

**НОДУЛЯЦІЙНА КОНКУРЕНТНА ЗДАТНІСТЬ
Tn5–МУТАНТІВ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*
BV. *VICIAE***

Кругова О.Д., Мандровська Н.М.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська, 31/17, м. Київ, 03022, Україна

*Досліджували нодуляційну конкурентну здатність Tn5–мутантів бульбочкових бактерій гороху, одержаних на основі *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263 б, які за азотфіксувальною активністю, кількістю кореневих бульбочок, впливом на наростання маси рослин перевищували вихідний штам. Показано, що мутанти M_1 та M_{68} є конкурентоздатними на рівні вихідного 263 б і промислового 245 а штамів.*

Ключові слова: *бульбочкові бактерії, горох, симбіоз, азотфіксація, конкурентна здатність*

Бобові рослини в умовах симбіозу з бульбочковими бактеріями характеризуються високою продуктивністю та активним синтезом рослинного білка без застосування енергоємних і екологічно небезпечних мінеральних азотних добрив. У загальній структурі посівів науково обґрунтована частка бобових культур складає від 20 до 40 %. При цьому однорічні зернобобові рослини залишають у ґрунті близько 20 % фіксованого з повітря азоту, що сприяє суттєвому підвищенню врожайності наступних культур сівозміни протягом 2–3 років [1].

Інокуляція насіння активними селекційними штамми ризобій підвищує азотфіксувальну функцію симбіозів на 15–50 %. Але ефективність інокуляції бобових культур залежить як від азотфіксувальної активності штамів бульбочкових бактерій, так і від їх спроможності конкурувати з бактеріями цього ж виду при утворенні бульбочок на коренях рослини – господаря. У поняття конкурентоздатності ризобій вкладається також їх здатність протистояти місцевій сапрофітній мікрофлорі. Не виключається також, що конкурентоздатність визначається і кращою спроможністю бульбочкових бактерій приживатися у даному конкретному ґрунті. Конкурентна здатність аборигенних бульбочкових бактерій у різних ґрунтах неоднакова. Внаслідок цього, один і той же штам,

який використовується для інокуляції, в одних ґрунтах отримує перевагу над спонтанними расами при утворенні бульбочок, а в інших – пригнічується більш агресивними місцевими бактеріями і інокуляція виявляється неефективною [2].

У ризобій розрізняють кілька типів конкурентоздатності, зокрема, нодуляційну, ризосферну та сапрофітну [3, 4, 5]. Відповідно, у бульбочкових бактерій є різні генні системи, які визначають виживання цих мікроорганізмів у екологічних нішах *in planta* і *ex planta*, що здійснюється завдяки незалежному варіюванню різних типів конкурентоздатності. У той же час відомо, що активніше розмноження бактерій відбувається при взаємодії з рослинами, які мають значення у конкуренції за колонізацію ризосфери і коріння. Тому у мікробно-рослинних екосистемах гени нодуляційної здатності відіграють основну роль у визначенні адаптивного потенціалу ризобіальних штамів. Однак ризобії довгий час можуть існувати у ґрунті за відсутності рослини-господаря, і тоді їх виживання повністю визначається генами, які контролюють сапрофітну конкурентну здатність. Для швидкорослих бульбочкових бактерій встановлено [6], що гени нодуляційної конкурентоздатності локалізовані як у хромосомі, так і на різних типах плазмід (симбіотичних і несимбіотичних).

Для визначення конкурентоздатності бульбочкових бактерій розроблені прямі і непрямі методи. Серед прямих методів розрізняють серологічний і резистентний [7, 8], кожен з яких має певні обмеження. Непрямі методи оцінки нодуляційної конкурентної здатності бульбочкових бактерій запропонували Лагашері зі співавт. [9, 10], які виявили, що за змішаної інокуляції бобових активним і неактивним штамми накопичення вегетативної маси у рослин знаходиться у прямій залежності від кількості бульбочок, утворених тим чи іншим штамом.

