

УДК 581.557

АЗОТФІКСУВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ І РІСТ ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНІВ ЛЮЦЕРНИ ЗА СУМІСНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ АКТИВНИМ І НЕАКТИВНИМ ШТАМАМИ *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

Н.А. ВОРОБЕЙ, С.Я. КОЦЬ

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

В умовах вегетаційних дослідів показано, що сумісна інокуляція люцерни активним і неактивним штамми *Sinorhizobium meliloti* збільшує загальну кількість бульбочок, але знижує рівень азотфіксувальної активності рослин порівняно з варіантом моноінокуляції активним штамом. Встановлено, що утворення на люцерні неактивних бульбочок за інокуляції штамом СХМ1-48 *S. meliloti* та сумісної інокуляції (активний і неактивний штами) призводить до сповільнення росту надземної маси і стимулювання росту кореневої системи. Конкурентоспроможність нових Тп5-мутантів I-2 і T17 становить відповідно 70 і 80 % і зумовлює ефективність їх симбіозу з люцерною.

Ключові слова: *Sinorhizobium meliloti*, Тп5-мутанти, симбіоз, люцерна, конкурентоспроможність, азотфіксація.

Передпосівна бактеризація насіння бобових культур високоефективними штамми *Rhizobium* забезпечує значне підвищення їх урожайності внаслідок здатності ризобій зв'язувати атмосферний азот і перетворювати його на азотовмісні сполуки, які використовує рослина [11]. Разом із аналітичною селекцією успішним є створення штамів бульбочкових бактерій із високою азотфіксувальною активністю генетичними методами [2, 18], проте нерідко ефективність інокуляції бобових рослин мутантними штамми *Rhizobium*, визначена в умовах вегетаційних дослідів, нівелюється (не підтверджується) при випробуванні їх як штамів-інокулянтів у польових умовах. Деякі автори пояснюють це низькою конкурентоспроможністю нових селекціонованих штамів [6, 10, 12], оскільки на симбіотичну активність інтродукованих ризобій істотно впливають аборигенні популяції бульбочкових бактерій [7, 10, 12, 17]. Останнім часом у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України отримано Тп5-мутанти бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti* і досліджено їх симбіотичні властивості. Відомо, що інсерція транспозону в генетичний апарат бульбочкових бактерій люцерни може призводити до зниження, зокрема, нодуляційної конкурентоспроможності Тп5-мутантів *S. meliloti* [4, 9], що є інтегрованим результатом багатьох властивостей ризобій. Раніше встановили, що отримані Тп5-мутанти *S. meliloti* I-2, T17 вступають в ефективний симбіоз із люцерною (*Medicago sativa* L.) [2, 5]. Проте відомо, що конкурентоспроможність бульбочкових бактерій часто не корелює з їх ефективністю [13] і нерідко пов'язана із сортовими властивостями бобових

[1]. Нашим завданням у цій роботі було виявлення особливостей розвитку люцерни і симбіотичної азотфіксації за сумісної інокуляції її активним і неактивним штамми, визначення конкурентоспроможності перспективних за господарсько-корисними властивостями Tn5-мутантів *S. meliloti*.

