

На правах рукописи

НИЧКИК Майя Михайловна

СИМБИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ  
И НОВЫХ ШТАММОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАНТЕРИЙ

03.00.12 - физиология растений

03.00.07 - микробиология

Диссертация  
на соискание ученой степени доктора  
биологических наук в форме научного  
доклада

Киев - 1992



Работа выполнена в Институте физиологии растений и генетики  
АН Украины.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
Е.С.Ткачук

доктор биологических наук  
А.Ф.Антипчук

доктор биологических наук  
Э.А.Головко

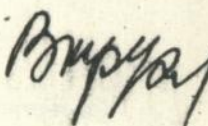
Ведущая организация: Институт физиологии растений  
им.К.А.Тимирязева РАН

Защита диссертации состоится " 1 " октября 1992 г.  
в 10 часов на заседании специализированного совета  
Д 016.57.01 по защите диссертации на соискание ученой степени  
доктора наук при Институте физиологии растений и генетики  
АН Украины по адресу: 252022, г.Киев-22, ул.Васильковская, 31/17.

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке Института  
физиологии растений и генетики АН Украины.

Научный доклад разослан " 1 " сентября 1992 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета  
кандидат биологических наук

 В.А.Труханов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время одной из самых насущных проблем, стоящих перед человечеством, является снижение дефицита белка на нашей планете. Единственным источником экологически чистого и экономически выгодного белка является белок бобовых растений, которые в симбиозе с клубеньковыми бактериями (ризобиями) активно фиксируют и накапливают азот в почве.

Являясь наиболее активными азотфиксаторами среди дизотрофа, клубеньковые бактерии вступают во внутриклеточный симбиоз со строго специфичным для каждого вида ризобий растением-хозяином. На корнях бобовых растений клубеньковые бактерии формируют сложный симбиотический аппарат - клубенек, в котором, превращаясь в бактероиды, восстанавливают при помощи фермента нитрогеназы молекулярный азот до аммония, легко усваиваемого растениями (Кретович, 1980; Старченков, 1983).

Формирование симбиотической системы - сложный многоступенчатый процесс, состоящий из нескольких этапов - преинфекции, проникновения ризобий в корневые волоски, образования и функционирования клубенька.

В процессе формирования бобово-ризобияльного симбиоза между партнерами складываются сложные многоплановые взаимоотношения. Изучение физиологии и биохимии симбиоза показало, что в их основе лежит прежде всего рациональное использование метаболитов, синтезированных микро- и макросимбионтами (Манорик с соавт., 1969; Лизневская с соавт., 1979; Тихонович с соавт., 1991). Исследованиями последних лет установлено, что механизм этих взаимоотношений контролируется значительным количеством ризобияльных и растительных генов (Kondorosi et al. 1983; Johnston et al., 1987; Ситаров с соавт., 1989).

Изучение симбиотических взаимоотношений сопряжено со значительными методическими трудностями, связанными не только с использованием несинхронизированных клеток клубеньков интактного растения, но и со сложностью разделения партнеров симбиоза и выделения метаболитов - продуктов процесса азотфиксации. Поэтому еще в 60-х годах были сделаны попытки получить искусственную симбиотическую систему, используя культуру ткани корней сои и клубеньковые бактерии (Veliky, LaRue, 1966). В настоящее время созданы азотфиксирующие ассоциации на основе культуры ткани растений и клубеньковых

бактерий, которые являются удачной экспериментальной моделью для исследования закономерностей и механизмов взаимодействия про- и эукариотных клеток.

Эффективность функционирования бобово-ризобияльной симбиотической системы может быть различной в зависимости от генетических, экологических и антропогенных факторов. Уровень эффективности симбиоза оценивается, в основном, по азотфиксирующей активности, определяемой по восстановлению ацетилена в этилен, массе и количеству клубеньков, а также продуктивности растений.

Способность клубеньковых бактерий фиксировать азот в симбиозе с бобовыми растениями широко используется в сельскохозяйственном производстве при изготовлении бактериального удобрения ризоторфина. Отечественный и зарубежный опыт использования этих препаратов показывает, что обработка семян бобовых растений ризоторфином способствует увеличению урожая на 15-30%, а также накоплению азота в почве до 300 кг/га.

Существенное повышение эффективности бобово-ризобияльной симбиотической системы может быть достигнуто при координированной селекции сортов бобовых растений и штаммов клубеньковых бактерий. В настоящее время для получения новых высокоэффективных штаммов, в основном, пользуются методами аналитической селекции (Антипчук с соавт., 1985). Широкое использование методов молекулярной генетики и геной инженерии, позволяющее исследовать "симбиотические" гены и расширить спектр наследственной изменчивости ризобий, является основой для направленного конструирования новых штаммов с хозяйственно-ценными признаками.

Комплексное сочетание физиолого-биохимических исследований бобово-ризобияльного симбиоза с традиционными и новыми методами селекции даст возможность создать высококомплементарные пары сорт - штамм, что позволит реализовать генетический потенциал партнеров и достичь максимальной интенсивности симбиотической азотфиксации.

Цель и задачи исследований. Изучить симбиотические взаимоотношения бобовых растений и клубеньковых бактерий в условиях клеточных ассоциаций и симбиоза и на их основе разработать методы получения новых штаммов ризобий, обеспечивающих повышение продуктивности бобовых растений. В связи с этим в задачу исследований входило:

1. Создание азотфиксирующих ассоциаций культуры ткани бобовых и небобовых растений с клубеньковыми бактериями и на их основе - экспериментальной модели для изучения взаимодействия партнеров в процессе азотфиксации.

2. Исследование возможности проведения межродовой конъюгации у различных видов клубеньковых бактерий и сравнительная характеристика свойств полученных трансконъюгантов.

3. Изучение симбиотических взаимоотношений растений-хозяев с трансконъюгантами клубеньковых бактерий клевера, маша и люцерны и отбор штаммов с улучшенными симбиотическими признаками.

4. Повышение эффективности симбиоза гороха и люпина при пониженных температурах путем применения холодоустойчивых штаммов клубеньковых бактерий, полученных по разработанному нами способу.

При получении азотфиксирующих ассоциаций использовали суспензионные культуры клеток пшеницы, сингери и табака с. Победитель (моно- и диплоидные), предоставленные нам д.б.н. Б.А.Левенко, а также каллусные ткани сои и табака с. Семсун, переданные нам д.б.н. В.В.Сарнацкой. В работе использовали более 80 штаммов клубеньковых бактерий, относящихся к 5 видам - *Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* biovar *trifolii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *B. spp.*, *B. spp* (*lupini*). Музей клубеньковых бактерий собран нами из отечественных и зарубежных коллекций азотфиксирующих микроорганизмов. Штамм *E. coli* K12 JC 5466 (pRDI) с генами азотфиксации (*nif* - генами) и устойчивости к антибиотикам (Tc, Ksh, Carb) получен от проф. А.Кондороши (Венгрия).

Полученные трансконъюганты клубеньковых бактерий изучали в симбиозе с растениями маша, клевера, люцерны 4-х сортов - Зайкевича, Ярославна, Херсонская 7 и Полтавчанка.

Эффективность симбиоза при пониженных температурах проверяли на растениях люпина 5-ти сортов: Союз, Мартин 2, Мотив, Припятский, Волинский I и гороха сортов Смарагд и Неосыпавшийся.

В работе использованы результаты более 40 лабораторных, микро-вегетационных и вегетационных опытов, проведенных в камерах ВКУ, теплице и вегетационном домике ИЛРГ АН Украины.

Полевые межкоделачные и производственные опыты проведены в учхозах Львовского, Полтавского, Уманского сельскохозяйственных институтов, опытном СХП АН Украины в пос. Глеваха, а также Любашевском районе Волинской области.

В экспериментах использовали современные физиолого-биохимические, микробиологические и генетические методы.

Выделение ДНК из культуральных и бактериальных клеток ризобий проводили по методу Мармура (1961). Средний нуклеотидный состав определяли по кривым тепловой денатурации, средство ДНК - по методу ДНК-ДНК гибридизации De Ley, Cattoir, Reynaerts (1970). Бактероиды выделяли из клубеньков люпина по методу Бергерсена и Тернера (1967). Азотфиксирующие ассоциации культуры ткани растений и клубеньковых бактерий получали по модифицированному методу Holsten et al. (1971). Культуры клеток сои выращивали на среде Миллера с добавлением витаминов (по Уайту), гликокола (2 мг/л), ИУК (5 мг/л) и кинетина (0,5 мг/л). Клетки суспензионной и каллусной культуры табака выращивали на модифицированной среде Murashige, Skoog (1962), где втрое уменьшили количество макроэлементов, а в качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д - 2,0 мг/л и кинетин - 0,1 мг/л. Клетки суспензионной культуры пшеницы культивировали в среде В-5 (Gamborg, 1968) при концентрации 2,4-Д - 0,5 мг/л.

Активность азотфиксации определяли ацетиленовым методом (Hardy et al., 1968), используя газовую смесь - 20%  $O_2$  + 70%  $Ar$  + 10%  $C_2H_2$ . Эндогенное выделение этилена определяли в параллельных образцах, заполненных газовой смесью без ацетилена.

Количество жизнеспособных клеток ризобий в ассоциациях определяли методом предельных разведений с последующим высевом на МДА. Учет мертвых растительных клеток - путем окрашивания раствором метиленового синего (1:100000) с последующим микроскопированием. Опыты проводили в 5-7 кратной повторности.

Междоковую конъюгацию отобранных по устойчивости к антибиотикам ( $Str$  - 250 мг/л,  $Tc$  - 15 мг/л,  $Km$  - 25 мг/л) штаммов клубеньковых бактерий люцерны, клевера, маша, сои, гороха и *E. coli* K12 Jc 5466 проводили на жидкой и твердой среде 79Ca по методу Миллера (1976) в модификации Kowalchuk, Lorkiewich (1977).

Для выделения белков клетки ризобий выращивали до экспоненциальной фазы на жидкой среде G3-7, центрифугировали и разрушали в прессе Хьюза или ультразвуком. Разделение белков проводили методом диск-электрофореза в 7,5% ПААГ по Davis (1964). Гелевые колонки окрашивали в соответствующем растворе: для выявления белков нитрогеназного комплекса использовали специфическую реакцию негеминового железа с  $\alpha, \alpha'$ -дипиридиллом, для проявления суммарных кислых белков - растворы кумасси. Электрофореграммы скани-

зовали на спектрофотометре DU-8B фирмы "Beckman".

Для выделения плазмидной ДНК исходные штаммы и трансконъюган-ты клубеньковых бактерий выращивали на среде, обеспечивающей обиль-ный рост ризобий с незначительным образованием слизи и позволяющей получить хорошие лизаты исследуемых культур, среда содержала  $K_2HPO_4$  - 0,5 г,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,25 г, дрожжевой экстракт - 0,3%, гидролизат лактальбумина - 0,5%. Клетки бактерий выращивали на качалке при 26°C в течение 30 ч.

Выделение и анализ плазмид из клубеньковых бактерий люцерны и клевера проводили согласно методу Patch et al. (1960), а из *Leg. 3223* по методу Kado и Liu (1961).

Первичный отбор трансконъюгантов клубеньковых бактерий люцер-ны и клевера по симбиотическим признакам провели в стерильных микроvegetационных опытах, используя безазотистую среду (Федоров, Зарезкая, 1978). Симбиотические взаимоотношения бобовых растений и новых штаммов клубеньковых бактерий изучали в вегетационных и полевых опытах, заложенных по стандартной методике (Доспехов, 1965).

Вегетационные опыты с бобовыми растениями закладывали в веге-тационных сосудах Вагнера емкостью II или I6 кг. Перед посевом се-мена стерилизовали в течение 15 минут 70% этиловым спиртом, промы-вали дистиллированной водой и инокулировали исследуемыми штаммами. Повторность опытов 6-12 кратная.

Учет количества клубеньков в полевых условиях осуществляли трижды за вегетационный период, отбирая монолиты 25x30 см. Расте-ния отмывали и подсчитывали клубеньки. Массу сырого и сухого ве-щества определяли 3-6 раз за вегетацию на пяти рендомизированных растениях, взятых с каждой из повторностей.

Содержание хлорофиллов *a* и *b* определяли по методам, опи-санным Гевриленко с соавт. (1975), общий азот в растительном мате-риале - по Кельдалю (Плешков, 1965). Связанные аминокислоты опре-деляли в солянокислых гидролизатах высушенных листьев на аминокис-лотном анализаторе Biotronik LC 6001 (Радчиков, 1978), свободные аминокислоты - в зафиксированном спиртом растительном материале на анализаторе АААТ 335 (Тимошенко с соавт., 1960). Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена по Урбаху (1964) и Доспехову (1965).