Очевидно, що найбільш конкурентоздатні штамми мають більше шансів зберегтися в екосистемі й пережити дію несприятливих факторів саме у бульбочках бобових рослин. Тому дуже важливим є питання про те, яким рівнем нодуляційної конкурентної здатності повинні володіти генно-інженерні штамми, щоб вони були генетично і екологічно безпечними.

Метою наших досліджень було визначення нодуляційної конкурентної здатності генетично-модифікованих штамів бульбочкових бактерій гороху, отриманих методом транспозонового

мутагенезу і відібраних за ознакою “підвищена ефективність симбіозу” з рослинами специфічного їм виду.

Матеріали й методи. Для одержання мутантів бульбочкових бактерій гороху активний штам *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263 б [11] із колекції відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології і генетики НАН України модифікували, використовуючи штам *E. coli* S17-1, що несе вектор pSUP2021, куди вбудований транспозон Tn5 [12]. У результаті проведеної роботи були отримані стійкі до канаміцину мутанти із зміненими симбіотичними властивостями.

Первинний відбір транспозантів за ознакою “підвищена ефективність симбіозу” проводили в умовах напівстерильних мікровегетаційних дослідів. Рослини вирощували на стерильному річковому піску з додаванням поживної суміші за Гельригелем. Мінеральний азот (сіль $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) вносили у посудини місткістю 0,5 кг у дозі 0,25 норми. Стерилізоване насіння гороху сорту Менгір інокулювали отриманими транспозантами. У контрольному варіанті насіння інокулювали бульбочковими бактеріями вихідного штаму 263 б.

На 30-й день після появи сходів визначали приріст надземної маси рослин та кількість утворених на коренях бульбочок. Відміте коріння вносили у герметичні флакони і, після експозиції протягом 1 год. із ацетиленом (10 % від об’єму), проводили визначення нітрогеназної активності бульбочок [13]. Нодуляційну конкурентоздатність відібраних транспозантів визначали непрямим методом [9]. Цей метод базується на здатності штамів ризобій впливати на накопичення маси рослин при змішаній інокуляції активним та неактивним, але висококонкурентним, штамми. Вегетаційний дослід проводили на стерильному піску у посудинах місткістю 2 кг з внесенням норми поживної суміші та 0,25 норми азоту за Гельригелем. Насіння гороху сорту Дамір 2 стерилізували 70 % етанолом і відмивали від спирту стерильною водою.

В досліді вивчали два активні штамми бульбочкових бактерій гороху – 245 а (виробничий) і 263 б (вихідний), а також 2 транспозанти – M_1 та M_{68} , які за симбіотичними показниками перевищували активність виробничого і вихідного штамів. Перед посівом проростки інокулювали кожним штамом окремо (моноінокуляція) або сумішшю двох штамів (змішана інокуляція).

Для створення модельної конкуренції між штамми

проводили змішану інокуляцію двома штамми – активним (штам⁺) і неактивним (штам⁻). Як неактивний штам для інокуляції насіння обрали висококонкурентний штам 248 б, який утворює неактивні бульбочки на різних сортах гороху. Для отримання інокуляту бактеріальні культури вирощували на бобовому відварі протягом 3 діб при температурі 28 °С. Для створення модельної конкуренції у випадку моноінокуляції суспензія бактерій містила 10^7 клітин у 1 мл, а при змішаній інокуляції кількість бактерій активного штаму залишали такою ж, тоді як неактивного штаму брали 10^{10} клітин/мл, тобто створювали співвідношення штамів 1:1000. У контрольному варіанті насіння гороху не інокулювали.

Визначення конкурентоздатності транспозантів проводили за показниками сухої надземної маси рослин за моно- та змішаної інокуляції. Крім того, досліджували нітрогеназну активність утворених за такої інокуляції бульбочок, їх кількість, морфологію і характер розташування на коренях.

