

УДК 581.557

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ Tn5-МУТАНТОВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГОМОЛОГИЧНЫМ ЛЕКТИНОМ

© 2008 г. Д. М. Сытник, Н. А. Воробей, С. К. Береговенко

Институт физиологии растений и генетики

Национальной академии наук Украины

(Киев, Украина)

В результате проведенных полевых испытаний бактериальных препаратов показано, что у растений сои *Glycine max* (L.) Merr., инокулированных активными Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* 646 (Т66 и Т3-11), на корнях формируются эффективные клубеньки, обладающие высоким уровнем нитрогеназной активности. Установлено, что использование гомологичного лектина в процессе изготовления бактериальных препаратов для инокуляции семян на основе активных штаммов ризобий, в т. ч. Tn5-мутантов, повышает эффективность симбиотической системы сои и ее продуктивность.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merr., Tn5-мутанты *Bradyrhizobium japonicum*, азотфиксация, лектин сои, бактериальные препараты, продуктивность

Наиболее распространенным приемом повышения продуктивности растений и качества их урожая, позволяющим сохранять естественное плодородие почв без ухудшения экологического состояния окружающей среды, является применение биологических препаратов на основе азотфиксирующих микроорганизмов [1]. Использование микробных препаратов позволяет регулировать численность и активность полезной микрофлоры в ризосфере возделываемых культур, а также обеспечивать растения азотом, фиксированным из атмосферы. Необходимо также отметить, что ключевая роль в решении проблемы дефицита полноценного белка принадлежит сое [4], однако в почвах, на которых эта культура выращивается впервые, обычно отсутствуют специфичные для нее клубеньковые бактерии или же их количество незначительно [10].

Создание новых, высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий и подбор комплементарных растений-партнеров – перспективное направление повышения эффективности симбиотической азотфиксации и продук-

тивности бобовых растений [21]. В последние десятилетия для получения новых штаммов ризобий, наряду с аналитической селекцией, широко применяют и генно-инженерные методы [12], в частности, транспозоновый мутагенез [5, 20].

В соответствии с существующими представлениями о механизмах взаимодействия растений с ризобиями полисахариды последних являются фактором, который обеспечивает "узнавание" бактериями соответствующего растения-хозяина путем комплементарного связывания с растительным лектином [8]. Лектины – это белки, обладающие способностью обратимо и избирательно связываться с углеводами и углеводными частями биополимеров без изменения ковалентной структуры последних. Наряду с другими биологически активными веществами, лектины бобовых уже при прорастании семян секретируются во внешнюю среду [17], эти белки стимулируют размножение и активное движение к корням почвенных микроорганизмов, оказывают влияние на рост микросимбионтов и синтез ими экзогликанов [7]. Более того, лектины рассматриваются в качестве одного из факторов эффективного симбиоза, который также предложено учитывать при разработке и внедрении новых подходов к управлению про-

Адрес для корреспонденции: Сытник Денис Михайлович, Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина; Факс: +38 (044) 257-31-08; e-mail: sytnikov@list.ru

дукционным процессом у бобовых растений [8].

Одним из ключевых ферментов азотного метаболизма симбиотической бобово-ризобийной системы является нитрогеназа. Эффективность работы этого фермента в значительной степени обуславливает продуктивность симбиоза. Известно, что обработка ризобий лектином специфичного им растения положительно влияет на их вирулентность и конкурентоспособность [19], а также повышает азотфиксирующую активность корневых клубеньков, что связывают с действием лектина на биосинтез нитрогеназы [3] в бактериальной клетке. Как следствие, предварительная инкубация ризобий с гомологичным лектином усиливает ростовые процессы растения и повышает продуктивность симбиоза [9, 15]. В то же время характер влияния данного белка зависит от его концентрации в бактериальной суспензии [9]. Требующим изучения остается вопрос о целесообразности использования гомологичного лектина при изготовлении бактериальных препаратов на основе новых активных Tn5-мутантов для повышения их эффективности.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании нитрогеназной активности и продуктивности симбиотических систем сои, а также в оценке эффективности применения био-препаратов на основе Tn5-мутантов клубеньковых бактерий при использовании гомологичного лектина.

МЕТОДИКА

В работе использовали растения сои *Glycine max* (L.) Мегг. районированного сорта Марьяна совместной селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины (ИФРГ), Селекционно-генетического института и Института земледелия УААН. Для инокуляции семян использовали биопрепараты на твердом носителе – перлите. Их готовили на основе медленно растущих клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* – производственного штамма-эталона 634б из музейной коллекции азотфиксирующих микроорганизмов ИФРГ, а также штамма 646 и его активных Tn5-мутантов (Т66, Т3-11), полученных в отделе симбиотической азотфиксации ИФРГ к.б.н. С.М. Маличенко. В работе использовали лектин из семян сои (SBA), приобретенный в НПК "Лектинотест" (Львов, Украина).