Научная новизна и практическая ценность. Впервые в СССР получены новые искусственные азотфиксирующие ассоциации культуры ткани растений с клубеньковыми бактериями и на их основе создана модель для исследования на клеточном уровне широкого диапазона взаимоотношений партнеров - от паразитизма до симбиоза. Установлено, что нитрогеназная активность ассоциации является очень лабильной и изменяется в зависимости от вида и сорта растений, вида и штамма клубеньковых бактерий, состава питательной среды, инокуляционной нагрузки. Растительные метаболиты клеток небобовых растений, как и бобовых могут индуцировать нитрогеназную активность клубеньковых бактерий.

Впервые в СССР методом межродовой конъюгации получены штаммы клубеньковых бактерий, представляющие ценный селекционный материал. Создана коллекция трансконъюгантов (rRDI) клубеньковых бактерий люцерны, клевера и маша. Установлено, что частота получения трансконъюгантов обусловлена видом и штаммом ризобий и составляет  $4,3 \cdot 10^{-8}$  -  $5,6 \cdot 10^{-6}$ . В зависимости от вида клубеньковых бактерий 30-70% полученных трансконъюгантов являются стабильными в условиях культуры и симбиоза с бобовыми растениями.

Впервые изучены культурально-морфологические, генетические и симбиотические свойства трансконъюгантов клубеньковых бактерий. Показано, что по ряду признаков они отличаются от родительских штаммов и между собой, в связи с чем представляют не только ценный объект для исследования физиологии и генетики симбиоза, но и исходный материал для селекции клубеньковых бактерий. Некоторые из них, отличающиеся высокими симбиотическими свойствами, депонированы во Всесоюзной коллекции азотфиксирующих микроорганизмов (ВНИИСХМ). Имеется положительное решение о выдаче охранного документа на штамм клубеньковых бактерий люцерны для получения бактериального удобрения (заявка № 4855995/13 ДСП). Впервые показано, что применение ризоторфина, приготовленного на новых штаммах клубеньковых бактерий, полученных методом экспериментальной селекции, способствовало повышению продуктивности люцерны на 15-30% и улучшению ее физиолого-биохимических показателей (уровень азотфиксации, содержание белка, свободных и связанных аминокислот, хлорофиллов).

Исследованы симбиотические взаимоотношения бобовых растений и клубеньковых бактерий при пониженных плюсовых температурах (8-12°C). Впервые установлено, что инокуляция семян гороха и люпина штаммами

клубеньковых бактерий, полученных по разработанному нами способу, приводит к более раннему образованию клубеньков на корнях бобовых растений, в результате чего происходит увеличение периода активной азотфиксации и повышение продуктивности растений-хозяев (А.с. №157277, 1990 г.).

Новые штаммы клубеньковых бактерий люцерны, люпина и гороха, полученные методом экспериментальной селекции, успешно проходят конкурсные испытания в Географической сети опытов и могут быть использованы для приготовления ризоторфина. Применение штаммов, обеспечивающих эффективный симбиоз с растениями люпина и гороха при пониженных температурах, может расширить ареал использования ризоторфина с целью увеличения дополнительного кормового и пищевого белка.

Изучение симбиотических взаимоотношений различных сортов люцерны и люпина с новыми штаммами клубеньковых бактерий позволило подобрать высокоэффективные комплементарные пары - сорт - штамм, которые могут быть использованы в сельскохозяйственном производстве.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на 5,6,7 съездах Всесоюзного микробиологического общества (Ереван, 1975; Рига, 1980; Алма-Ата, 1985), 4,5-ом Всесоюзном биохимическом съезде (Ленинград, 1979; Киев, 1986), 3,4-ой Всесоюзной конференции по культуре клеток растений (Абовян, 1979; Кишинев, 1983), 5,6,8-ом съездах Украинского микробиологического общества (Киев, 1980; Киев, 1984; Черновцы, 1989), 5,6,7-ом Всесоюзном Баховском коллоквиуме (Киев, 1976; Чернигов, 1980; Кобулет, 1988), 6,7,8-ом съездах Украинского ботанического общества (Донецк, 1977; Киев, 1982, Киев, 1987), 4,5-ом съездах Украинского биохимического общества (Киев, 1982, 1987), двух Всесоюзных рабочих совещаниях по генетике азотфиксации (Пудино-на-Оке, 1977, 1979), на Республиканской конференции "Симбиотрофные азотфиксаторы и их использование в сельском хозяйстве" (Киев, 1987), Международном рабочем совещании по генетике азотфиксации (Пудино-на-Оке, 1981; Познань, 1990), 5-ом Международном люпиновом конгрессе (Познань, 1988), на Всесоюзной научно-технологической конференции "Совершенствование научного обеспечения применения средств химизации в земледелии" (Москва, 1989), Всесоюзной конференции "Микроорганизмы - стимуляторы и ингибиторы роста растений и животных" (Ташкент, 1989), 3-ем Украинском съезде почвоведов и агрохимиков (Харьков, 1990), Межреспубликанской научно-тех-

нической конференции "Проблемы азотистого метаболизма" (Волгоград, 1990), Республиканской конференции "Биологическая фиксация молекулярного азота и азотный метаболизм бобовых растений" (Тернополь, 1991), 2,3,4,5,6,7,8-ом Рабочем Республиканском совещании по генетической инженерии (Киев, 1979, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985). Результаты исследований неоднократно демонстрировались на международных (1), республиканских (2) и ведомственных (4) выставках.

Структура работы. Диссертация изложена в форме научного доклада и включает 12 таблиц, 7 рисунков, список опубликованных по теме диссертации научных работ (2 монографии в соавторстве, 32 статьи, 2 авторских свидетельства на изобретение и 35 тезисов научных докладов).

На защиту вынесены следующие основные положения:

1. Разработанная нами экспериментальная модель азотфиксирующей ассоциации на основе культуры ткани бобовых и небобовых растений с клубеньковыми бактериями может быть использована для исследования физиолого-биохимических процессов, определяющих взаимоотношения партнеров в ассоциациях.

2. Клубеньковые бактерии люцерны, клевера, маша, сои и гороха способны к межродовой конъюгации. Транскоњюганты ризобий люцерны, клевера и маша гетерогенны по отдельным физиолого-биохимическим, симбиотическим и генетическим признакам. Межродовые транскоњюганты могут быть использованы в качестве исходного материала для получения новых штаммов клубеньковых бактерий с хозяйственно-ценными признаками.

3. Повышение продуктивности растений люцерны и улучшение их физиолого-биохимических показателей (содержание белка, аминокислот, хлорофиллов, нитрогеназная активность) может быть достигнуто путем применения новых штаммов ризобий, полученных нами на основе межродовых транскоњюгантов.

4. Урожай растений люпина и гороха может быть повышен за счет увеличения симбиотической азотфиксации путем создания эффективного бобово-ризобияльного симбиоза при пониженных температурах с помощью полученных нами холодоустойчивых штаммов клубеньковых бактерий.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Азотфиксирующие ассоциации на основе культуры ткани растений и клубеньковых бактерий

В 1972 г. академик Энгельгардт и Даниэли выдвинули идею об использовании методов генетической инженерии для расширения феномена биологической азотфиксации на небобовые растения и микроорганизмы, не способные фиксировать азот в обычных условиях. Одним из подходов к решению этой проблемы представлялось получение азотфиксирующих ассоциаций на основе культуры ткани небобовых растений и клубеньковых бактерий. Создание таких ассоциаций позволило бы не только получить новые азотфиксирующие системы, но и разработать модель для изучения метаболических взаимоотношений растений и клубеньковых бактерий на клеточном уровне, а также исследовать закономерности появления азотфиксирующей активности *in vitro*. Кроме того, с конца 60-х и начала 70-х годов в научной литературе дискуссировался вопрос о локализации генов азотфиксации в симбиотической системе и возможном взаимодействии геномов бобовых растений и клубеньковых бактерий в период формирования симбиоза (Dilworth, Parker, 1969; Перийская, 1974).

Первые результаты по сравнительному изучению ДНК, выделенных из культуральных, т.е. не способных к азотфиксации, клеток ризобий и бактериоидов, фиксирующих молекулярный азот, были очень противоречивы (Agarwal, Metha, 1974; Sutton, 1974).

Используя метод тепловой денатурации ДНК, выделенных из бактериоидов клубеньков люпина желтого и культуральных клеток ризобий, нами было показано, что среднее значение степени ДНК-ДНК гибридизации равно  $80,9 \pm 3,9$  при 99% уровне вероятности. Эти данные свидетельствуют о достоверном различии культуральной и бактериоидной ДНК по первичной структуре, а именно, по содержанию Г-Ц пар (в среднем на 1,4%) (рис. 1).

Хотя вопрос о взаимовлиянии геномов в симбиотической системе окончательно не выяснен до сих пор, уже во второй половине 70-х годов благодаря созданию азотфиксирующих ассоциаций появился ряд прямых доказательств локализации генов азотфиксации в микросимбионте, т.е. в клетках ризобий.

К началу наших исследований была опубликована одна работа по установлению симбиоза при инфицировании суспензионной культуры корневых клеток сои клубеньковыми бактериями (Holsten et al., 1971).

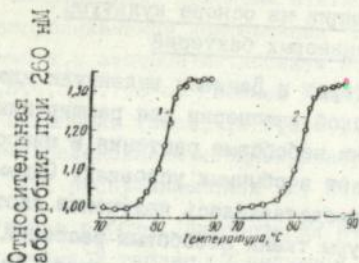


Рис. 1. Кривые тепловой денатурации ДНК из культуральных (1) и бактериальных (2) клеток *Rhizobium lupini* штамма 359а. Опыт 6.

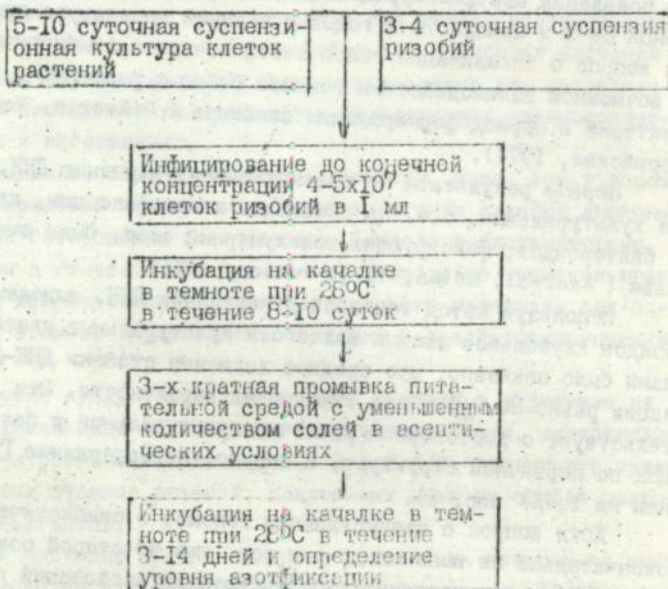


Рис. 2. Схема получения азотфиксирующих ассоциаций клеток растений и ризобий на жидкой среде.

В своей работе мы использовали суспензионные и каллусные культуры бобовых - сои, клевера и небобовых растений - пшеницы, зиγγерии, табака. Для инфицирования применяли более 80 штаммов 5 видов ризобий различного происхождения (рис. 2).

Многочисленные опыты показали, что инфицирование культуры тканей как бобовых, так и небобовых растений различными видами и штаммами клубеньковых бактерий при определенных условиях выращивания на жидкой и твердой средах приводит к установлению сложных взаимоотношений между про- и эукариотной клетками. В отдельных случаях результатом этих взаимоотношений является индуцирование нитрогеназной активности у клубеньковых бактерий *in vitro*.

При инфицировании клеток растений клубеньковыми бактериями получено более 60-ти ассоциаций, причем только 27 из них фиксировали азот. Наибольшее количество азотфиксирующих ассоциаций с клетками бобовых растений получено при инфицировании суспензионной культуры клеток сои специфическими клубеньковыми бактериями. Отмечено, что на твердой среде клетки растений выделяют больше эндогенного этилена, чем в суспензионной культуре (табл. I).

В опытах с использованием культуры ткани пшеницы ацетиленвосстанавливающая активность была отмечена только при заражении тремя штаммами клубеньковых бактерий люпина - 359а, 195, 168, причем максимальная азотфиксация наблюдалась на 30-34-й день после промывки инфицированной культуры.

Для получения ассоциации с каллусами табака сортов Самсун и Победитель использовали более 40 штаммов клубеньковых бактерий. Установлено, что в большинстве вариантов образование ацетилензависимого этилена незначительно превышает величину эндогенного этилена, выделяемого культурой клеток растений. Максимальная азотфиксация обнаружена в ассоциации с диплоидными клетками табака сорта Победитель и клубеньковыми бактериями люпина шт. 400 как на твердой, так и на жидкой среде.