Методика

Досліди проводили із люцерною сорту Ярославна. Перед посівом насіння поверхнево стерилізували концентрованою сірчаною кислотою протягом 5 хв, промивали водою й інокулювали суспензіями активних штамів бульбочкових бактерій *S. meliloti*: виробничим — 425а, Tn5-мутантами I-2 і T17 та сумішами, виготовленими на основі активного й неактивного штамів. Як неактивний висококонкурентний штам-тестор взято штам СХМ1-48 *S. meliloti*. Титр активних штамів бульбочкових бактерій люцерни дорівнював 10^6 , неактивного — 10^8 клітин у 1 мл у варіантах з бінарною інокуляцією. У варіантах з моноінокуляцією титр клітин становив 10^6 для всіх штамів. *S. meliloti* 425а вирощували на середовищі 79 [14], Tn5-мутанти — на 79 + канаміцин (200 мг/л). Штами взяті з колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Люцерну вирощували в умовах вегетаційного дослідження у пластикових посудинах (на 3,5 кг субстрату) по 8 рослин у кожній на стерильному річковому піску, збагаченому сумішшю Гельрігеля із 0,2 норми азоту у формі $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Повторність дослідження семиразова. Протягом вегетаційного періоду проведено два відбори рослин у фази стеблуння і бутонізації—початку цвітіння. Вивчали динаміку наростання надземної маси і кореневої системи рослин, формування бульбочок та інтенсивність азотфіксації люцерни. Азотфіксувальну активність визначали ацетиленовим методом [16]. Конкурентоспроможність Tn5-мутантів *S. meliloti* визначали непрямим методом, який використовується тільки для ефективних штамів ризобій і передбачає розрахунок за урожаєм надземної маси рослин із застосуванням формули Амаргер [15]. Ефективність інокуляції люцерни бульбочковими бактеріями оцінювали за урожаєм зеленої маси та масою абсолютно сухої речовини рослин. Отримані результати статистично оброблені за методикою Доспехова [3] з використанням програми Excel.

Результати та обговорення

У результаті досліджень з'ясовано, що під впливом інокуляції неактивним штамом СХМ1-48 рослина люцерни в умовах вегетаційного дослідження формувала понад 100 дрібних бульбочок на всій кореневій системі (табл. 1), загальна азотфіксувальна активність яких дорівнювала 0,02 і 0,07 мкмоль C_2H_4 на рослину за 1 год відповідно у фази стеблуння і бутонізації—початку цвітіння (табл. 2). Кількість бульбочок на коренях люцерни, інокульованої Tn5-мутантами *S. meliloti* I-2 і T17 (моноінокуляція), коливалась у межах 20,5—45,0 шт./рослину залежно від фази розвитку рослин (див. табл. 1). Інокуляція насіння водною суспензією активного і неактивного штамів *S. meliloti* у співвідношенні 1 : 100 (за кількістю клітин) приводила до збільшення загального числа корневих бульбочок порівняно з моноінокуляцією активним штамом. Проте част-

ТАБЛИЦЯ 1. Кількість бульбочок на коренях люцерни сорту Ярославна, інокульованої моно- та бінарними суспензіями, виготовленими на основі активного й неактивного штамів бульбочкових бактерій *S. meliloti* (вегетаційний дослід)

Інокулянт	Кількість бульбочок, шт/рослину, у фазу розвитку	
	Стеблування	Бутонізація—початок цвітіння
Контроль (без інокуляції)	0	0
СХМ1-48	100,8 ± 6,9	127,0 ± 2,5
425a	28,4 ± 1,9	55,0 ± 6,0
425a + СХМ1-48	40,4 ± 4,1	62,0 ± 7,5
Tn5-мутант I-2	20,5 ± 2,0	45,0 ± 3,0
I-2 + СХМ1-48	32,0 ± 4,4	62,0 ± 6,0
Tn5-мутант T17	27,0 ± 1,7	39,5 ± 2,0
T17 + СХМ1-48	35,1 ± 3,5	45,0 ± 4,0

ТАБЛИЦЯ 2. Азотфіксувальна активність люцерни сорту Ярославна, інокульованої моно- та бінарними суспензіями, створеними на основі активного й неактивного штамів бульбочкових бактерій *S. meliloti* (вегетаційний дослід)

Інокулянт	Ацетиленвідновлювальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /(рослина · год), у фазу розвитку	
	Стеблування	Бутонізація—початок цвітіння
Контроль (без інокуляції)	0	0
СХМ1-48	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,00
425a	1,30 ± 0,40	3,63 ± 0,71
425a + СХМ1-48	0,94 ± 0,03	2,99 ± 0,33
Tn5-мутант I-2	2,97 ± 0,24	4,72 ± 0,94
I-2 + СХМ1-48	1,15 ± 0,02	4,10 ± 0,38
Tn5-мутант T17	2,50 ± 0,16	5,81 ± 0,75
T17 + СХМ1-48	1,64 ± 0,02	5,37 ± 0,38

ка бульбочок із рожевим забарвленням і сформованих у вигляді грон мала тенденцію до зменшення. Так, за умов бінарної інокуляції (активний штам + неактивний штам СХМ1-48) люцерни загальна кількість бульбочок у фазу стеблування, зроста порівняно з моноінокуляцією штамом 425a в 1,4 раза, Tn5-мутантом I-2 — в 1,6 і Tn5-мутантом T17 — в 1,3 раза (див. табл. 1). Із віком рослин співвідношення між кількістю бульбочок у люцерни за моно- й бінарної інокуляції практично не змінилось.

