю.П., Мандровська Н.М., Нічик М.М. та ін.* Штам бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* для одержання бактеріальних добрив під горох. Пат. України на винахід № 21012, 1997.
11. *Biotechnical Inter (Cambridge) begins field of genetically engineeral bacteria* // Appl. Genet. News. – 1988. – V. 8, № 10. - P. 12-14.
12. *Monsanto (St Louis Mo) revelles sucessful field test of genetically engineeral microba* // Appl. Genet. News. – 1988. – V. 8, № 8. - P. 12-13.
13. *Hardy R.W.F., Holsten F. D., Jackson E. K. et al.* The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and evaluation // Plant Physiol. – 1968. – V. 42, № 8. – P. 1185-1207.
14. *Rhizobiaceae.* Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями // ред. Герман Спайк, Адам Кондороши, Пауль Лукас. – СПб., 2002. - 568 с.

Надійшла до редакції
14.02.2007 р.

МАНДРОВСЬКА, КРУГОВА, КОЦЬ

**EFFICACY OF SYMBIOSIS BETWEEN PEA PLANTS AND THE TRANSPOSANTS
OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV VICIAE 263Б**

N. M. Mandrovska, O. D. Krugova, S. Ya. Kots

*Institute of Plant Physiology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The Tn5 mutants of active strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263Б obtained by means of transposon mutagenesis had more high levels of symbiotic features with comparison to parenteral strain. It was determined that in the field conditions only the transposant M₁ of pea nodule bacteria increased significant M₁ of pea nodule bacteria increased significantly seed yield of different pea varieties compare with parentiral strains 263Б or industrial strain 245a. The Tn5 mutant M₁ of pea nodule bacteria is high active pea symbiont which are recommended to produce bacterial fertilizers.

Key words: *Pisum sativum* L., transposantes, symbiosis, nitrogen fixation

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОЗА РАСТЕНИЙ ГОРОХА
С ТРАНСПОЗАНТАМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. VICIAE 263Б**

Н. М. Мандровская, Е. Д. Кругова, С. Я. Коць

*Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Методом транспозонового мутагенеза из активного штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263Б получены Tn5 мутанты, которые по симбиотическим показателям превосходят исходный штам. Установлено, что в полевых условиях среди полученных штаммов только транспозант клубеньковых бактерий гороха M₁ достоверно повышал урожай зерна районированных сортов гороха Дамир 2 и Камелот по сравнению с исходным 263Б и производственными 245а штаммами. Tn5 мутант клубеньковых бактерий M₁ является высокоактивным симбионтом гороха, который может быть рекомендован для производства бактериальных удобрений.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., транспозанты, симбиоз, азотфиксация