Исследование взаимоотношений растительных и бактериальных клеток в таких ассоциациях показало, что в первые 10 дней совместного культивирования количество клубеньковых бактерий резко увеличивается (табл. 2). Одновременно в ассоциациях возрастает процент мертвых клеток табака по сравнению с неинфицированным контролем, что свидетельствует об угнетении растительных клеток клубеньковыми бактериями. В этот период ацетиленвосстанавливающая активность в исследуемых ассоциациях не обнаружена. Через 10 дней после промыв-

Таблица I

Выделение эндогенного и ацетилензависимого этилена ассоциациями клеток растений и клубеньковых бактерий (n = 5-7, p < 0,01)

Культура ткани растений	Вид и штамм клубень- ковых бактерий	Выделение этилена	
		нМоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /г сух. массы • 24 ч	эндogenous : ацетилен- зависимого
Суспензия клеток сои	<i>B. japonicum</i> 603	1,01	7,99
	631	1,11	7,28
	646	1,15	6,27
	48	0,80	14,95
	9	2,18	25,02
Каллусы клеток сои	<i>B. japonicum</i> 646	2,32	4,28
	649	3,49	2,06
	<i>B. spp.</i> 29C2	3,18	0,12
	32HI	4,38	0,00
Суспензия клеток табака	<i>B. lupini</i> 359	15,00	28,70
	400	11,30	74,50
	I68	10,20	28,50
	I95	2,80	37,40
	<i>B. japonicum</i> 646	3,18	15,78
Каллусы клеток табака	<i>B. lupini</i> 359	18,00	67,62
	400	13,00	120,80
	I68	14,00	2,76
	I95	6,20	4,05
	<i>R. trifolii</i> B <sub>1</sub> (1000)NI	1,30	2,70
	B <sub>1</sub> 100/100E	2,00	4,35
	<i>R. leguminosarum</i> 208	5,00	0,00
	74	0,40	0,10
	<i>B. spp.</i> 29C2	3,60	5,00
	32HI	14,10	7,90
Суспензия клеток пшеницы	<i>B. lupini</i> 359	8,12	75,84
	400	1,15	0,0
	I68	2,36	32,36
	I95	0,28	22,78

Таблица 2

Динамика развития ассоциаций на основе суспензионной культуры  
клеток табака и различных по эффективности штаммов клубеньковых  
бактерий люпина

Штамм	I-й день				II-й день				2I-й день			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Контроль	0,0	2I	0,8I	0,0	0,0	22	1,5	0,0	0,0	40	2,2	0,0
400	3,2	20	0,80	0,0	3200	3I	0,5	0,0	1,1	53	0,8	63,2
I95	5,2	2I	0,8I	0,0	700	37	0,7	0,0	1,3	35	1,1	34,6
359a	5,4	20	0,79	0,0	1400	45	0,7	0,0	0,7	41	0,8	13,7
I68	2,9	19	0,80	0,0	950	65	0,7	0,0	2,0	29	1,0	18,3

Обозначения: I - количество клеток бактерий в I мл  $\times 10^6$

II - процент мертвых клеток табака

III - упаковочный объем, мл

IV - азотфиксация,  $\text{мМ С}_2\text{Н}_4/\text{г}$  сухой массы  $\times 24$  ч

ки питательной средой (21-й день), в процессе которой удаляется значительное количество ризобий, в ассоциациях регистрируется наличие азотфиксирующей активности. По-видимому, это связано с выделением растительными клетками метаболитов, индуцирующих нитрогеназную активность ризобий.

Показано, что при использовании 4-х штаммов клубеньковых бактерий липина, отличающихся по эффективности в симбиозе с растениями (359а - активный, 400 - неактивный, I68 и I95 - малоактивные) в ассоциации с клетками табака сорта Победитель все штаммы ризобий проявляли нитрогеназную активность. При этом, азотфиксация у неактивного штамма 400 была в 4 раза выше, чем у активного.

В результате проведенных опытов установлена положительная корреляция слабой силы между нитрогеназной активностью и количеством ризобияльных клеток ( $r = +0,67$ ).

С целью увеличения азотфиксирующей активности ассоциаций ризобий с клетками небобовых растений изучали влияние различных факторов на индукцию нитрогеназной активности, в том числе: содержание азота и регуляторов роста в питательной среде, консистенцию среды, вид и штамм клубеньковых бактерий, их титр, а также вид и сорт растений, из которых получены культуры клеток. Экспериментальные данные свидетельствуют об изменении нитрогеназной активности в зависимости от концентрации азота и регуляторов роста в среде, а также специфичности ассоциаций. Так, азотфиксация клубеньковых бактерий липина шт. I68 в суспензионной культуре клеток пшеницы сорта Дружба не повышалась с уменьшением азота до 0,1 нормы и в варианте без регуляторов роста (2,4-Д) в среде (табл. 3). Количество ризобий в этих вариантах было на порядок ниже, чем на основной среде (контроль). При выращивании ассоциации на среде без азота нитрогеназная активность не обнаружена. При инфицировании этим же штаммом клеток табака сорта Победитель на среде с 0,1 нормы азота нитрогеназная активность увеличилась в 1,5 раза против контроля. На среде без 2,4-Д редукция ацетиленового азота отсутствовала, хотя количество клубеньковых бактерий липина в ассоциации увеличилось в 4 раза по сравнению с вариантом, где использовалась основная среда.

Установлено, что для создания азотфиксирующей ассоциации существенное значение имеет штамм ризобий и сорт растения.

Так, индукция нитрогеназной активности в ассоциации с клетками табака при инфицировании быстрорастущими штаммами наблюдалась на 3-4 день, а медленно растущими - на 10-14 день после промывки.

Таблица 3

Влияние состава питательной среды на азотфиксацию и титр *V. lupini* I68 в ассоциации с клетками пшеницы и табака

Состав среды	Азотфиксация нм $C_2H_4$		Титр бактерий, I г	
	: сухой массы x 24ч		: сухой массы в ассоциации с клетками	
	пшеницы	табака	пшеницы	табака
	:	:	: x 10 <sup>3</sup>	: x 10 <sup>6</sup>
Основная среда - контроль	8,3±0,6	18,3±1,3	2,6±0,2	2,03±0,21
Среда с 0,1 нормы азота	5,9±0,4	28,1±1,6	0,3±0,0	0,36±0,01
Среда без регуляторов роста	9,1±0,9	0,0	0,3±0,1	8,29±0,81
Среда без регуляторов роста с 0,1 нормой азота	7,6±0,6	19,4±2,1	0,5±0,1	0,72±0,04

При создании азотфиксирующих ассоциаций с клетками табака сортов Победитель и Самсун все штаммы ризобий люпина проявляли нитрогеназную активность как в суспензионной, так и каллусной культуре ткани сорта Победитель.

Исследование взаимоотношений растительных и ризобияльных клеток в ассоциациях при использовании большого набора штаммов клубеньковых бактерий и ткани табака сортов Самсун и Победитель свидетельствует о существовании широкого диапазона взаимодействий между ними - от паразитизма до симбиоза. При получении ассоциаций на агаризованных средах наблюдали более сильное угнетение роста каллусов табака обоих сортов, чем в суспензионной культуре. Инфицирование клеток табака клубеньковыми бактериями клевера, гороха и фасоли приводит к появлению на поверхности растительной ткани коричневых некрозных пятен, затем вся ткань темнеет и погибает. По данным Мамедова (1979), гибель растительных клеток при паразитических взаимоотношениях связана с их лигнификацией и инфекционной нагрузкой. Существует и другое мнение. Как свидетельствуют наши данные, клубеньковые бактерии выделяют в окружающую среду значительное количество физиологически активных веществ, в том числе витаминов группы В, которые могут привести к дисбалансу их в среде, в результате чего нарушаются физиологические функции растений. По данным Хайловой (1968) причиной гибели клеток табака в ассоциациях является суперсинтез гормонов некоторыми штаммами ризобий.

В то же время в ассоциациях с каллусами табака сортов Семсун и Победитель мы неоднократно отмечали стимуляцию роста различных штаммов клубеньковых бактерий. Большинство из проверенных штаммов в таких ассоциациях накапливали значительную биомассу и обладали низкой азотфиксирующей активностью, образуя в некоторых вариантах больше эндогенного, чем этилензависимого этилена. При удалении клеток табака сорта Победитель из ассоциаций после 21 дня совместного культивирования с клубеньковыми бактериями линия штаммов 400 и 168, нитрогеназная активность клубеньковых бактерий увеличилась в 1,6 раза и достигла 180,0-184,3 мМ  $C_2H_4$  на 1 г сухой массы за 24 часа. Клубеньковые бактерии, культивируемые на среде Мурасиге и Скуга без клеток растений или их метаболитов (контроль), не развивались и нитрогеназной активностью не обладали. Эти данные свидетельствуют о возможности индукции азотфиксации у клубеньковых бактерий не только клетками небобовых растений, но и их метаболитами. Как показали последующие исследования (Pagan et al. 1975; Kurz, LaRue, 1975; Старченко с соавт., 1980), основными метаболитами, необходимыми для фиксации азота ризобиями вне растения, являлись пентозы - арабиноза, ксилоза, галактоза и дикарбоновые органические кислоты цикла лимонной кислоты - сукцинат, фумарат, а также некоторые амиды аминокислот - глутамин, аспарагин. Эти данные свидетельствуют о том, что оба класса источников углерода и азота, являясь обычными продуктами метаболизма как бобовых, так и небобовых растений, могут индуцировать синтез и функционирование ферментов нитрогеназного комплекса у ризобий.

Итак, сравнительный анализ данных по нитрогеназной активности ризобий в ассоциации с клетками бобовых и небобовых растений показал, что уровень азотфиксации в значительной степени зависит от состава среды (соотношения азотсодержащих солей, регуляторов роста), условий выращивания (кислородный режим, температура), штаммов клубеньковых бактерий, вида и сорта тканей растений.

Значение результатов, полученных в этих опытах, состоит в том, что, во-первых, показана стимуляция тканями небобовых растений роста многих штаммов и видов клубеньковых бактерий. Во-вторых, клетки небобовых растений также как и бобовых могут выделять вещества, способствующие синтезу и функционированию нитрогеназы у ризобий. В-третьих, клубеньковые бактерии могут фиксировать азот в отсутствие клеток растений, т.е. в чистой культуре на определенных средах, и,

значит, гены, контролирующие синтез нитрогеназы, находятся в клетках ризобий.

Эти выводы позволили нам начать исследования в другом направлении, связанном с увеличением азотфиксирующей активности клубеньковых бактерий за счет увеличения "дозы гена".

Получение трансконъюгантов клубеньковых бактерий  
и изучение их физиолого-биохимических и симбиотических свойств

Стремительное развитие молекулярной биологии в 70-х годах и создание новых методов генетической инженерии открыли ряд перспективных направлений в развитии проблемы биологической фиксации азота. Среди прикладных вопросов этой проблемы важное место занимает изучение возможности получения высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий с заранее заданными свойствами. Создание рекомбинантной плазмиды  $pRDI$  и ее производных (Dixon, Cannon, Kondorosí, 1976), несущих гены азотфиксации ( $nif$ -гены), позволило целенаправленно перенести их от донорного штамма к различным представителям граммотрицательных бактерий, в том числе ризобий, и добиться выражения переданной информации. Мы предположили, основываясь на принципе "дозы генов", что можно усилить способность фиксировать азот за счет экспрессии у реципиента не только собственного, но и принесенного  $nif$ -гена.

В настоящее время плазида  $pRDI$  перенесена в бактерии I4 видов и в 8 из них получена экспрессия генов азотфиксации. Теоретическое и практическое значение этих работ состоит не только в выяснении структуры и функции собственных  $nif$ -генов, экспрессии чужеродных генов азотфиксации в новом хозяине, но и в создании новых видов diaзотрофов.

Мы поставили перед собой задачу, используя плазмиду  $pRDI$ , получить штаммы клубеньковых бактерий с улучшенными симбиотическими свойствами и изучить трансконъюганты клубеньковых бактерий не только в культурах, но и в условиях симбиоза с растением-хозяином.

Трансконъюганты клубеньковых бактерий с плазмидой  $pRDI$  получили методом конъюгации на жидкой и твердой среде 79Ca (Kowalchuk, Lorkiewicz, 1977). Донором плазмиды  $pRDI$  служила культура *E.coli* K12 JC 5466. В качестве реципиентов отобрали 18 из 80

Таблица 4

Характеристика ризобий, отобранных в качестве реципиентов для получения трансконъюгантов и частота переноса плазмиды pRD1

Реципиент	Растение-хозяин	Эффективность	Вирулентность	Скорость роста	Устойчивость к антибиотикам			Консистенция среды	Количество в популяции конъюгантов	Частота переноса плазмиды	
					Str	Tc	Km				
<i>R. meliloti</i>	Ch	люцерна	+	+	быстро растущая	r	s	s	жидкая	40	$3,3 \times 10^{-7}$
	425a	"	+	+	"	r	s	s	твердая	III	$5,6 \times 10^{-6}$
	448	"	+	+	"	r	s	s	твердая	4	$2,0 \times 10^{-8}$
<i>R. leguminosarum</i>	I91-B	вика	+	+	"	r	s	r	жидкая	2	$4,3 \times 10^{-8}$
<i>R. trifolii</i>	348	клевер	+	+	"	r	s	r	твердая	39	$1,9 \times 10^{-6}$
	B1(1000)NM	"	+	+	"	r	s	r	жидкая	22	$1,4 \times 10^{-7}$
	24GR	"	+	+	"	r	s	r	твердая	15	$1,3 \times 10^{-6}$
<i>R. japonicum</i>	646	соя	+	+	медленно растущая	r	s	r	жидкая	I	$3,5 \times 10^{-8}$
<i>R. species</i>	32Z3	маш	+	+	"	r	s	r	жидкая	5	$3,5 \times 10^{-8}$

штаммов, относящихся к 5 видам *Rhizobium* по соответствующим маркерам устойчивости к антибиотикам ( $Str^R$ ,  $Tc^R$ ,  $Km^R$ ) (табл.4).