В умовах вегетаційного дослідження інтенсивність фіксації азоту люцерною у симбіозі із транспозоновими мутантами I-2 і T17 *S. meliloti* перевищувала активність бульбочок, сформованих за участю штаму *S. meliloti* 425a відповідно у 2,3 і 2,0 раза у фазу стеблування та у 2,6 і 3,2 раза у фазу бутонізації—початку цвітіння люцерни (табл. 2).

Зниження азотфіксувальної активності люцерни, інокульованої бінарними суспензіями 425a + СХМ1-48, I-2 + СХМ1-48 і T17 + СХМ1-48 у фазу стеблування рослин опосередковано засвідчує формування симбіотичної системи за участю як активного, так і неактивного штаму ризобій. У процесі вегетації люцерни відмінність між варіантами із моно- та бінарною інокуляцією за показником азотфіксувальної активності змен-

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ

ТАБЛИЦЯ 3. Маса сирової речовини надземної частини та коренів рослин люцерни сорту Ярославна, інокульованих моно- та бінарними суспензіями, виготовленими на основі активного й неактивного штамів бульбочкових бактерій *S. meliloti* (вегетаційний дослід)

Інокулянт	Надземна частина, г		Корені, г	
	Фаза розвитку рослин			
	Стеблуння	Бутонізація—початок цвітіння	Стеблуння	Бутонізація—початок цвітіння
Контроль (без інокуляції)	0,44 ± 0,3	0,77 ± 0,06	0,50 ± 0,04	0,85 ± 0,08
СХМ1-48	0,48 ± 0,02	0,72 ± 0,06	0,75 ± 0,07	1,09 ± 0,09
425a	0,51 ± 0,02	1,22 ± 0,10	0,80 ± 0,03	1,45 ± 0,15
425a + СХМ1-48	0,50 ± 0,03	1,14 ± 0,01	0,81 ± 0,04	1,90 ± 0,12
Tn5-мутант I-2	0,65 ± 0,06	1,24 ± 0,07	0,83 ± 0,05	1,51 ± 0,16
I-2 + СХМ1-48	0,53 ± 0,03	1,02 ± 0,07	0,88 ± 0,06	1,76 ± 0,19
Tn5-мутант T17	0,68 ± 0,04	1,29 ± 0,10	1,08 ± 0,05	1,72 ± 0,07
T17 + СХМ1-48	0,60 ± 0,05	1,26 ± 0,08	1,08 ± 0,11	2,72 ± 0,10

шувалась. Зокрема, у фазу бутонізації—цвітіння зниження симбіотичної азотфіксації кореневих бульбочок люцерни внаслідок сумісної інокуляції було найменшим, якщо активним штамом-інокулянтом слугував Tn5-мутант *S. meliloti* T17 (див. табл. 2). Отже, частка бульбочок, утворених малоактивним штамом *S. meliloti* СХМ1-48, впливала на рівень загальної азотфіксувальної активності люцерни, але визначальним за цим показником в інокуляційній суміші був генотип активного штаму бульбочкових бактерій.

Утворення на коренях рослин неактивних бульбочок за моноінокуляції *S. meliloti* СХМ1-48 у процесі вегетації призводило до істотного сповільнення росту надземної маси рослин через відсутність активної фіксації азоту й недостатнє забезпечення мінеральним азотом (0,2 норми азоту в субстраті вирощування). Найбільша надземна маса формувалася в рослин люцерни за симбіозу з Tn5-мутантом *S. meliloti* T17 (табл. 3). Інокуляція люцерни бінарними суспензіями (неактивний + активний

ТАБЛИЦЯ 4. Ефективність і конкурентоспроможність Tn5-мутантів бульбочкових бактерій *S. meliloti* на люцерні сорту Ярославна