Результати та їх обговорення. Тривалий час одним із основних способів підвищення інтенсивності симбіотичної азотфіксації була аналітична селекція активних штамів ризобій з природних популяцій. Сьогодні, завдяки бурхливому розвитку методів молекулярної генетики, з'явилася реальна можливість направлено конструювання високоефективних штамів бульбочкових бактерій. Найбільший науковий інтерес і практичну значимість має виявлення і вивчення генетичних детермінант, що контролюють кількісні симбіотичні ознаки бульбочкових бактерій – ефективність і нодуляційну конкурентну здатність [14].

Як видно із даних табл. 1, транспозанти ризобій гороху утворювали різну кількість бульбочок порівняно із вихідним активним штамом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263 б. Це свідчить про те, що досліджувані Tn5-мутанти відрізнялися за вірулентністю. Так, в умовах напівстерильного досліду транспозанти M₁, M₆₈, M₈₄ утворювали найбільшу кількість бульбочок на коренях рослин гороху, тоді як за рівнем азотфіксувальної активності лише мутанти M₆₈ і M₁ перевищували контрольний варіант на 37 і 67 %, відповідно. Мутант M₈₄, який утворив найбільшу кількість бульбочок на рослинах гороху, за азотфіксувальною активністю значно (майже у 4 рази) поступався вихідному штаму.

Разом із кількістю утворених бульбочок та їх азотфіксувальною активністю, ефективність симбіозу рослин з ризобіями

оцінюються також за показником наростання біомаси інокульованих рослин. Проведені нами дослідження показали, що у рослин, бактеризованих Tn5-мутантами, відбувалося збільшення маси надземної частини та коренів (табл. 1). Так, на 30-й день після появи сходів (фаза 7–8 листків) у варіантах з інокуляцією транспозантами M_{56} і M_1 надземна маса рослин була на 38–45 % більшою за контроль. Інокуляція транспозантами сприяла росту коріння гороху, що відбувалося, можливо, під їх впливом на процеси ризогенезу. Найбільший приріст маси коріння спостерігали за інокуляції мутантами M_{68} і M_1 .

Таблиця 1. Симбіотичні властивості транспозантів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263 б

| Варіанти дослідів | Кількість бульбочок, од./рослину | Азотфіксувальна активність | | Суха надземна маса, г/рослину | Суха маса коріння, г/рослину |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | мкмоль C_2H_4 на рослину за годину | % до контролю | | |
| Контроль | 14,0 ± 1,0 | 2,48 ± 0,11 | 100 | 0,71 ± 0,03 | 0,21 ± 0,01 |
| Транспозанти | | | | | |
| M_1 | 18,0 ± 1,5 | 4,15 ± 0,14 | + 67 | 0,98 ± 0,02 | 0,53 ± 0,02 |
| M_{68} | 12,0 ± 1,0 | 3,41 ± 0,12 | +37 | 0,72 ± 0,03 | 0,53 ± 0,02 |
| M_{56} | 12,0 ± 1,0 | 3,09 ± 0,10 | +24 | 1,03 ± 0,02 | 0,48 ± 0,04 |
| M_{93} | 10,0 ± 0,8 | 1,66 ± 0,08 | - 66 | 0,92 ± 0,04 | 0,45 ± 0,03 |
| M_{84} | 25,0 ± 2,1 | 0,57 ± 0,47 | - 23 | 0,85 ± 0,03 | 0,46 ± 0,01 |

Таким чином, за оцінкою ефективності отриманих Tn5-мутантів ризобій гороху були відібрані штами (M_1 , M_{56} , M_{68}), які мали покращені симбіотичні показники порівняно із вихідним штамом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263 б.

На жаль, штами, які володіють високою нітрогеназною активністю і ефективністю, у польових умовах часто не мають позитивного впливу на врожайність інокульованих рослин у зв'язку з тим, що вони не можуть конкурувати за утворення бульбочок з малоефективними, але вірулентними штамми [2]. Тому очевидно, що найбільш конкурентоздатні штами мають більше шансів зберегтися в екосистемі.

У зв'язку з цим, наступним етапом нашої роботи стало дослідження конкурентоздатності нових штамів бульбочкових бактерій гороху, отриманих за допомогою мутагенезу – M_1 та M_{18} у вегетаційному досліді за порівняння окремих характеристик симбіотичного апарату та маси сухих рослин при моно- та змішаній інокуляції активними (245 а та 263 б) і неактивним (248 б) штамми. Результати дослідження представлені у табл. 2 і 3.