В результате проведения межродовой конъюгации получено около 250 трансконъюгантов с частотой переноса плазмиды  $1,3 \cdot 10^{-8}$  -  $5,6 \cdot 10^{-6}$ . Нами установлено, что для некоторых штаммов частота переноса плазмиды на твердой среде выше, чем на жидкой. Максимальное количество трансконъюгантов получено у быстрорастущих клубеньковых бактерий - *R.meliloti* и *R.trifolii*, меньше - у медленно растущих *B.spp.* и *B.japonicum*. Показано, что только 30-70% трансконъюгантов сохранили устойчивость к 3-м указанным выше антибиотикам в культуре и условиях симбиоза. Наиболее стабильными были трансконъюганты клубеньковых бактерий клевера, менее - люцерны и маша.

Они были отобраны для дальнейших исследований морфологических, биохимических, генетических и симбиотических признаков.

Колонии трансконъюгантов при выращивании на маннитно-дрожжевом, лептонном и бобовом агаре, в среде CS7 по морфологии не отличались от колоний исходного штамма. По биохимическим свойствам часть трансконъюгантов отличалась от реципиентного штамма (табл.5).

Таблица 5

Физиолого-биохимические свойства трансконъюгантов *Rhizobium trifolii* B<sub>1</sub>(1000)NN

Среда	: Донор	: Реципиент	: Трансконъюганты		
			: I-2	: I-5	: I-10
Кертофельный агар	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
Желатина	- - -	+ + +	- - -	- - -	+ + +
Эмби	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
Молоко	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	- - -
Лактоза	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -
Сахароза	- - -	+ + +	+ + +	- - -	+ + +
Для образования индола	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -

Так, у трансконъюгантов клубеньковых бактерий клевера I-2 и I-5 исчезла способность разжижать желатину, а у трансконъюганта I-5 - сбраживать сахарозу. Более того, трансконъюганты I-2 и I-10 утратили способность протеинизировать молоко и сбраживать глюкозу, хо-

тя и донор и реципиент обладают этими свойствами. Изменения в белковом и углеводном обмене указанных трансконъюгантов могут быть связаны с перестройкой метаболизма в клетке при введении чужеродных генов.

Об изменениях в белковом обмене свидетельствуют также данные по фракционному составу растворимых кислых белков, которые преобладают в активно фиксирующих азот клубеньках, и белков нитрогеназного комплекса родительских штаммов и трансконъюгантов.

При сравнении фракционного состава растворимых белков на денситограммах выявлено, что трансконъюганты клубеньковых бактерий люцерны отличаются от исходного штамма по количеству синтезированных белков - 15 основных зон против 10. На электрофореграммах исходного штамма *V. spp. 3223* выявлено 13 основных полос, часть из которых отсутствует у одного или обоих трансконъюгантов. Нами проведено сравнительное изучение фракционного состава белков трансконъюгантов и исходного штамма *R. trifolii*. Анализ электрофореграмм показал, что трансконъюганты, как и *R. meliloti* значительно богаче по набору белковых компонентов, а по отдельным белкам они различаются между собой (рис. 3).

При сопоставлении результатов анализа плазмидного состава трансконъюгантов и родительских штаммов установлено, что они отличаются по молекулярной массе плазмидной ДНК. При этом, у трансконъюгантов *R. meliloti* появилась дополнительная плазида с молекулярной массой  $pRDI$ , которая стабильно сохраняется в клетках ризобий, не вызывая изменений в эндогенном плазмидном составе. Напротив, у трансконъюгантов клубеньковых бактерий клевера I-7 и I-10 произошли перестройки в плазмидном составе, а именно, появилось две плазмиды с меньшей молекулярной массой, чем у исходного штамма. У трансконъюгантов *V. spp. 3223* наблюдали увеличение молекулярной массы плазмид при сохранении их количества. Полученные данные свидетельствуют об изменениях на биохимическом и генетическом уровне в метаболизме клеток 3-х видов ризобий при интродукции чужеродной плазмиды (рис. 4).

Косвенным доказательством наличия дополнительной плазмидной ДНК в клетках трансконъюгантов является и то, что отдельные клоны трансконъюгантов всех изученных видов ризобий достоверно отличались по кинетике роста от исходных штаммов (рис. 5).

Показано, что донор, реципиент и трансконъюганты *Rhizobium meliloti* II-7 и II-8 содержат оба компонента нитрогеназы, причем последние синтезируют их в большом количестве.

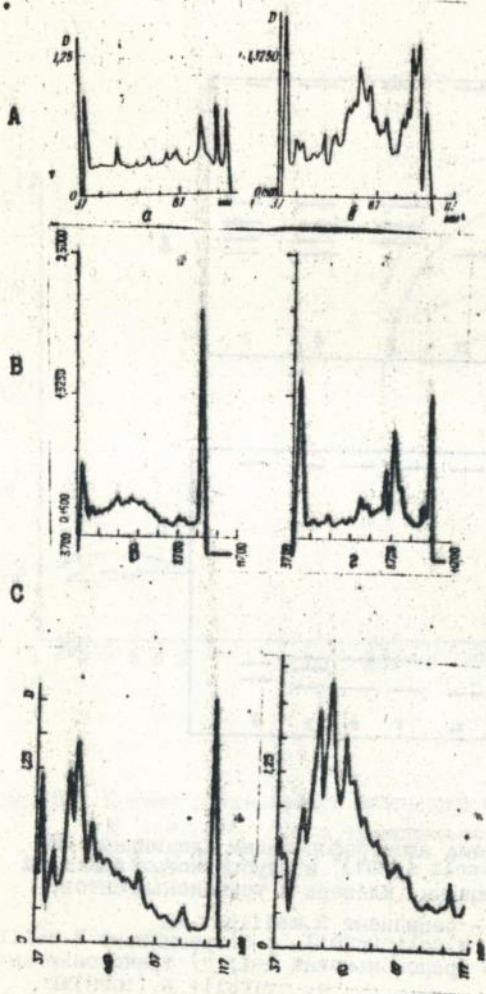


Рис. 3. Денситограммы суммарных кислых белков клубеньковых бактерий и трансконъюгантов.  
 А - *R. meliloti* Ch  
 а) исходный штамм;  
 б) трансконъюгант П-8;  
 В - *R. trifolii*  
 В<sub>1</sub> (1000)MN  
 в) исходный штамм;  
 г) трансконъюгант I-2;  
 С - *B. spp.* 32E3  
 д) исходный штамм;  
 е) трансконъюгант I-2.

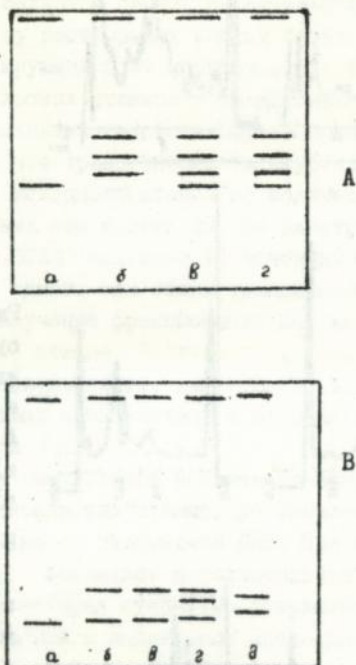


Рис. 4. Схема электрофореграммы плазмидной ДНК *E. coli* (pRD1) и клубеньковых бактерий люцерны, клевера и трансконъюгантов.

- А - реципиент *R. meliloti* Ch  
 а) *E. coli* (pRD1) ; б) реципиент *R. meliloti* Ch;  
 в) трансконъюгант П-1; г) трансконъюгант П-7;  
 В - реципиент *R. trifolii* В<sub>1</sub>(1000)ВН  
 а) *E. coli* (pRD1) ; б) реципиент *R. trifolii*;  
 в) трансконъюгант I-2; г) трансконъюгант П-7;  
 д) трансконъюгант I-10.

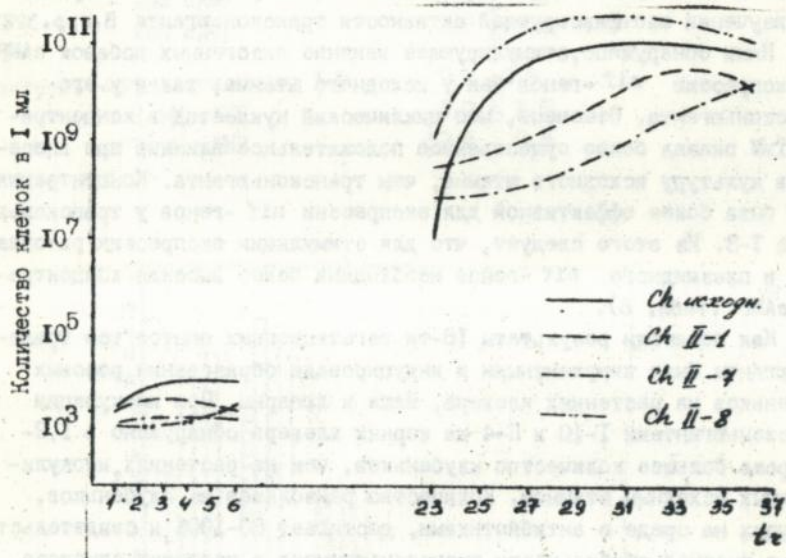


Рис. 5. Кривые роста клеток исходного штамма *R. maliloti* Ch и трансконъюгантов II-1, II-7 и II-8.

В условиях чистой культуры провели сравнительное исследование нитрогеназной активности у транскоњюгантов и родительских штаммов.

Опыты показали, что ацетиленвосстанавливающая активность транскоњюгантов *R. trifolii* В<sub>1</sub>/1000/КН I-2 и I-5 находилась на том же уровне, что и у реципиента, а у транскоњюганта I-10 более чем в 10 раз превосходила последнюю. Можно предположить, что у транскоњюганта I-10 происходит экспрессия не только ризобияльного, но и плазмидного *nif*-генов. Аналогичные результаты получены при изучении азотфиксирующей активности транскоњюганта В.врр.3283 I-3. Нами обнаружено, стимулирующее влияние экзогенных добавок сАМР на экспрессию *nif*-генов как у исходного штамма, так и у его транскоњюганта. Отмечено, что циклический нуклеотид в концентрации 1мМ оказал более существенное положительное влияние при внесении в культуру исходного штамма, чем транскоњюганта. Концентрация 2 мМ была более эффективной для экспрессии *nif*-генов у транскоњюганта I-3. Из этого следует, что для стимуляции экспрессии ризобияльного и плазмидного *nif*-генов необходима более высокая концентрация сАМР (табл. 6).

Как показали результаты 18-ти вегетационных опытов, все транскоњюганты были вирулентными и индуцировали образование розовых клубеньков на растениях клевера, маша и люцерны. При инокуляции транскоњюгантами I-10 и П-4 на корнях клевера обнаружено в 1,2-1,5 раза большее количество клубеньков, чем на растениях, инокулированных исходным штаммом. Количество реизолатов из клубеньков, растущих на среде с антибиотиками, достигает 80-100% и свидетельствует о высокой стабильности транскоњюгантов в условиях симбиоза. Из табл. 7 видно, что инокуляция транскоњюгантом I-7, П-3 и П-4, способствует повышению азотфиксирующей активности клубеньков клевера в 2,5-3 раза по сравнению с исходным штаммом в фазе 3-4 листьев.

В условиях симбиоза почти все транскоњюганты отличались от исходного штамма не только по влиянию на азотфиксирующую активность, но и на рост и развитие растений-хозяев. В фазе 6-7 листьев часть опытных растений была значительно крупнее контрольных. Они имели более интенсивную зеленую окраску, большую вегетативную массу. Более 40% из 22 изученных транскоњюгантов положительно влияли на развитие корня и надземной части клевера и несколько увеличивали их массу. Часть транскоњюгантов существенно не влияла на рост, а некоторые даже снижали их массу на 8-10% в фазе бутонизации. При инокуляции транскоњюгантом I-5 получена максимальная масса клевера, превышающая контроль на 20%.