Інокулянт	Продуктивність зеленої маси, г/посудину		Абсолютно суха речовина, г/посудину		Конкурентоспроможність, %
	Моноінокуляція	Суміш із неактивним штамом	Моноінокуляція	Суміш із неактивним штамом	
Контроль (без інокуляції)	5,21 ± 0,16	—	1,54 ± 0,02	—	—
СХМ1-48 (неактивний штам)	4,78 ± 0,30	—	1,37 ± 0,07	—	—
425a (виробничий штам)	6,74 ± 0,12	6,26 ± 0,24	1,65 ± 0,09	1,59 ± 0,06	78,0
Tn5-мутант I-2	7,04 ± 0,14	6,30 ± 0,29	1,81 ± 0,04	1,68 ± 0,06	70,0
Tn5-мутант T17	8,91 ± 0,55	8,02 ± 0,23	2,24 ± 0,02	2,07 ± 0,06	80,0

штами) також дещо негативно позначалась на формуванні вегетативної маси рослин. Втім відмінність за показником продуктивності надземної маси (г/посудину) виявилась неістотною порівняно з рослинами, інокульованими активними штамми бульбочкових бактерій 425a, I-2 і T17 - *S. meliloti* (моноінокуляція). Отже, з-поміж інших варіантів досліду з бінарною інокуляцією люцерни найефективнішим є варіант із залученням суспензії на основі штамів *S. meliloti* T17 + СХМ1-48, що підтверджує продуктивність зеленої маси і накопичення сухої речовини (табл. 4).

Обернену тенденцію ми виявили щодо наростання кореневої системи рослин. Моноінокуляція люцерни неактивним штамом СХМ1-48 та інокуляція її бінарними суспензіями, виготовленими на основі активного й неактивного штамів, стимулювала збільшення маси кореневої системи (див. табл. 3).

Отже, вплив передпосівної бактеризації насіння люцерни суспензією суміші активного й неактивного штамів на фізіологічні показники розвитку люцерни обумовлювався генетичними особливостями активного мікосимбіонта. На люцерні сорту Ярославна високоефективний Tn5-мутант *S. meliloti* T17 виявляв конкурентоспроможність на рівні еталонного виробничого штаму (див. табл. 4), а транспозоновий мутант I-2 — поступався за цим показником штаму *S. meliloti* 425a.

1. Бутвина О.Ю., Толкачев Н.З., Князев А.В. Высококонкурентные штаммы клубеньковых бактерий — основа эффективности биопрепаратов // Микробиол. журн. — 1997. — 59, № 4. — С. 123—131.
2. Воробей Н.А., Коць С.Я., Бутницький І.М. Ефективність симбіотичних систем люцерни за інокуляції Tn5-мутантами *Sinorhizobium meliloti* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — 39, № 2. — С. 105—113.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 352 с.
4. Затовская Т.В., Косенко Л.В., Юргель С.Н., Симаров Б.В. ЛПС-мутанты *Sinorhizobium meliloti* и их нодуляционная конкурентоспособность // Микробиол. журн. — 2000. — 62, № 2. — С. 27—37.
5. Коць С.Я., Воробей Н.А., Сытников Д.М. Роль штаммов клубеньковых бактерий, полученных биотехнологическими методами, в повышении продуктивности люцерны // Каразінські природознавчі студії. Матеріали Міжнар. наук. конф. (14—16 червня 2004 р., Харків). — Харків, 2004. — С. 230.
6. Кругова О.Д., Мандровська Н.М. Конкурентна здатність генетично-модифікованих штамів бульбочкових бактерій гороху // Екологія: наука, освіта, природоохоронна діяльність. Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. — К.: Наук. світ, 2007. — С. 39—40.
7. Лісова Н.Ю., Ковальчук Е., Лоркевіч З., Галан М.С. Ефективність та конкурентна здатність штамів ризобій кормових бобів в різних ґрунтово-кліматичних умовах // Микробиол. журн. — 1997. — 59, № 4. — С. 42—45.
8. 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. — 37, № 11. — С. 1266—1271.
9. Онищук О.П., Симаров Б.В. Генетическая изменчивость нодуляционной конкурентоспособности у клубеньковых бактерий и ее использование в селекции // Генетика. — 1995. — 31, № 3. — С. 293—303.
10. Патица В.П., Крутило Д.В., Ковалевська Т.М. Вплив аборигенних популяцій бульбочкових бактерій сої на симбіотичну активність інтродукованого штаму *Bradyrhizobium japonicum* // Микробиол. журн. — 2004. — 66, № 3. — С. 14—21.
11. Патица В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. Біологічний азот / За ред. В.П. Патики. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
12. Патыка В.Ф., Толкачев Н.З., Шерстобоева Е.В. и др. Препараты клубеньковых бактерий для повышения урожайности бобовых культур // Україна в світових земельних, продовольчих і кормових ресурсах і економічних відносинах: Тез. докл. Міжнар. конф. (Вінниця, грудень 1995). — Вінниця: Аграрна наука, 1995. — С. 313—314.