Для приготовления биопрепарата культуру клубеньковых бактерий выращивали на

маннитно-дрожжевом агаре [16] при 28°C в течение 8 сут. Биомассу клеток смывали физиологическим раствором (0,9% NaCl), переносили в жидкую маннитно-дрожжевую среду [16] и выдерживали при постоянной аэрации и 28°C 4–6 сут до получения титра клеток не менее 1×10^{11} /мл. Суспензию бактерий инкубировали с водными растворами лектина сои в термостате при 28°C в течение 20 ч в соотношении 1 : 1. Конечная концентрация лектина в жидких препаратах с титром клеток 1×10^7 составляла 100 мкг/мл. Затем в бактериальную суспензию (60 мл), проинкубированную с лектином, в качестве питательных добавок дополнительно вносили 5 мл 20%-ного раствора глюкозы, 5 мл 80%-ной патоки и 5 мл 20%-ного кукурузного экстракта (рН 5,0–6,0), а также 20 мл стерильной водопроводной воды. Полученной смесью инокулировали пакеты со стерильным перлитом, после чего препарат ризобий хранили в течение 20-30 сут. Семена сои перед посевом инокулировали смывом с бактериализованного перлита. Контролем служили растения без инокуляции, а также растения, инокулированные бактериальными препаратами без добавления лектина.

Исследования проводили в условиях микрополевого и полевого опытов [6]. Учетная площадь опытных делянок 2 и 5 м² соответственно, расположение – рендомезированное, повторность опытов – четырехкратная. Семена сои высевали из расчета 600 тыс. всхожих семян на гектар. Микролевой опыт (2007 г.) был заложен на опытном участке ИФРГ. Почва опытных делянок серая лесная, супесчаная, рН 5,9–6,0. Содержание гумуса 1,2–1,5%, фосфора 8,8–10,1, калия 9,4–10,2, легкогидролизуемого азота 10,4–12,6 мг/100 г почвы. Полевые опыты (2005, 2006 гг.) для определения зерновой продуктивности проводили на агробиологической станции Уманского государственного педагогического университета имени Павла Тычины (Черкасская область). Почва опытных делянок темно-серая, оподзоленная, рН 5,4–5,7. Содержание гумуса 1,6–2,0%, фосфора 9,3–12,2, калия — 13,1–17,6, легкогидролизуемого азота 12,1–12,7 мг/100 г почвы.

Отбор растений для анализа производили в периоды бутонизации–начала цветения и цветения–начала плодообразования (40 и 53 сут от появления всходов). Эффективность модуляторного действия гомологичного лектина оценивали по азотфиксирующей активности клубеньков, а также по нарастанию вегетативной массы растений и их зерновой продуктивности как интегральным показателям.

Азотфиксирующую (нитрогеназную) активность определяли по уровню ацетиленвосстанавливающей активности корневых клубеньков [18] и выражали в мкмоль этилена, образованного клубеньками одного растения за 1 ч. Газовую смесь анализировали на хроматографе Chromatograf-504 ("Mera Elwro", Польша) с пламенно-ионизационным детектором. Определения проводили в четырехкратной биологической повторности.

Определение содержания хлорофиллов производили по методике Веллбуерна [22]. Хлорофилл экстрагировали диметилсульфоксидом (на 0,1 г растительного материала 10 мл ДМСО) из высечек листьев, после чего измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре "Smart Spec Plus" (Biorad, США) при 665 и 649 нм в кювете толщиной 1 см. Для измерений брали пробы средних долей тройчатых листьев закончивших рост и без видимых признаков старения. Листья отбирали из средних ярусов пяти рендомезированных растений одного варианта.

Полученные результаты обрабатывали статистически [6], в таблицах представлены средние арифметические и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование бактериальных препаратов для инокуляции сои, изготовленных на основе активных Tn5-мутантов клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* 646 – T66 и T3-11, приводило к увеличению количества образовавшихся клубеньков на корнях растений по сравнению с вариантом с инокуляцией производственным (эталонным) штаммом *B. japonicum* 6346 и контролем без инокуляции. Аналогичная тенденция наблюдалась и по по-

казателям массы клубеньков в варианте с инокуляцией Tn5-мутантом T66 (табл. 1). При этом было отмечено наличие клубеньков и на корнях растений в варианте без инокуляции, что свидетельствовало о присутствии в почве опытного участка аборигенной микрофлоры ризобий. На корнях растений, инокулированных Tn5-мутантами (T66 и T3-11), встречались мелкие клубеньки диаметром 1–2 мм. Возможно, их морфологическое отличие было связано с задержкой у мутантных штаммов первичного нодуляционного процесса или же они были образованы почвенными расами ризобий.