Спостереження за формуванням симбіотичного апарату за моноінокуляції різними штамми (табл. 2) показали, що рослини, вирощені із насіння, обробленого штамом 248 б, утворили багато дрібних білих бульбочок, розташованих на всій кореневій системі. Нітрогеназна активність таких бульбочок була низькою і становила 0,29 мкмоль етилену на рослину за годину (табл. 3). У той же час, за обробки активними штамми 245 а та 263 б ця величина становила відповідно 3,38 та 3,25 мкмоль. На рослинах, інокульованих транспозантами M_1 і M_{68} , утворилося багато великих рожевих бульбочок, розташованих на всій кореневій системі (у M_1) і переважно на бокових коренях (у M_{68}). Азотфіксувальна активність бульбочок, утворених транспозантом M_1 , майже у 2 рази перевищувала цей показник у вихідного штаму 263 б.

За змішаної інокуляції спостерігали чітко виражене зменшення кількості бульбочок, особливо великих. Тобто неактивний, висококонкурентоздатний штам 248 б проявляв інгібуючий вплив на процес утворення бульбочок іншим штамом. На коренях рослин, інокульованих сумішшю штамів (варіанти 7, 8, 9) знаходили поодинокі великі рожеві бульбочки, а основну масу складали дрібні білі бульбочки, які розповсюджувалися на всій кореневій системі. Суттєве (у 2 рази) зниження азотфіксувальної активності у варіанті з інокуляцією штамми 245 а та 248 б свідчить про те, що формування бульбочок відбувалося переважно за рахунок неактивного штаму. У варіанті 8 (інокуляція активним 263 б та неактивним 248 б штамми) утворення бульбочок відбувалося під впливом як активного, так і неактивного штамів. Підтвердженням цього є показник азотфіксувальної активності, який у цьому варіанті був меншим на 23 % від його значення за моноінокуляції лише активним штамом 263 б. Таке ж зниження (на 24 %) азотфіксувальної активності корневих бульбочок відзначене для штамів M_1 та 248 б (варіант 9).

Таблиця 2. Формування симбіотичного апарату за інокуляції гороху бульбочковими бактеріями

| № варіанту досліджу | Штами | Морфологія і розташування бульбочок | Кількість бульбочок (одиниць) | | |
|---------------------|---------------------------|---|-------------------------------|---------------------|-------------------|
| | | | сумарна | на головному корені | на бічних коренях |
| 1 | Контроль – без інокуляції | | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 245 а | великі, рожеві на всій кореневій системі | 54 ± 3 | 6 | 48 |
| 3 | 263 б | гроноподібні скупчення бульбочок, рожеві | 65±2 | 10 | 55 |
| 4 | 248 б | багато дрібних білих на всій кореневій системі | 99 ± 5 | 26 | 73 |
| 5 | M ₁ | багато великих, рожевих на всій кореневій системі | 84 ± 5 | 31 | 53 |
| 6 | M ₆₈ | поодинокі великі рожеві | 67 ± 2 | 17 | 50 |
| 7 | 245 а + 248 б | поодинокі великі рожеві та дрібні білі | 105 ± 7 | 21 | 84 |
| 8 | 263 б + 248 б | поодинокі гроноподібні та дрібні біло-зелені | 113 ± 6 | 39 | 74 |
| 9 | M ₁ + 248 б | поодинокі, великі та дрібні, білі | 133 ± 5 | 32 | 101 |
| 10 | M ₆₈ + 248 б | всюди багато дрібних білих, а на головному корені великі рожеві | 118 ± 6 | 27 | 91 |

Таким чином, у присутності одного і того ж неактивного штаму активні штами бактерій брали участь у формуванні різної кількості бульбочок із різною азотфіксувальною активністю, що створювало неоднакові умови живлення рослин і супроводжувалося накопиченням ними різної кількості біомаси (табл. 3). Отже, маса сухих рослин за змішаної інокуляції активним і неактивним шта-

мами відображає рівень їх відносної конкурентної здатності. Цю залежність можна виразити формулою, запропонованою Лагашері зі співавт. [9]:

$$KЗ_{\text{відн.}} (\%) = \frac{\text{прибавка урожаю (шт+ + шт-)}}{\text{прибавка урожаю - шт+}} \cdot 100$$

де $KЗ_{\text{відн.}}$ – відносна конкурентна здатність.