Таблица 6

Влияние сАМР на экспрессию *nif*-генов у В.срр. 3223 и транскоъюганта I-3

Вариант	Нитрогеназная активность, $\text{mM C}_2\text{H}_4/\text{мг белка}/20 \text{ ч}$
Контроль - В.срр. 3223	$1,9 \pm 0,3$
1мМ сАМР	$5,2 \pm 0,5$
2мМ сАМР	$2,7 \pm 0,4$
Контроль - транскоъюгант I-3	$7,7 \pm 0,8$
1 мМ сАМР	$5,7 \pm 2,3$
2 мМ сАМР	$10,5 \pm 0,5$

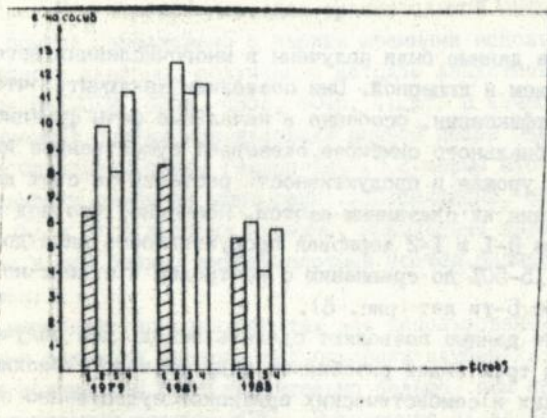


Рис. 6. Урожай зерна маша при инокуляции исходным штаммом и транскоъюгантами В.срр. 3223  
 1. В.срр. 3223  
 2. Транскоъюгант I-2  
 3. Транскоъюгант I-3  
 4. Транскоъюгант II-1

Таблица 7

Влияние трансконъюгантов *R. trifolii* В<sub>1</sub>(1000)НН на эффективность симбиоза с клевером

Штамм	Количество клубеньков:	Рост растений из клубеньков на среде с антибиотиками, %	Нитрогеназная активность, мкМ $C_2H_4$ /г/ч	Масса растения, г
Исходный	9,5±1,2	0	1,9±0,1	18,85±3,66
I-5	12,7±3,1	100	4,3±1,2	22,20±1,80
I-7	9,2±1,4	100	6,0±1,9	19,75±3,53
I-10	11,5±1,5	100	3,4±0,7	19,32±3,26
П-3	9,0±3,0	80	6,2±1,8	16,29±1,85
П-4	13,5±2,2	87	5,4±1,5	19,32±0,78

Аналогичные данные были получены в многочисленных вегетационных опытах с машем и люцерной. Они позволили заключить, что высокий уровень азотфиксации, особенно в начальные фазы функционирования бобово-ризобиального симбиоза, оказывает существенное влияние на формирование урожая и продуктивность растений за счет дополнительного снабжения их связанным азотом. Показано, что под влиянием трансконъюгантов П-1 и I-2 зерновая продуктивность маша достоверно увеличилась на 15-50% по сравнению с контролем и стабильно сохранялась в течение 5-ти лет (рис. 6).

Приведенные данные позволяют сделать вывод, что полученные трансконъюганты трех видов ризобий по ряду физиолого-биохимических, генетических и симбиотических признаков существенно отличаются от родительских штаммов и между собой, в связи с чем представляют ценный исходный материал для селекции клубеньковых бактерий.

#### Изучение симбиотических взаимоотношений люцерны и новых штаммов клубеньковых бактерий

Поскольку перед нами стояла задача получить высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий, используя метод межродовой конъюгации, нам необходимо было исследовать их влияние на формирование и функционирование бобово-ризобиального симбиоза в условиях вегетационных и полевых опытов. Вопрос о приживаемости бактерий в почве, полученных генно-инженерными методами, до конца не выяснен и ши-

роко дискутируется в отечественной и зарубежной научной литературе ( Ноеквита, 1967; Симаров, 1989).

В условиях микровегетационных опытов путем многоступенчатого отбора по признаку "максимальная азотфиксация" и "эффективность" из III-ти трансконъюгантов клубеньковых бактерий люцерны получили 7 штаммов, превышающих производственный штамм (табл. 8).

Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств отобранных штаммов показало, что они, как и трансконъюганты клубеньковых бактерий клевера и маша, отличаются от родительских штаммов по ряду признаков, связанных с углеводным и белковым обменом, а именно, не гидролизуют крахмал, не сбраживают мальтозу, не разжижают желатину, пептонируют молоко.

Для изучения симбиотических взаимоотношений новых штаммов М<sub>1</sub>, М<sub>2</sub>, М<sub>3</sub>, М<sub>4</sub>, М<sub>5</sub>, М<sub>7</sub> и М<sub>8</sub> провели 7 вегетационных, 5 полевых и один производственный опыт с люцерной сортов - Зайкевича, Ярославна, Херсонская 7 и Полтавчанка. Для сравнительной оценки эффективности в ряде опытов параллельно с нашими штаммами использовали клубеньковые бактерии люцерны, полученные методом аналитической селекции, из музея ВНИИСХМ (425а, 435а, 404б, 412б). В качестве субстрата в вегетационных опытах использовали речной песок или луговой чернозем с добавлением среды Гельригеля (0,2 нормы азота). При оценке эффективности симбиоза учитывали: азотфиксацию, содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях люцерны, накопление зеленой массы и содержание в ней белка, аминокислотный состав биомассы, а также урожай семян.

В микровегетационных опытах все использованные в работе клубеньковые бактерии люцерны индуцировали клубеньки на корнях растений. Их количество было значительно больше, чем при инокуляции производственным штаммом 425а. Выделенные из клубеньков реизоляты сохраняли маркеры устойчивости к трем антибиотикам, что свидетельствует о стабильности этих признаков в процессе функционирования симбиоза. Исследования стабильности маркеров у реизолятов клубеньковых бактерий в условиях вегетационного и полевого опытов показало, что они сохраняются только в течение первого года вегетации растений. Так, во время первых трех укосов люцерны большинство реизолятов из клубеньков (около 90%) давали интенсивный рост на средах с антибиотиками (табл. 8). На второй год вегетации (IV и V укосы) из клубеньков люцерны как сорта Зайкевича, так и сорта Ярославна выделялись реизоляты, которые не росли на этих средах.

Таблица 8

Урожай и белковая продуктивность люцерны с. Зайкевича  
в зависимости от инокуляции новыми штаммами клубеньковых  
бактерий и их стабильности

Штамм	Рост реизо- лятов из клубенька первого го- да на среде с антибио- тиками, %	Урожай зеленой массы, ц/га	Прибавка урожая		Содержание протеина в сене, %
			ц/га	%	
Производствен- ный	0	285	-	-	20,58
М3	85	327	42	14,7	20,00
М4	92	369	84	29,5	22,19
М6	90	330	-	15,8	22,00
М7	70	310	-	8,7	21,19
НОР <sub>05</sub>		36			0,3

Азотфиксирующая активность клубеньков люцерны в онтогенезе растений увеличивается, начиная с фазы 2-3 пары листьев, и достигает максимума в фазе бутонизации - начала цветения. Затем она к фазе образования первых семенников медленно уменьшается. После каждого укоса люцерны нитрогеназная активность клубеньков резко падает, по-видимому, в связи со снижением поступления фотоассимилятов к листьям. По мере отрастания растений нитрогеназная активность увеличивается и к фазе бутонизации - начала цветения снова достигает максимального уровня.

Определение азотфиксации инокулированных отобранными штаммами фитактных стерильных растений в микроvegetационных опытах, а также клубеньков люцерны в вегетационных и полевых опытах свидетельствует о том, что уровень азотфиксации является очень лабильной величиной и отклоняется как в сторону увеличения, так и уменьшения по сравнению с контролем.

Наши исследования показали, что наибольшей азотфиксацией и стабильностью в процессе вегетации люцерны как в вегетационных, так и полевых опытах обладает штамм М4. Остальные штаммы имели также высокую нитрогеназную активность по сравнению с производственным штаммом, но были менее стабильными.

Результаты опыты подтвердили данные, полученные в вегетационных опытах. показали, что для люцерны сорта Зайкевича наибольший уро-

жай зеленой массы получен при инокуляции штаммом М4 (прибавка к контролю составила 29,5% (табл. 8). В зависимости от типа почвы, сорта, сроков посева и скашивания прибавка урожая при инокуляции новыми штаммами составила 5-30%.

В производственном опыте (Полтавский СХИ, учхоз "Бречковка") показано, что прибавка урожая зеленой массы люцерны сорта Ярославна при инокуляции штаммом М4 по сравнению с вариантом без инокуляции составила 26% или 32,9 ц/га, а по сравнению с производственным штаммом соответственно 13,5% и 20,8 ц/га. Отмечено большее образование клубеньков и более высокая степень облиственности растений опытных вариантов.

Изучение влияния инокуляции новыми штаммами на содержание хлорофиллов  $\alpha$  и  $\beta$  в листьях люцерны сорта Ярославна показало, что удельное содержание пигментов зависело от фазы развития растений и активности штамма (табл. 9).

Таблица 9

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях люцерны с. Ярославна по фазам роста в зависимости от инокуляции новыми штаммами

Штамм	Хлорофиллы, мг/дм <sup>2</sup>					
	фаза бутонизации			фаза цветения		
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha + \beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha + \beta$
Без инокуляции	2,09	0,56	2,65	2,32	0,91	3,23
М1	2,48	0,60	3,08	2,35	0,96	3,31
М2	1,85	0,39	2,25	2,10	0,83	2,93
М3	1,89	0,54	2,43	2,63	0,66	3,29
М4	2,45	0,66	3,11	2,17	0,88	3,05
М6	2,08	0,56	2,65	2,27	0,90	3,14
М7	2,18	0,49	2,67	2,14	0,82	2,96
М8	2,75	0,96	3,71	2,35	0,83	3,28
НСР <sub>05</sub>	0,60	0,23	1,05	0,37	0,14	0,47

Так, в период бутонизации только 3 из 11 использованных для инокуляции штаммов способствовали статистически достоверному увеличению содержания фотосинтетических пигментов в листьях растения-хозяина. Максимальное содержание пигментов было обнаружено в растениях, инокулированных штаммом М8, который способствовал увеличению содержания хлорофилла  $\alpha$  на 30%, хлорофилла  $\beta$  на 74%, суммы этих пигментов на 40%.

Корреляционный анализ показал, что в фазе бутонизации между активностью азотфиксации в клубеньках и накоплением зеленых пигментов в листьях растения-хозяина существует прямая связь слабой и средней силы ( $r_{05} = 0,34-0,56$ ).

В фазе цветения у растений, инокулированных штаммами М1, М4, М7 и М8, содержание хлорофиллов *a* и *b* уменьшилось, хотя азотфиксация оставалась высокой. Непосредственной зависимости величины урожая зеленой массы люцерны от содержания хлорофиллов в листьях и азотфиксирующей активности клубеньковых бактерий в этой фазе не выявлено.

Как известно, качество кормового белка люцерны определяется его аминокислотным составом, который в значительной степени зависит от эффективности штаммов клубеньковых бактерий (Кретович, 1983). Сравнительное изучение влияния штаммов, полученных методом как экспериментальной, так и аналитической селекции, показало, что содержание белка и аминокислот в листьях люцерны при инокуляции обеими группами ризобий выше, чем без инокуляции.

В первый год вегетации у люцерны сортов Зайкевича и Ярославна наблюдали увеличение азотонакопления в сене первого укоса при инокуляции штаммами М4 и М6 (табл. 8). Во втором укосе люцерны сорта Ярославна отмечено снижение содержания азота в сухой биомассе. При инокуляции новыми штаммами содержание протеина в сене люцерны увеличилось в зависимости от сорта и штамма ризобий на 1,5-4,0%.

Определение пула связанных и свободных аминокислот в биомассе люцерны показало, что в процессе роста растений постоянно обнаруживается 18 связанных и 26 свободных аминокислот, спектр и количественное содержание которых изменяется в зависимости от сорта и фазы развития люцерны, а также особенностей использованного для инокуляции штамма ризобий. Так, максимальное содержание связанных аминокислот (незаменимых и общих) обнаружено у люцерны сорта Ярославна на первом году жизни при инокуляции штаммами М4 и М6. Среди связанных аминокислот количественно преобладали аспарагин, глутамин, фенилаланин, аланин, аргинин, лейцин и лизин (табл. 10).

Известно, что состав и динамика свободных аминокислот в тканях являются показателями направленности и интенсивности физиологических процессов у растений (Сытник с соавт., 1987). Нами установлено, что в течение вегетации в биомассе люцерны обнаруживается до 36 свободных аминокислот, причем некоторые из них (гистидин, триптофан, гидроксипролин) выявлены только на определенных фазах роста растений. Среди свободных аминокислот преобладали глутаминовая, ас-

Таблица 10  
Влияние инокуляции различными штаммами *R.meliloti* на содержание  
связанных аминокислот в листьях люцерны, мг/г сухого вещества

Штаммы	с.Зайкевича				с.Ярославна			
	фаза стеблевания		фаза бутонизации		фаза стеблевания		фаза бутонизации	
	сумма незаме- нимых амино- кислот	общее со- держание аминокис- лот	сумма незаме- нимых амино- кислот	общее со- держание аминокис- лот	сумма незаме- нимых амино- кислот	общее со- держание аминокис- лот	сумма незаме- нимых амино- кислот	общее со- держание аминокис- лот
425а	115,08	297,25	105,00	264,38	113,53	282,90	99,68	251,67
435	113,30	288,39	98,67	243,78	98,62	243,28	95,58	243,23
412	128,19	307,60	117,56	296,43	132,96	323,54	76,24	188,65
404б	109,90	281,70	99,00	248,30	110,73	263,60	95,56	241,04
М4	111,00	284,13	117,08	294,95	122,77	300,14	96,75	247,62
М6	114,00	288,80	112,65	283,74	96,85	249,25	110,13	259,17
М7	112,70	284,52	112,30	282,38	122,08	299,60	102,06	264,80
М3	118,50	300,70	115,48	288,34	114,43	283,90	81,23	195,88

парагиновая и  $\gamma$ -аминомасляная кислоты, а также аланин и цистеин.