Известно, что в клубеньках, инициированных аборигенными ризобиями сои, не всегда активно протекает фиксация молекулярного азота, а их образование может приводить к снижению эффективности используемых бактериальных препаратов [10]. В нашей работе применение биопрепаратов, содержащих гомологичный лектин, оказывало положительное влияние на азотфиксирующую активность клубеньков, образовавшихся при инокуляции производственным штаммом *B. japonicum* 6346 и Tn5-мутантами на фоне спонтанной инокуляции аборигенными расами ризобий (табл. 2). Максимальные значения этого показателя были зафиксированы в варианте с инокуляцией растений препаратом на основе Tn5-мутанта T66, содержащим лектин. При этом наиболее интенсивное накопление вегетативной массы растениями (см. табл. 2) также отмечено в вариантах с использованием биопрепаратов на основе изучаемых Tn5-мутантов.

Полученные данные указывают на целесообразность применения бактериализации семян активными Tn5-мутантами клубеньковых бактерий совместно с гомологичным лектином и подтверждают результаты проводившихся ранее исследований о стимулирующем влиянии гомологичного лектина на показатели эффек-

Таблица 1

Формирование клубеньков на корнях сои, инокулированной биопрепаратами на основе штамма 6346 и Tn5-мутантов *B. japonicum* (40 сут от появления всходов)

Вариант	Клубеньки	
	шт./растение	г/растение
Контроль (без инокуляции)	30,8±3,5	0,37±0,04
Штамм 6346 (эталон)	52,6±4,0	0,57±0,07
Tn5-мутант T66	73,2±7,9	0,85±0,08
Tn5-мутант T3-11	68,0±6,9	0,63±0,07

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОПРЕПАРАТОВ

Таблица 2

Азотфиксирующая активность клубеньков (АФА), содержание хлорофилла *a* и биомасса растений сои, инокулированной биопрепаратами штамма 6346 и Tn5-мутантов *B. japonicum*, модифицированными гомологичным лектином

Вариант	АФА, мкмоль C ₂ H ₄ / (растение·ч) **	Надземная масса, г**	Масса корня, г**	Хлорофилл <i>a</i> ***
Контроль (без инокуляции)	22,9±4,5	7,17±0,60	2,93±0,22	0,87±0,04
Штамм 6346 (эталон)	60,4±3,9	10,09±0,87	3,04±0,26	1,00±0,08
Tn5-мутант Т66	83,0±4,0	13,26±0,61	3,42±0,28	1,05±0,07
Tn5-мутант Т3-11	71,0±4,9	13,60±1,17	3,34±0,42	1,11±0,08
Штамм 6346 + лектин сои	86,1±6,4*	12,99±0,91*	3,16±0,19	1,02±0,03
Tn5-мутант Т66 + лектин сои	97,0±3,0*	19,21±1,32*	4,43±0,22*	1,04±0,05
Tn5-мутант Т3-11 + лектин сои	78,0±6,9	18,12±1,26*	4,01±0,37	1,11±0,06

Примечание: * - Разница достоверна в сравнении с аналогичным вариантом без лектина (по критерию Стьюдента, $P \leq 0,05$);
** - Показатели оценивали через 40 сут от появления всходов;
*** - Показатель оценивали через 53 сут от появления всходов.

тивности симбиоза при использовании для инокуляции биопрепаратов на основе производственного штамма *B. japonicum* 6346 [8, 13, 14].

Во втором отборе образцов в период цветения–начала плодообразования интактные клубеньки растений наиболее эффективного варианта инокуляции (Т66) условно были разделены на две фракции (I – крупные и II – мелкие). Необходимо отметить, что интактные клубеньки I-й фракции отличались от таковых фракции II не только по размеру, но и превосходили последние по показателям удельной азотфиксирующей активности (из расчета на 1 г сырой массы клубенька). Кроме того, на азотфиксирующую активность крупных клубеньков фракции I положительное влияние оказывало применение гомологичного лектина при изготовлении биопрепарата. Не исключено, что клубеньки первой фракции были сформированы активным Tn5-мутантом Т66, в то время как клубеньки II-й фракции – почвенными расами ризобий. Однако, для выяснения этих вопросов в будущем необходимо проведение специальных исследований с реизоляцией и последующей идентификацией клубеньковых бактерий.