Таблиця 3. Відносна конкурентоздатність при моноінокуляції та змішаній інокуляції гороху активними і неактивними штамами та транспозантами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

| Варіант досліду | Штами | Маса сухих рослин, г на посудину | Приріст маси сухих рослин від інокуляції, г на посудину | | Конкурентоздатність, % | Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_4 на рослину за год. |
|-----------------|---------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------------|------------------------|--|
| | | | шт ⁺ | шт ⁺ + шт ⁻ | | |
| 1 | Контроль – без інокуляції | 2,03 ± 0,21 | | | | |
| 2 | 245 а | 4,51 ± 0,32 | 2,48 | | 69 | 3,38 ± 0,17 |
| 3 | 263 б | 4,54 ± 0,30 | 2,50 | | 70 | 3,25 ± 0,21 |
| 4 | 248 б | 2,57 ± 0,17 | 0,54 | | | 0,29 ± 0,02 |
| 5 | M ₁ | 5,36 ± 0,43 | 3,33 | | 72 | 5,76 ± 0,43 |
| 6 | M ₆₈ | 4,38 ± 0,31 | 2,35 | | 68 | 3,15 ± 0,17 |
| 7 | 245 а + 248 б | 3,74 ± 0,28 | | 1,71 | | 1,51 ± 0,09 |
| 8 | 263 б + 248 б | 3,78 ± 0,23 | | 1,75 | | 2,56 ± 0,20 |
| 9 | M ₁ + 248 | 4,39 ± 0,37 | | 2,36 | | 4,56 ± 0,20 |
| 10 | M ₆₈ + 248 б | 3,64 ± 0,29 | | 1,61 | | 2,19 ± 0,17 |

За даними літератури [9, 15], штами бульбочкових бактерій за рівнем відносної конкурентної здатності можна умовно розділити на 4 групи:

1. неконкурентоздатні (рівень конкурентної здатності нижче 20 %);
2. слабоконкурентоздатні (рівень конкурентної здатності до 40 %);
3. середньоконкурентоздатні (рівень конкурентоздатності до 70 %);
4. висококонкурентоздатні (рівень конкурентної здатності більше 70 %).

Результати проведених нами досліджень і розрахунки, зроблені за вищенаведеною формулою, дозволяють дійти висновку, що транспозанти M_1 і M_{68} можна віднести до середньоконкурентоздатних. Показник $KZ_{\text{відн.}}$ у штаму M_1 – 72 %, а у штаму M_{68} – 68 %. Для вихідного штаму 263 б конкурентна здатність становить 70 %. Штам 245 а за нашими даними має показник $KZ_{\text{відн.}}$ на рівні 69 %. Отримані дані дозволяють зробити висновок, що транспозанти гороху є конкурентоздатними на рівні вихідного штаму *R. leguminosarum* *bv. viciae* 263 б.

У зв'язку з дослідженням конкурентної здатності у генетично-модифікованих штамів бульбочкових бактерій постає питання [3]: до якого рівня слід підвищувати нодуляційну конкурентну здатність, і чи не станеться так, що ці мутанти закріпляться у даній екосистемі таким чином, що у подальшому їх заміна на інші, менш ефективні, але безпечніші штами стане неможливою. Вирішення цих питань потребує подальших доісліджень різних типів конкурентної здатності мутантних штамів як у стерильних умовах, так і в агроекосистемах.

1. Тихонович И.А., Проворов Н.Л. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. – С.-Пб.: Наука, 1998. – 194 с.