Инокуляция испытуемыми штаммами оказывает существенное влияние на количественное соотношение свободных аминокислот в листьях люцерны. Так, при инокуляции штаммом 425а у растений с.Зайкевича в фазе бутонизации второго года вегетации увеличивается содержание лизина в 3 раза, а штаммом М6 - в 6 раз по сравнению с контролем. Положительное влияние на содержание глутаминовой кислоты и цистина оказала инокуляция штаммом М4, а тирозина - штаммом М3. Наибольшее содержание свободных аминокислот обнаружено в листьях люцерны с.Зайкевича при инокуляции штаммом М4 во второй год вегетации (рис. 7). Для люцерны с.Ярославна характерен более низкий пул свободных аминокислот. Значительное количество их обнаруживается при инокуляции штаммом М7, а также спонтанными расами ризобий.

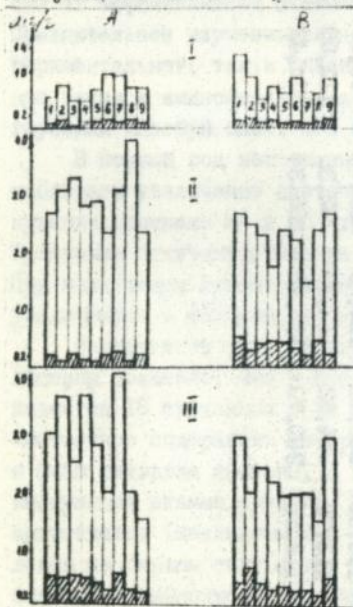


Рис.7. Влияние различных штаммов клубеньковых бактерий на содержание свободных аминокислот в листьях люцерны в процессе вегетации. А - сорт Зайкевича, Б - сорт Ярославна; I - фаза бутонизации - начала цветения первого года, II - фаза стеблевания второго года, III - фаза бутонизации - начала цветения второго года; заштрихованные столбики - сумма незаменимых аминокислот, незаштрихованные - сумма заменимых аминокислот; I - без инокуляции (контроль), 2-9 - инокуляция соответственно штаммами: 425а, 435а, 404б, 412б, М6, М4, М3, М7.

Итак, данные, полученные в микроvegetационных, вегетационных и полевых опытах свидетельствуют о том, что уровень азотфиксации клубеньков люцерны изменяется в зависимости от условий выращивания, сорта растения-хозяина и фазы его развития, а также активности штаммов, использованных для инокуляции.

По этому признаку лучшим следует признать штамм М4. Урожай зеленой массы, содержание хлорофиллов  $\alpha$  и  $\beta$ , количество и качество белка по аминокислотному составу и пул свободных аминокислот растений, инокулированных новыми штаммами, в основном, значительно выше, чем при спонтанной инокуляции. Следовательно, новые штаммы ризобий, полученные методами экспериментальной селекции, наравне со штаммами, полученными методами аналитической селекции, могут быть признаны перспек-

тивными, а штамм М4 - рекомендован для приготовления ризоторфина под люцерну. На штамм М4 имеется положительное решение о выдаче охранного документа по заявке № 4855995/13, ДСП.

Повышение эффективности симбиоза растений люпина и гороха при пониженных температурах путем инокуляции новыми штаммами клубеньковых бактерий

Одним из путей повышения урожайности бобовых культур за счет экологически чистого симбиотрофного питания растений является увеличение периода функционирования клубеньков на корнях бобовых растений. Так как некоторые бобовые культуры (люпин и горох) высеваются ранней весной при температуре 5-10°C, необходимо, чтобы клубеньковые бактерии, которыми обрабатывают семена, обладали также повышенной холодоустойчивостью. Известно, что клубеньковые бактерии способны переносить низкие температуры, зимуют в почве (Вогацкая, 1968; Шильникова, Игнатова, 1984). Получение штаммов, способных к образованию симбиоза при пониженных температурах, позволило бы увеличить период активной симбиотической фиксации азота и в целом повысить продуктивность растений за счет симбиотрофного азота, а также расширить ареал применения ризоторфина.

В своей работе мы использовали 8 штаммов клубеньковых бактерий люпина и 3 штамма ризобий гороха, ранее применявшихся для производства ризоторфина. Как известно, оптимум температуры выращивания для клубеньковых бактерий лежит в пределах 26-28°C. Последовательная адаптация штаммов к пониженным плюсовым температурам позволила отобрать клоны, дававшие рост при 6-8°C. Использование пониженных температур при селекции клубеньковых бактерий для образования более раннего и эффективного симбиоза в литературе не известно. На разработанный нами способ получено авторское свидетельство № 1577277, ДСП.

Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств клубеньковых бактерий гороха и люпина показало, что они почти не отличаются от исходных штаммов по этим признакам.

В 5 микровеgetационных опытах, проведенных в контролируемых условиях камеры ВКС, установлено, что новые штаммы ризобий люпина - САФ1, САЭ2 и САФ3 и гороха - М1 и М2 образуют клубеньки на 5-10 дней раньше, чем исходные штаммы при температуре выращивания растений 8-12°C. В 6 вегетационных опытах, проведенных по стандартной методике, и 2-х полевых опытах использовали районированные и пере-

пективные сорта люпина - Союз, Мотив, Мертин 2, Припятский и гороха - Неосыпайщийся, Смарагд. Учет образования клубеньков, их массы и цвета проводили ежедневно. В этих опытах также отмечено более раннее образование клубеньков по сравнению с производственными штаммами. Фенологические наблюдения за растениями в условиях вегетационных и полевых опытов (1985-1991 гг.) свидетельствуют о том, что растения люпина всходят дружнее, зацветают на 4-7 дней раньше, бобики наливаются и созревают дружнее, чем при инокуляции производственными штаммами. Масса клубеньков на корнях люпина как в вегетационных, так и в полевом опыте была в 1,2-1,5 раза больше, чем в контрольном варианте (табл. II). В опыте с сортом люпина Союз нитрогеназная активность клубеньков, образованных штаммом САЭЗ была в 1,3-1,5 раза выше, чем у клубеньков, образованных штаммом-стандартом. В связи с более ранним образованием и функционированием клубеньков происходит увеличение периода активной азотфиксации до 85-90 дней. Это способствовало увеличению урожая зеленой массы растений на 60-90 ц/га, что на 13-20% больше по сравнению с вариантом, где использовали производственный штамм.

Таблица II

Эффективность симбиоза при инокуляции новыми штаммами клубеньковых бактерий гороха и люпина (полевой опыт, 1988 г., п. Глеваха)

Штаммы	Образование клубеньков	дни после посева	масса, мг	Нитрогеназная активность, фаза бутонизации	Средний урожай, ц/га	Прибавка урожая к штамму-стандарту, %
Горох с. Неосыпайщийся						
Штамм-стандарт 250а	II		17,0±0,4	6,86±0,01	27,0	-
MI	7		19,6±0,4	9,32±0,03	28,4	5,2
M2	6		23,4±0,6	11,00±0,02	31,8	17,0
НСР <sub>05</sub>					1,25	
Люпин с. Союз						
Штамм-стандарт 333а	14		20,0±0,2	6,04±1,08	500,0	-
САЭ1	8		26,0±0,1	7,01±0,90	566,0	13,2
САЭ2	9		23,0±0,4	6,09±0,32	571,9	14,4
САЭ3	8		30,0±0,5	8,07±0,30	598,7	19,7
НСР <sub>05</sub>					44,09	

Сравнительный анализ структуры урожая зерна люпина сорта Мартин 2 при инокуляции новыми (САФ1, САФ2, САФ3) и исходными штаммами свидетельствует о том, что по всем показателям опытные растения превосходят свои контрольные варианты (табл.12). Так, в зависимости от особенностей штамма количество бобов на опытных растениях увеличилось на 20-70%, урожаем семян на 15-30%, масса 1000 семян - на 6-12%.

Данные, полученные в производственном опыте (Любашивский р-н Волинской обл., 1990 г.), подтвердили результаты вегетационных и полевого опытов и показали, что обработка семян люпина сорта Припятский новыми штаммами способствовала более раннему образованию клубеньков на корнях, повышенной азотфиксирующей активности и продуктивности растений. Прибавка урожая семян при инокуляции штаммами САФ2 и САФ3 по сравнению с вариантом без инокуляции составила 23-25%, а по сравнению с производственным штаммом - 15-18%.

Аналогичные результаты получены при изучении симбиотических взаимоотношений растений гороха с новыми штаммами клубеньковых бактерий М1 и М2.

Как видно из данных табл.11, клубеньки на корнях гороха, инокулированного штаммом М2, появились уже на 6-й день после всходов, тогда как в контрольном варианте на 9-11-й день, причем в этот период в опытном варианте масса клубеньков была больше, чем в контроле.

Определение нитрогеназной активности клубеньков гороха сорта Неосыпавшийся, инокулированного штаммом М2, показало, что она в 1,5-2 раза выше, чем в контроле. В зависимости от сорта и сроков проведения опытов инокуляция гороха новыми штаммами способствовала увеличению урожая зеленой массы на 8-21% по сравнению с контролем.

В условиях полевого опыта установлено, что в исследуемом варианте урожай зерна гороха составил 31,8 ц/га, а при инокуляции производственным штаммом - 27,0 ц/га, что на 17% меньше.

Таким образом, обработка семян люпина и гороха клубеньковыми бактериями, полученными по разработанному нами способу, способствовала повышению эффективности симбиоза при пониженных плюсовых температурах, что привело к увеличению урожая растений за счет prolongации периода и активности симбиотической азотфиксации.

Таблица 12

Структура урожая зерна люпина сорта Мартин 2 при инокуляции новыми штаммами клубеньковых бактерий

Штаммы	Сухая : надзем- : ная : масса, : г	Количество : во бобов : на рас- : тении	Масса : семян : одного : растения : г	Урожай : семян : на сосуд, : г	Количество : во семях : на сосуд, : г	Масса : 1000 : семян, : г
Контроль - без инокуляции	3,7±0,6	3,2±0,6	0,6±0,2	3,0±1,1	38,7±1,0	75,7±7,5
Исходный-1	3,9±1,9	2,1±0,2	0,8±0,3	3,3±1,1	36,3±1,1	88,6±5,4
САФ-1	4,5±0,8	3,6±0,2	0,9±0,5	4,4±0,2	47,0±1,5	94,3±3,2
Исходный-2	4,1±1,3	3,1±0,4	0,8±0,2	3,8±0,9	43,6±6,8	85,6±8,6
САФ-2	4,8±0,5	3,8±0,1	0,9±0,1	4,6±0,5	47,7±4,4	96,5±5,0
Исходный-3	4,5±1,7	3,3±0,7	0,8±0,3	4,0±1,6	43,0±15,5	93,3±6,6
САФ-3	5,1±0,9	4,1±0,1	0,9±0,2	4,6±1,2	45,0±4,0	100,9±2,0

На основании полученных данных штаммы САФ-3 и М2 депонированы во Всесоюзной коллекции микроорганизмов как активные азотфиксаторы и приняты в Географическую сеть опытов для конкурсных испытаний.

### ВЫВОДЫ

1. В результате изучения симбиотических взаимоотношений макро- и микросимбионта в бобово-ризобияльной системе на организменном, клеточном и молекулярном уровне выявлены основные физиолого-биохимические особенности взаимодействия бобовых растений (люцерна, маш, клевер, люпин, горох) с новыми штаммами клубеньковых бактерий, полученных нами методами экспериментальной селекции.
2. Разработана экспериментальная модель азотфиксирующей ассоциации на основе культуры ткани растений и клубеньковых бактерий для исследования физиолого-биохимических процессов, определяющих взаимоотношения партнеров на клеточном уровне.
3. Изучены закономерности появления азотфиксирующей активности в ассоциациях с культурой ткани бобовых (соя, клевер) и небобовых растений (пшеница, зернобобовые, табак). Установлено, что уровень азотфиксации является лабильным и изменяется в зависимости от специ-

фичности растительных метаболитов, состава среды, особенностей штаммов клубеньковых бактерий.