Ранее установлено, что содержание хлорофилла в листьях находится в положительной связи с интенсивностью азотфиксации [2] и зависит от симбиотических свойств клубеньковых бактерий [11]. Инокуляция активными

Tn5-мутантами (Т66 и Т3-11) и эталонным штаммом *B. japonicum* 6346 в период цветения–начала плодообразования приводила к увеличению содержания хлорофилла *a* в листьях растений по сравнению с контролем (без инокуляции) (см. табл. 2).

Гомологичный лектин рассматривают не только в качестве рецепторной или сигнальной молекулы на начальных этапах симбиоза, но и как молекулярный сигнал, изменяющий метаболизм ризобий, что может отражаться на их симбиотических свойствах и физиологическом состоянии растения-хозяина. В то же время, в нашем случае использование этого белка при изготовлении биопрепаратов существенно не отразилось на содержании изучаемого пигмента в листьях инокулированных растений (см. табл. 2).

Поскольку продуктивность является интегральным показателем влияния различных факторов на жизнедеятельность растений, в условиях полевых опытов нами была также изучена зерновая продуктивность симбиотических систем сои. Для этого препараты на твердом носителе готовили с использованием эталонного штамма *B. japonicum* 6346, а также наиболее перспективного Tn5-мутанта – Т66. Из табл. 3 следует, что внесение гомологичного лектина в бактериальную суспензию изучаемых ризобий при изготовлении биопрепаратов достоверно

Эффективность применения биопрепаратов, модифицированных гомологичным лектином, на основе штамма-эталона и Tn5-мутанта *V. japonicum*

Штамм	Урожай, ц/га	Прирост урожая в сравнении с контролем (штамм 6346 без лектина)	
		ц/га	%
6346 (эталон)	22,5±0,7	–	–
6346 + лектин	25,8±1,1	3,3	14,7
T66 (Tn5-мутант)	26,1±0,7	3,6	16,0
T66 + лектин	29,0±0,7	6,5	28,9
НСР _{0,05}	2,5		

увеличивало урожай семян сои, при этом наиболее эффективным из используемых оказался биопрепарат с лектином на основе Tn5-мутанта.

Таким образом, при изготовлении бактериальных препаратов возможно использование ризобий, полученных различными методами селекции. Применение гомологичного лектина в процессе изготовления биопрепаратов для инокуляции семян на основе активных штаммов ризобий, в т.ч. Tn5-мутантов, повышает эффективность симбиотической системы сои и ее продуктивность. Полученные данные указывают на перспективность применения бактериальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином, и могут быть использованы для усовершенствования технологии их производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агроекология* / Ред. В.А. Черников, А.И. Черкес. – М.: Колос, 2000. – 536 с.
2. Антупчук А.Ф., Канцелярук Р.М., Рангелова В. Н. и др. Связь между показателями фотоассимиляционной активности бобовых растений и их симбиотической азотфиксацией // *Микробиол. журн.* – 1990. – Т. 52, № 6. – С. 49-53.
3. Антонюк Л.П., Фомина О.Р., Игнатов В.В. Влияние лектина пшеницы на метаболизм *Azospirillum brasilense*: индукция биосинтеза белков // *Микробиология.* – 1997. – Т. 66, № 2. – С. 172-178.
4. Бабич А.О. Сучасне виробництво і використання сої. – К.: Урожай, 1993. – 432 с.
5. Воробей Н.А., Сытников Д.М. Реакция люцерны на инокуляцию клубеньковыми бактериями, полученными методом Tn-5 мутагенеза // *Тр. междунар. научн. конф. „Современные проблемы адаптации и биоразнообразия”* (24–27 октября 2006 г.). – Махачкала, 2006. – С. 77.
6. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
7. Косенко Л.В., Мандровская Н.М. Влияние лектина гороха на рост микросимбионтов гороха и биосинтез ими экзогликанов // *Микробиология.* – 1998. – Т. 67, № 5. – С. 626–630.
8. Коць С.Я., Сытников Д.М. Лектины бобовых растений как фактор эффективного симбиоза // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2007. – Т. 39, № 6. – С. 463-475.
9. Маменко П.М., Маліченко С.М., Даценко В.К., Коць С.Я. Симбіотичні властивості і продуктивність сої залежно від концентрації її лектину в інокуляційній суспензії *Bradyrhizobium japonicum* 6346 // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2003. – Т. 35, № 3. – С. 215-221.
10. Патица В.П., Крутило Д.В., Ковалевська Т.М. Вплив аборигенних популяцій бульбочкових бактерій сої на симбіотичну активність інтродукованого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 6346 // *Мікробіол. журн.* – 2004. – Т. 66, № 3. – С. 14-21.
11. Петерсон Н.В., Черномырдина Т.А., Курьяк Е.К. и др. Накопление хлорофиллов в листьях и урожай люцерны, инокулированной активными штаммами клубеньковых бактерий // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 1990. – Т. 22, № 2. – С. 126-131.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОПРЕПАРАТОВ

12. Ситаров Б.В., Аронитам А.А. Биотехнология симбиотической азотфиксации // С.-х. биология. – 1987. – № 11. – С.104-111.
13. Сытников Д.М., Даценко В.К., Коць С.Я. Эффективность биопрепаратов клубеньковых бактерий сои при использовании гомологичного лектина // 36. мат-лів Першої Міжнар. конф. молодих вчених “Сучасні проблеми екології”, 28 – 30 вересня 2005 р. – Запоріжжя. – С. 131-132.
14. Сытников Д.М., Коць С.Я., Даценко В.К. Эффективность биопрепаратов клубеньковых бактерий сои, модифицированных гомологичным лектином // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 304-310.
15. Сытников Д.М., Коць С.Я., Маличенко С.М. Эффективность симбиотической системы соя – *Bradyrhizobium japonicum* при действии гомологичного лектина в условиях различного обеспечения минеральным азотом // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, № 5. – С. 394-401.
16. Child J.J. Nitrogen fixation by a Rhizobium sp. association with non-leguminous plant cell cultures // Nature. – 1975. – V. 253. – P. 350-351.
17. Fountain D.W., Foard D.E., Replogle W.D., Yang W.K. Lectin release by soybean seeds // Science. – 1977. – V. 197, № 4309. – P. 1185-1187.
18. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: Laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – V. 43, № 8. – P. 1185-1207.
19. Lodeiro A.R., Lopez-Garsia S.L., Vazquez T.E.E., Favelukes G. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – V. 188, № 2. – P. 177-184.
20. Marroqui S., Zorreguieta A., Santamaria C. et al. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183, № 3. – P. 854-864.
21. Rengel Z. Breeding for better symbiosis // Plant and Soil. – 2002. – V. 245, № 1. – P. 147-162.
22. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions // J. Plant Physiol. – 1994. – V. 144, № 3. – P. 307-313.

Поступила в редакцию
19.05.2008 г.

EFFICACY OF BACTERIAL PREPARATIONS BASED ON Tn5-MUTANTS *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* WITH GOMOLOGOUS LECTIN

D. M. Sytnikov, N. A. Vorobey, S. K. Beregoenko

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

As was shown in field experiments the inoculation of soybean plants *Glycine max* (L.) Merr. with active Tn5-mutants *Bradyrhizobium japonicum* 646 (T66 and T3-11) results in formation of effective nodules with high level of nitrogen fixing activity on roots. It was revealed that addition of homologous lectin to the formulation of bacterial preparations used for seed inoculation based on the active strains and Tn5-mutants of rhizobia enhances soybean symbiotic system efficacy and productivity.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., Tn5-mutants *Bradyrhizobium japonicum*, nitrogen fixation, soybean lectin, bacterial preparations, productivity

СЫТНИКОВ, ВОРОБЕЙ, БЕРЕГОВЕНКО

**ЕФЕКТИВНІСТЬ БІОПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ Tn5-МУТАНТІВ
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM, МОДИФІКОВАНИХ
ГОМОЛОГІЧНИМ ЛЕКТИНОМ**

Д. М. Ситніков, Н. А. Воробей, С. К. Береговенко

*Інститут фізіології рослин і генетики
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

У результаті проведених польових випробувань бактеріальних препаратів показано, що у рослин сої *Glycine max* (L.) Merr., інокульованих активними Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* 646 (T66 и T3-11), на корнях формуються ефективні бульбочки з високим рівнем нітрогеназної активності. Встановлено, що застосування гомологічного лектину в процесі виготовлення бактеріальних препаратів для інокуляції насіння на основі активних штамів ризобій, в т. ч. Tn5-мутантів, підвищує ефективність симбіотичної системи сої і її продуктивність.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., Tn5-мутанти *Bradyrhizobium japonicum*, азотфіксація, лектин сої, бактеріальні препарати, продуктивність