2. Доросинский Л.М. Конкурентная способность бактерий // Биологический азот в сельском хозяйстве СССР. – М.: Наука, 1989. – С. 27–34.

3. Онищук О.П., Симаров Б.В. Гены, контролирующие конкурентоспособность клубеньковых бактерий // Генетика. – 1996. – Т. 32, № 9. – С. 1157–1166.

4. Онищук О.П., Курчак О.Н., Шарыпова Л.А. и др. Анализ

различных типов конкурентоспособности у Tn5-мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) //Генетика. – 2001. – Т. 37, № 11. – С. 1507–1513.

5. Triplett E.W. Isolation of genes improved in nodulation competitiveness from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T 24 //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – Vol. 85, № 1. – P. 1–5.

6. Beattie G.A., Handelsman J.O. Evaluation of a strategy for identifying nodulation competitiveness genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* //J. Gen. Microbiol. – 1993. – Vol. 139. – P. 529–538.

7. Triplett E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* //Mol. Plant-microbe Interact. – 1990. – Vol. 3, № 4. – P.199–206.

8. Triplett E.W., Sadowsky M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes //Annu. Rev. Microbiol. – 1992. – Vol. 46. – P. 399–428.

9. Lagacheirie B., Hugot R., Amerger N.J. Selection of *Rhizobium japonicum* strains on their competitiveness for infection //Ann. Agronom. – 1977. – Vol. 28, № 4.– P. 379–389.

10. Amerger N.J. Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation //Soil. Biol. Biochem. – 1981. – Vol. 13, № 6. – P. 481–486.

11. Пат. 21012 А Україна, МКИ 6 C05AF 11/08 C 12R 1/4 Штам бактерій *Rhizobium leguminosarum* для одержання бактеріального добрива під горох /Ю.П. Старченков, Н.М. Мандровська, Н.М. Нічик та ін. – Опубл. 27.02.98, Бюл. № 1.

12. Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram – negative bacteria //Biotechnology – 1983. – Vol. 1, № 11. – P. 784–791.

13. 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. – Vol. 42, № 8 – P. 1185–1207.

14. Проворов Н.А., Симаров Б.В. Направления конструирования штаммов клубеньковых бактерий с повышенной симбиотической эффективностью //Молекулярные механизмы генетических процессов. – М: Наука, 1991. – С. 190–194.

15. Берестецкий О.А., Новикова А.Г, Князева В.П. Простой метод оценки конкурентной способности клубеньковых бактерий // Микробиология. – 1983. – Т. 52, № 4 – С. 651–656.

**НОДУЛЯЦИОННАЯ КОНКУРЕНТНАЯ
СПОСОБНОСТЬ TN5-МУТАНТОВ
RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICIAE**

Кругова Е.Д., Мандровская Н.М.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

Исследовали нодуляционную конкурентную способность Tn5 – мутантов клубеньковых бактерий гороха, полученных на основе Rhizobium leguminosarum bv. viciae 263 б, которые по азотфиксирующей активности, количеству корневых клубеньков, влиянию на накопление массы растений превышали исходный штамм. Показано, что мутанты M_1 и M_{68} являются конкурентоспособными на уровне исходного 263 б и промышленного 245 а штаммов.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, горох, симбиоз, азотфиксация, конкурентная способность.

**THE NODULATION COMPETITIVENESS
OF TN5-MUTANTS RHIZOBIUM
LEGUMINOSARUM BV. VICIAE**

Krugova O.D., Mandrovskaya N.M.

Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine, Kyiv

There has been studied the nodulation competitiveness of Tn5 mutants of pea rhizobia which were obtained from Rhizobium leguminosarum bv. viciae 263 б and which had high nitrogen fixing activity and promoted the increase of both nodule number and aboveground biomass in comparison with wild strains. It was shown that the competition ability of M_1 and M_{68} mutants did not differ from the competitive ability of strains 263 б and Rhizobium leguminosarum bv. viciae 245 а of industrial strains.

Key word: nodule bacteria, pea, symbiosis, nitrogen fixation, competition ability.