4. Впервые показано, что метаболиты небобовых растений, как и бобовых, могут индуцировать нитрогеназную активность у клубеньковых бактерий. Основными метаболитами, необходимыми для фиксации азота ризобиями, являются пентозы (арабиноза), дикарбоновые кислоты (сукцинат) и некоторые аминокислоты (лейцин, глутамины).
5. Сравнительное изучение ДНК, выделенных из нефиксирующих азот культуральных клеток ризобий и бактериоидов, показало, что они достоверно различаются по первичной структуре. При этом наблюдалось более низкое содержание Г-Ц пар (на 1,4%) в бактериоидной ДНК, что свидетельствует о взаимодействии макро- и микросимбионта на молекулярно-генетическом уровне.
6. В процессе исследований подтверждена наша гипотеза о возможности получения высокоактивных штаммов клубеньковых бактерий путем увеличения "дозы генов" азотфиксации. Экспериментально установлено увеличение азотфиксирующей активности у отдельных трансконъюгантов клубеньковых бактерий клевера, люцерны и маша в культуральных и симбиотических условиях. Показано, что эти трансконъюганты синтезируют белки нитрогеназного комплекса в большем количестве по сравнению с исходными штаммами.
7. Впервые показана возможность межродовой конъюгации у 5-ти видов ризобий (люцерны, клевера, маша, сои и гороха). Установлена гетерогенность полученных трансконъюгантов по отдельным физиолого-биохимическим (разжижение желатины, протеинизация молока, сбраживание сахарозы, глюкозы и др.), генетическим (изменение кинетики роста, повышение уровня устойчивости к антибиотикам, перестройки в плазмидном составе ДНК) и симбиотическим признакам (изменение уровня нодуляции, азотфиксации и эффективности симбиоза).
8. На основании проведенных исследований установлено, что ряд межродовых трансконъюгантов с улучшенными симбиотическими свойствами может быть использован в качестве исходного материала для получения новых штаммов клубеньковых бактерий с хозяйственно-ценными признаками. Создана коллекция трансконъюгантов клубеньковых бактерий клевера, люцерны и маша.

9. Значительное повышение продуктивности растений люцерны и улучшение ее физиолого-биохимических показателей может быть достигнуто путем применения новых штаммов ризобий, полученных нами на основе межродовых трансконъюгантов. В зависимости от почвенно-климатических условий и особенностей сортов люцерны прибавка урожая зеленой массы и семян при использовании этих штаммов составила 5-34%, возросло накопление белка на 2-4% и улучшилось его качество. При этом наблюдалось повышение содержания хлорофиллов *a* и *b* в листьях люцерны сорта Ярославна, а также связанных и свободных аминокислот в биомассе люцерны сортов Зайкевича и Ярославна при инокуляции новыми штаммами М4 и М6.
10. Впервые на организменном уровне изучены симбиотические взаимоотношения растений люпина и гороха с холодоустойчивыми штаммами клубеньковых бактерий при пониженных плюсовых температурах. Установлено, что обработка семян растений клубеньковыми бактериями, полученными по разработанному нами оригинальному способу, приводит к более раннему появлению всходов и образованию клубеньков на корнях бобовых растений, в результате чего происходит увеличение периода активной азотфиксации на 5-10 дней, что повышает продуктивность растений на 16-20% за счет симбиотической азотфиксации.

#### РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Новые искусственные азотфиксирующие ассоциации клубеньковых бактерий с культурой ткани бобовых и небобовых растений могут быть использованы для создания модельных систем при изучении взаимоотношений растений и микроорганизмов, в частности - ризобий на клеточном уровне, а также для создания новых азотфиксирующих ассоциаций.
2. Маркированные трансконъюганты (pRDI) клубеньковых бактерий клевера, люцерны и маша представляют ценный исходный материал для селекции новых штаммов клубеньковых бактерий с хозяйственно-ценными признаками и могут использоваться в научно-теоретических исследованиях и учебных целях.
3. Высокоэффективный штамм клубеньковых бактерий люцерны М4 рекомендуется для приготовления бактериального удобрения - ризоторфина под люцерну.

4. Для инокуляции семян бобовых культур, высеваемых ранней весной, ( $t + 6 - +12^{\circ}\text{C}$ ) рекомендуется использовать ризоторфин, приготовленный на новых "холодоустойчивых" штаммах САЭЗ - для люпина и М2 - для гороха.
5. При высеве бобовых растений рекомендуется использовать следующие комплементационные пары "сорт-штамм": люцерна с.Зайкевича - шт. М4, люцерна с.Ярославна - шт. М6, люпин с.Союз - шт. САЭЗ, горох с.Неосыпающийся - шт. М2.

Список работ, опубликованных по материалам научного доклада

1. Ничик М.М. Влияние бактериальных метаболитов на выделение некоторых витаминов группы В корнями гороха и репса // Физиология и биохимия культ. растений. - 1970. - 2, №3. - С.324-327.
2. Манорик А.В., Белима Н.И., Васильченко В.Ф., Гродзинская К.П., Даценко В.К., Деревянко С.И., Ничик М.М. Взаимоотношение растений и микроорганизмов в процессе корневого питания // Физиологические основы питания растений. - Киев: Наук. думка, 1971. - С.246-291.
3. Нічик М.М. Вплив метаболітів ризосферних мікроорганізмів на виділення вітамінів групи "В" кореневими системами деяких сільськогосподарських рослин // Мікробіологічний журнал. - 1971. - 33, №6. - С.726-727.
4. Крикунец В.М., Ничик М.М. Сравнительное изучение ДНК из культуральных и бактериоидных клеток *Rhizobium lupini* // У съезд Всесоюз. микробиологического общества: Тез. докл. (Ереван, 2-7 июня 1975 г.). - Ереван, 1975. - С.5-6.
5. Старченков Е.П., Желж В.М., Белима Н.И., Гродзинская К.П., Маличенко С.М., Ничик М.М. Изучение факторов, влияющих на синтез и активность нитрогеназного комплекса бактериоидов // У съезд Всесоюз. микробиологического общества. Тез. докл. (Ереван, 2-7 июня 1975 г.). - Ереван, 1975. - С.6-7.
6. Крикунец В.М., Нічик М.М. Про можливість впливу симбіозу на ДНК бульбочкових бактерій // Мікробіологічний журнал. - 1975. - 37, №6. - С.760-761.
7. Юркова Г.Н., Ничик М.М., Левенко Б.А., Старченков Е.П. Фиксация молекулярного азота клубеньковыми бактериями люпина в ассоциации с клетками табака и пшеницы // Докл. АН СССР. - 1976. - 230, №4. - С.1006-1008.

8. Нічик М.М., Дркова Г.Н., Старченков Ю.П., Левенко Б.О. Фіксація азоту асоціаціями бульбочкових бактерій і небобових рослинних клітин *in vitro* // УІ з'їзд Українського ботан. товариства.- Київ: Наукова думка, 1977.- С.61-62.
9. Маличенко С.М., Нічик М.М., Старченков Е.П. Экспериментальные доказательства локализации *nif*-оперона в микросимбионте при фиксации азота бобовыми растениями // Молекулярная биология.- 1978.- Вып.19.- С.78-82.
10. Нічик М.М. Создание *nif*-плазмид и перенос генов азотфиксации у микроорганизмов // Молекулярная биология.- 1979.- Вып.24.- С.46-50.
11. Нічик М.М., Швец Г.П. Влияние некоторых факторов на экспрессию *nif*-оперона при совместном культивировании *Rhizobium* с клетками растений *in vitro* // III Всесоюз. конф. "Культура клеток растений": Тез. докл.- Абовян, 1979.- С.44-45.
12. Нічик М.М., Старченков Е.П., Швец Г.П. Экспрессия *nif*-плазмиды RP41 в трансконъюгантах *Rhizobium* // IV Всесоюз. биохимический съезд. Тезисы научных сообщений.- Москва: Наука, 1979.- 2.- С.297-298.
13. Старченков Е.П., Маличенко С.М., Нічик М.М. Азотфиксирующая активность эффективных и неэффективных штаммов *Rhizobium* в условиях чистой культуры и симбиоза // IV Всесоюз. биохимический съезд: Тезисы научных сообщений.- Москва: Наука, 1979.- 3.- С.189-190.
14. Нічик М.М. Влияние клубеньковых бактерий гороха на урожай некоторых бобовых и небобовых растений в песчаной культуре // У съезд Украинского микробиологического общества: Тезисы докладов.- Киев: Наукова думка, 1980.- С.129.
15. Нічик М.М., Швец Г.П., Старченков Е.П. Нитрогеназная активность клубеньковых бактерий в ассоциации с изолированными клетками растений // У съезд Украинского микробиологического общества: Тезисы докладов.- Киев: Наукова думка, 1980.- С.130.
16. Нічик М.М. Получение трансконъюгантов *Rhizobium* с плазмидой RP41 // УІ съезд Всесоюз. микробиологического общества "На главных путях научно-технического прогресса": Тезисы докладов. (Рига, 25-29 марта 1980 г.).- Рига, 1980.-2.- С.16.

17. Старченков Е.П., Маличенко С.М., Ничик М.М. Экспрессия nif-оперона штаммов *Rhizobium lupini* различной активности in vivo и in vitro // Молекулярная биология. - 1980. - Вып. 26. - С.27-33.
18. Ничик М.М. Плазмиды рода *Rhizobium* // Молекулярная биология. - 1980. - Вып. 26. - С.36-45.
19. Ничик М.М., Старченков Е.П. Условия, определяющие азотфиксирующую способность клубеньковых бактерий в ассоциации с клетками растений // Известия АН СССР. Сер. биол. - 1981. - 5. С.691-697.
20. Ничик М.М. Нитрогеназная активность клубеньковых бактерий в культуре ткани бобовых и небобовых растений // Физиология и биохимия культурных растений. 1982. - 14. - №2. - С.143-147.
21. Ничик М.М. Азотфіксуюча здатність бульбочок конюшини в зв'язку з інокуляцією транскон'югантами *Rhizobium trifolii* B<sub>1</sub> (1000) NH // ІУ Український біохімічний з'їзд: тези доповідей. - Київ: Наукова думка, 1982. - 2. С.120-121.
22. Ничик М.М., Швець Г.П., Старченков Е.П. Перенос Р-плазмиды RP41 из *E.coli* JC5466 в *Rhizobium* методом конъюгации // Молекулярная биология. - 1982. - Вып.31. - С.73-76.
23. Ничик М.М. Азотфиксирующая активность маша при инокуляции трансконъюгантами *Rhizobium* sp. 3223 // УІ съезд Украинского ботанического общества: Тезисы докладов. - Киев: Наукова думка, 1982. - С.486-487.
24. Ничик М.М. Получение и изучение стабильности трансконъюгантов *Rhizobium* с плазмидой pRD1 // Биологическая фиксация молекулярного азота: Материалы VI Всесоюз. Бахов. коллоквиума. - Киев: Наук.думка, 1983. - С.116-118.
25. Ничик М.М. Характеристика симбиотических свойств трансконъюгантов *Rhizobium meliloti* Сг // Молекулярная биология. - 1983. - Вып. 35. - С.45-50.
26. Ничик М.М., Лисова Н.Е. Экспрессия генов плазмиды pRD1 в трансконъюгантах *Rhizobium* sp. 3223 // Молекулярная биология. - 1983. - Вып. 35. - С.50-57.
27. Ничик М.М., Лаушкина Л.И. Изучение трансконъюгантов клубеньковых бактерий клевера в свободной и симбиотической культуре и в ассоциации с бобовыми растениями // Биология и биохимия культурных

растений. 1983. - 15. № 1. - С.34-36.

28. Ничик М.М. Азотфиксирующие ассоциации культуры тканей бобовых и небобовых растений с клубеньковыми бактериями // Культура клеток растений и биотехнология: Тезисы докладов IV Всесоюзной конференции. - Кишинев: Штиинца, 1983. - С.179-180.
29. Старченков Е.П., Белима Н.И., Желюк В.М., Крикунец В.М., Лисова Н.Е., Маличенко С.М., Ничик М.М. Связывание молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиотических и культуральных условиях. - Киев: Наук. думка, 1984. - 224 с.
30. Ничик М.М., Яковец Л.М. Устойчивость к антибиотикам трансконъюгантов клубеньковых бактерий люцерны // VI съезд Украинского микробиологического общества: Тез. докл. (Донецк, июнь 1984). - Киев: Наук.думка, 1984. - 2. С.39.
31. Ничик М.М., Яковец Л.М. Азотфиксирующая активность люцерны при инокуляции трансконъюгантами *Rhizobium meliloti* // VI съезд Украинского микробиологического общества: Тез. докл. (Донецк, июнь 1984). - Киев: Наук.думка, 1984. - 2. - С.38-39.
32. Лисова Н.Е., Ничик М.М. Регуляция экспрессии *nif*- генов в неспецифических к азотфиксации системах // Молекулярная биология. - 1984. - Вып.36. - С.96-103.
33. Ничик М.М., Заец В.Н., Глуховский О.В., Яковец Л.М. Сравнительный анализ азотфиксирующей активности и плазмидного состава трансконъюгантов рода *Rhizobium* при интродукции плазмиды *pRD1* // Физиология и биохимия культурных растений. 1985. - 17. - № 6. - С.535-538.
34. Ничик М.М., Кругова Е.Д., Яковец Л.М., Старченков Е.П. Трансконъюганты *Rhizobium meliloti* Ch: белки и азотфиксирующая активность // Достижения микробиологии - практике: Тезисы VII съезда Всесоюзного микробиологического общества. - Алма-Ата: Наука, 1985. - 3. Генетика и геновая инженерия. - С.52.
35. Старченков Е.П., Маличенко С.М., Кругова Е.Д., Лисова Н.Е., Ничик М.М., Желюк В.М., Овруцкая З.Г. Индуцирующее действие растительных метаболитов на проявление нитрогеназной активности у *Rhizobium* / V Всесоюзный биохимический съезд: Тезисы стеновых сообщений. - Москва: Наука, 1986. - 2. - С. 339-340.