13. Фесенко А.Н., Орлова И.Ф., Проворов Н.А. и др. Использование прямых и косвенных методов для оценки конкурентоспособности клубеньковых бактерий гороха // Прикл. биохимия и микробиология. — 1996. — **32**, № 3. — С. 352—355.
14. Allen O.N. Experiments in Soil Bacteriology. — Minneapolis: Burges Publ. Co., 1959. — 54 p.
15. Amarger N. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains *Rhizobium meliloti* // Soil Biol. Biochem. — 1981. — **13**, N 6. — P. 475—480.
16. 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. — **42**, N 8. — P. 1185—1207.
17. Okogun J.A., Sangina N. Can introduced and indigenous rhizobial strains compete for nodule formation by promiscuous soybean in the moist savanna agroecological zone of Nigeria // Biol. and Fert. Soils. — 2003. — **38**, N 1. — P. 26—31.
18. Патент № 83298. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* Т66 для одержання бактеріального добрива під сою / С.Я. Коць, С.М. Маліченко, Н.А. Воробей, В.К. Даценко. — Опубл. 25.06.2008, Бюл. № 12.

Отримано 25.09.2008

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И РОСТ ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНОВ
ЛЮЦЕРНЫ ПРИ СОВМЕСТНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ АКТИВНЫМ И НЕАКТИВНЫМ
ШТАММАМИ *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

Н.А. Воробей, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

В условиях вегетационных опытов показано, что совместная инокуляция люцерны активным и неактивным штаммами *Sinorhizobium meliloti* увеличивает общее количество клубеньков, но снижает уровень азотфиксирующей активности растений по сравнению с вариантом моноинокуляции активным штаммом. Установлено, что образование на люцерне неактивных клубеньков при инокуляции штаммом СХМ1-48 *S. meliloti* и совместной инокуляции (активный и неактивный штаммы) замедляет рост надземной массы, стимулируя при этом развитие корневой системы. Конкурентоспособность новых Tn5-мутантов I-2 и T17 составляет соответственно 70 и 80 % и обуславливает эффективность их симбиоза с люцерной.

NITROGEN FIXING ACTIVITY AND GROWTH OF ALFALFA VEGETATIVE ORGANS
UNDER THE COMBINED INOCULATION WITH ACTIVE AND INACTIVE
SINORHIZOBIUM MELILOTI STRAINS

N.A. Vorobey, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., 03022, Kyiv, Ukraine

The combined inoculation of alfalfa with active and inactive *Sinorhizobium meliloti* strains in vegetative experiments had increased the total number of nodules but decreased the level of nitrogen fixing activity in plants as compared to the control ones which were monoinoculated with active strain. The formation of inactive nodules on alfalfa plants at inoculation with СХМ1-48 *S. meliloti* and joint inoculation (active and inactive strains) had delayed growth of vegetative mass while stimulated development of root system. Competitiveness of new Tn5-mutants I-2, T17 was about 70 and 80 % correspondently that had set conditions for their efficient symbiosis with alfalfa.

Key words: *Sinorhizobium meliloti*, Tn5-mutant, symbiosis, alfalfa, competitiveness, nitrogen fixation.