36. Ничик М.М., Яковец Л.М., Заец В.Н. Изучение трансконъюгантов рода *Rhizobium* в культуральных и симбиотических условиях // Регуляция физиологических функций растений. - Киев: Наукова думка, 1986. - С.162-168.
37. Ничик М.М., Кругова Е.Д., Яковец Л.М. Характеристика азотфиксации и фракционного состава белков трансконъюгантов *Rhizobium meliloti* при интродукции плазмиды pRD1 // Докл. АН УССР, Сер. "Б". - 1986. - II. - С.65-67.
38. Ничик М.М., Яковец Л.М. Основные черты ростовых процессов *Rhizobium aureus* Askb. в онтогенезе при инокуляции трансконъюгантами клубеньковых бактерий // VIII съезд Украинского ботанического общества. Тезисы докладов. - Киев: Наукова думка, 1987. - С.298.
39. Нічик М.М. Вплив плазмиди pRD1 на деякі біохімічні властивості бульбочкових бактерій люцерни // У Український біохімічний з'їзд: Тези доповідей. (Івано-Франківськ, вересень, 1987). - Київ, 1987. - 2. - С.117.
40. Ничик М.М., Яковец Л.М., Старченков Е.П. Кинетика роста и pH культуральной жидкости трансконъюгантов клубеньковых бактерий люцерны // Симбиотрофные азотфиксаторы и их использование в сельском хозяйстве: Тез. докл. Республ. конф. (Чернигов, 13-15 окт. 1987). - Киев, 1987. - С.23.
41. Петерсон Н.В., Ничик М.М., Коць С.Я. Влияние инокуляции клубеньковыми бактериями на аминокислотный состав листьев люцерны // Симбиотрофные азотфиксаторы и их использование в сельском хозяйстве: Тез. докл. Республ. конф. (Чернигов, 13-15 окт. 1987). - Киев: 1987. - С.49.
42. Кругова Е.Д., Ничик М.М., Яковец Л.М. Идентификация белков азотфиксирующих клеток клубеньковых бактерий // Микробиологический журнал. - 1988. - 50. № 2. - С.86-87.
43. Starchenkov E.P., Malichenko S.M., Nychick M.M., Krougova E.D. Physiological aspects of lupine symbiotic system functioning // Abstracts 5<sup>th</sup> International Lupin Conference, - Poznan, Poland; July, 1988. - B-9.

44. Ничик М.М., Яковец Л.М. Резистентность к антибиотикам транс-конъюгантов клубеньковых бактерий люцерны // Микробиологический журнал. - 1988. - 50. № 6. - С.6-10.
45. Коць С.Я., Ничик М.М., Петерсон Н.В., Романив О.В. Продуктивность люцерны в зависимости от инокуляции новыми штаммами клубеньковых бактерий // Физиология и биохимия культ.растений. - 1989. - 21, № 1. - С.17-21.
46. Ничик М.М., Кругова Е.Д., Старченков Е.П. Исследование белкового и плазмидного состава родительских штаммов и трансконъюгантов трех видов рода *Rhizobium* / Микробиологический журнал. - 1989. - 51. № 5. - С.3-7.
47. Ничик М.М., Кругова Е.Д., Гладун А.А. Особенности белкового и плазмидного состава исходных штаммов и трансконъюгантов рода *Rhizobium* / Молекулярные и генетические механизмы взаимодействия микроорганизмов с растениями: Сборник научных трудов. - Пушино, 1989. - С.49-51.
48. Ничик М.М., Воробей Н.А. Об изменении некоторых свойств клубеньковых бактерий клевера и люцерны, полученных методом межродовой конъюгации // УП съезд Украинского микробиологического общества: Тезисы докладов. (Черновцы, сентябрь 1989). - Киев - Черновцы, 1989. - 1. - С.25-26.
49. Петерсон Е.П., Ничик М.М. Влияние инокуляции на формирование фотосинтетического аппарата и урожай люцерны // УП съезд Украинского микробиологического общества: Тезисы докладов. (Черновцы, сентябрь 1989). - Киев - Черновцы, 1989. - 1. - С.226-227.
50. Коць С.Я., Петерсон Н.В., Ничик М.М., Старченков Е.П. Симбиотические свойства клубеньковых бактерий люцерны и подбор штаммов для производства ризоторфина // Совершенствование научного обеспечения средств химизации в земледелии: Тез.докл. Всесоюз. конф. (М., 13-15 июля 1989). - М., 1989. С.13-14.
51. Коць С.Я., Петерсон Н.В., Ничик М.М. Влияние новых штаммов клубеньковых бактерий на продуктивность люцерны // Микроорганизмы - стимуляторы и ингибиторы роста растений и животных: Тез.докл. Всесоюз. конф. (Ташкент, 3-5 окт., 1989). - 4.1. - Ташкент, 1989. - С.103.

52. Петерсон Н.В., Курьяк Е.К., Ничик М.М., Коць С.Я. Последствия инокуляции новыми штаммами клубеньковых бактерий на продуктивность люцерны // Бюллетень ВНИИСХМ. - Ленинград, 1989. - № 52. - С.12-14.
53. Ничик М.М., Яковец Л.М., Воробей Н.А., Ерко В.Н., Старченков Е.П. Многолетние исследования симбиотических свойств клубеньковых бактерий маша, полученных методом межродовой конъюгации // Микроорганизмы - стимуляторы и ингибиторы роста растений и животных: Тез. докл. Всесоюз. конф. (Ташкент, 3-5 окт., 1989). - 4.1. - Ташкент, 1989. - С.144.
54. Коць С.Я., Ничик М.М., Старченков Е.П. Влияние возрастающих доз азота на интенсивность азотфиксации, усвоение азота и продуктивность люцерны // Агробиохимия. - 1990. - № 6. С.11-17.
55. Петерсон Н.В., Черномырдина Т.А., Курьяк Е.К., Ничик М.М., Коць С.Я. Накопление хлорофиллов в листьях и урожай люцерны, инокулированной активными штаммами клубеньковых бактерий // Физиология и биохимия культ. растений. - 1990. - 22, № 2. - С.126-131.
56. Петерсон Н.В., Черномырдина Т.А., Курьяк Е.К., Ничик М.М., Коць С.Я. Влияние минерального и биологического азота на продуктивность люцерны // III съезд почвоведов и агрохимиков УССР: Тез. докл. - Харьков, 1990. - С.164-167.
57. Ничик М.М., Петерсон Н.В., Коць С.Я., Яковец Л.М., Воробей Н.А. Аминокислотный состав листьев люцерны при инокуляции новыми штаммами клубеньковых бактерий // Проблемы азотистого метаболизма: Тез. докл. межреспубл. науч. - техн. конф. - Волгоград, 1990. - С.38-39.
58. Коць С.Я., Ничик М.М., Старченков Е.П. Влияние подкормки возрастающими дозами минерального азота на интенсивность азотфиксации и продуктивность люцерны второго года вегетации // Физиология и биохимия культ. растений. - 1991. - 23. № 1. - С.34-38.
59. Старченков Е.П., Ничик М.М., Мандровская Н.М., Воробей Н.А., Яковец Л.М., Молдаван Н.И. Способ получения штаммов клубеньковых бактерий: А.с. СССР № 1577277, 1990.

60. Старченков Е.П., Ничик М.М., Петерсон Е.В., Яковец Л.М., Воробей Н.А., Коць С.Я. Штамм бактерий *Rhizobium meliloti* для получения бактериального удобрения под люцерну: Пол.реш. по заявке на А.с. СССР № 4855995/13.
61. Петерсон Н.В., Ничик М.М., Коць С.Я. Влияние минерального азота на эффективность симбиоза клубеньковых бактерий с люцерной // Микробиологический журнал. - 1991. - 53. № 1. - С.16-21.
62. Ничик М.М., Петерсон Н.В., Коць С.Я., Яковец Л.М., Воробей Н.А. Связанные и свободные аминокислоты листьев люцерны при инокуляции новыми штаммами клубеньковых бактерий // Физиология и биохимия культурных растений. - 1991. - 23. № 5. - С.439-446.
63. Ничик М.М., Яковец Л.М., Воробей Н.А., Петерсон Е.В., Коць С.Я. Симбиотические свойства клубеньковых бактерий люцерны, полученных методом межродовой конъюгации // Физиология и биох. культ. растений. - 1992. - 24. № 1. - С.41-47.
64. Матвійчук О.В., Нічик М.М., Коць С.Я. Вплив нових штамів бульбочкових бактерій на урожай насіння люпину // Биологическая фиксация молекулярного азота и азотный метаболизм бобовых растений: Тез.докл. республ. конф. (Тернополь, октябрь, 1991). - Киев, 1991. - С.45.
65. Ничик М.М., Мандровская Н.М., Яковец Л.М., Воробей Н.А., Старченков Е.П. Симбиотические свойства клубеньковых бактерий люпина и гороха, образующих клубеньки при пониженных температурах // Биологическая фиксация азота и азотный метаболизм бобовых растений. (Тернополь, октябрь, 1991). - Киев, 1991. - С.52.
66. Петерсон Н.В., Черномырдина Т.А., Курьяк Е.К., Ничик М.М., Коць С.Я. Влияние инокулирующих штаммов на рост органов люцерны // Биологическая фиксация молекулярного азота и азотный метаболизм бобовых растений (Тернополь, октябрь, 1991). - Киев. - 1991. - С.60.
67. Петерсон Н.В., Черномырдина Т.А., Курьяк Е.К., Ничик М.М., Коць С.Я. Рост органов люцерны в зависимости от симбиотической эффективности клубеньковых бактерий // Микроорганизмы в сельском хозяйстве: Тез.Докладов IV Всесоюз. научной конф.(Пушино, 20-24 января 1992) - Пушино, - 1992. - С.163-164.

68. Мандровская Н.М., Нічик М.М., Охрименко С.М., Старченков Е.П.  
Эффективность азотфиксации гороха при инокуляции устойчивыми к  
аммонии мутантами клубеньковых бактерий // М. в с/х.: Тез. докл.  
IV Вс. н. конф. (Пушино, 20-24 янв. 1992). - Пушино-1992. - С.129.
69. Нічик М.М., Мандровська Н.М., Воробей Н.А., Старченков Ю.П.  
Фізіолого-біохімічні властивості бульбочкових бактерій люпину  
та гороху, які утворюють бульбочки при знижених температурах.  
Тези доповідей VI Укр. біохім. з'їзду (травень, 1992, Київ) :  
Ч.Ш. - С.41-42.

51. Мухоморов В.М., Боровик Н.С., Мухоморов С.А., Боровик В.А., Боровик В.В. Свойства и свойства соединений, полученных при взаимодействии азота с органическими веществами // Доклады Академии наук СССР. - 1991. - № 1. - С. 1-4.
52. Мухоморов В.М., Боровик Н.С., Мухоморов С.А., Боровик В.А., Боровик В.В. Свойства и свойства соединений, полученных при взаимодействии азота с органическими веществами // Доклады Академии наук СССР. - 1991. - № 1. - С. 5-8.
53. Мухоморов В.М., Боровик Н.С., Мухоморов С.А., Боровик В.А., Боровик В.В. Свойства и свойства соединений, полученных при взаимодействии азота с органическими веществами // Доклады Академии наук СССР. - 1991. - № 1. - С. 9-12.
54. Мухоморов В.М., Боровик Н.С., Мухоморов С.А., Боровик В.А., Боровик В.В. Свойства и свойства соединений, полученных при взаимодействии азота с органическими веществами // Доклады Академии наук СССР. - 1991. - № 1. - С. 13-16.
55. Мухоморов В.М., Боровик Н.С., Мухоморов С.А., Боровик В.А., Боровик В.В. Свойства и свойства соединений, полученных при взаимодействии азота с органическими веществами // Доклады Академии наук СССР. - 1991. - № 1. - С. 17-20.

Подписано в печать 1.08.82.  
 Формат 60x84/16, Бум.офс. Офс.печ.  
 Усл.печ.л. 1,8, Уч.-изд.л. 2,0, Тираж 100 экз.  
 Зак. № 149, Бесплатно.

-----  
 Полиграфический участок Ин-та экономики АН Украины.  
 252011, Киев-11, ул.Павла Мирного, 26.

467678

Бесплатно.

AB 25.664

AB 25.664

22