

УДК 633.34:[579.64:631.46]

Продуктивность симбиоза при инокуляции сои различными препаративными формами ризобий и их Tn5-мутантами

Сытников Д. М.¹, Шейко Е. А.²

¹ Севастопольский государственный университет
Севастополь, Россия
sytnikov@list.ru

² Медицинская академия имени С. И. Георгиевского Крымского федерального университета
имени В. И. Вернадского
Симферополь, Россия

В условиях полевых испытаний изучена продуктивность симбиотических систем сои *Glycine max* L. (Merr) при инокуляции семян биопрепаратами на основе клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum*, полученных методами аналитической селекции (штаммы 6346 и 646) и транспозонового мутагенеза (Tn5-мутанты T118, T3-11 и T66). Показано, что в процессе изготовления бактериальных препаратов возможно использование отходов пищевой промышленности и кормопроизводства в качестве альтернативного источника углеводов. Перлит является технологичным носителем для изготовления бактериальных препаратов клубеньковых бактерий сои. Урожай семян, полученный в различных почвенно-климатических условиях, подтверждает целесообразность использования жидких бактериальных препаратов для предпосевной инокуляции сои. Наиболее эффективными, из изученных, оказались биопрепараты на твердом носителе, изготовленные с использованием гомологичного лектина. Максимальный урожай семян при этом достигал 37,4 ц/га. Внесение гомологичного лектина в бактериальную суспензию Tn5-мутантов T66 и T3-11 при изготовлении биопрепаратов достоверно увеличивало продуктивность сои. Результаты проведенных исследований указывают на возможность использования бактериальных препаратов на основе различных штаммов клубеньковых бактерий, в том числе полученных генетическими методами.

Ключевые слова: симбиоз, соя, клубеньковые бактерии, продуктивность, бактериальные препараты, гомологичный лектин.

ВВЕДЕНИЕ

Открытие микроорганизмов-азотфиксаторов привело к созданию в конце XIX века так называемых микробных удобрений. Однако развитие химизации, доступность и простота использования азотных удобрений на значительный период ослабили интерес к бактериальным препаратам. Экологизация аграрного производства требует изменения современных стратегий использования химических и биологических источников азотного питания растений. Проблема загрязнения окружающей среды и ограниченность невозобновляемых энергоресурсов ставят вопрос о возможностях максимального использования биологического азота.

Биологические препараты на основе азотфиксирующих микроорганизмов являются эффективным средством повышения продуктивности симбиоза (Сытников, 2012) и качества урожая при сохранении плодородия почв и соблюдении экологического баланса. Применение микробных препаратов позволяет регулировать численность и активность полезной микрофлоры в ризосфере растений и обеспечивать растения атмосферным азотом.

Цель представленной работы – изучить продуктивность симбиоза при инокуляции сои различными препаративными формами клубеньковых бактерий и их Tn5-мутантами при использовании гомологичного лектина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили симбиотические системы, состоящие из растений сои сорта Марьяна (*Glycine max* L. Merr.) и клубеньковых бактерий (*Bradyrhizobium japonicum*) производственного штамма 6346, штамма 646 и его активных Tn5-мутантов – T118, T3-11 и T66. Для получения штаммов-мутантов (Новикова и др., 1986; Simon et al., 1986) в качестве донора, несущего плазмиду pSUP2021 с транспозоном Tn5 использовалась кишечная палочка *Escherichia coli* S17-1.

Подготовку питательных сред, добавок и носителей для выращивания и инкубирования микроорганизмов производили по общепринятым в микробиологии правилам (Нетрусов и др., 2005). После хранения в условиях музея при температуре 4 °С физиологическую активность клубеньковых бактерий восстанавливали в реактивационной (маточной) среде. Для этого смыв с косяка переносили в жидкую маннитно-дрожжевую среду (Child, 1975) или среду с альтернативными источниками углеводов и выдерживали при постоянной аэрации и 28 °С в течение 5 суток.

В соответствии со схемами опытов суспензию клубеньковых бактерий (2×10^7 кл/мл) инкубировали с водными растворами гомологичного лектина семян сои (SBA) при температуре 28 °С в течение 20 часов в соотношении 1:1. Конечная концентрация используемого белка в бактериальной суспензии с титром клеток 1×10^7 составляла 0, 100 и 300 мкг/мл.

Для получения препаратов на твёрдом носителе в подготовленную бактериальную суспензию вносили глюкозу, патоку и кукурузный экстракт в качестве питательных добавок. Полученной смесью инокулировали пакеты из непрозрачной полипропиленовой плёнки, содержащие стерильный перлит (фракция ≤ 25 мкм), предварительно смешанный с дефекатом (3 %) и водой (50 мл/130 г). Препараты на твёрдом носителе использовали через 20–30 дней после изготовления. Перед посевом семена инокулировали бактериальной суспензией или смывом с бактеризованного перлита. В контрольных вариантах растения оставались неинокулированными.

Микрополевые и полевые опыты (Доспехов, 1985) проводили на серой или тёмно-серой оподзоленной почвах (рН 5,9–6,0) с содержанием легкогидролизуемого азота в пределах 10,4–12,7, гумуса – от 1,2 до 2,0 мг/100 мг почвы соответственно. Предшественником по севообороту были овощные культуры. Норма высева семян сои – 600 тыс. всхожих семян/га, учётная площадь делянок 2 или 5 м², расположение – рендомезированное, повторность во всех опытах – четырёхкратная. Полученные результаты обрабатывали статистически. В таблицах и в тексте представлены %, средние арифметические, стандартные ошибки и НСР. Достоверность разницы значений оценивали, используя 5 % уровень значимости ($P \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание бактериальных препаратов требует учитывать необходимость длительного поддержания жизнедеятельности бактерий в питательной среде или на определённом субстрате без ущерба для их активности, что способствовало бы более широкому их применению (Завалин и др., 2000). В процессе изготовления бактериальных препаратов нами успешно использовались отходы пищевой промышленности и кормопроизводства в качестве альтернативного источника углеводов. Перлит и вермикулит ранее были выбраны нами в качестве технологичных носителей для изготовления бактериальных препаратов (Коць и др., 2006). Перлит, используемый в представленных ниже исследованиях, также проявил себя как надёжный и технологичный носитель.

Известно, что лектин сои, вносимый в бактериальную суспензию для инокуляции семян, способен оказывать влияние на физиологические показатели и продуктивность симбиоза в концентрации от 2 до 300 мкг/мл, что было показано в условиях лабораторных, вегетационных и полевых испытаний (Маменко и др., 2003; Сытников и др., 2007).

Обычно биопрепараты хранятся различное по продолжительности время и используются в полевых неконтролируемых условиях, что требовало подбора оптимальной концентрации лектина для повышения их эффективности. Бактериальные препараты производятся в жидкой форме, а также на твёрдом носителе с использованием различных добавок, что, возможно, могло отразиться на свойствах вносимого лектина. В связи с этим обстоятельством, нами была выбрана максимальная из ранее изученных его доз – 300 мкг/мл бактериальной суспензии. В то же время, учитывая необходимость эффективного функционирования симбиоза и экономическую целесообразность применения лектина в качестве компонента бактериальных удобрений, меньшей исследуемой дозой мы избрали 100 мкг данного белка на 1 мл бактериальной суспензии.

Интегральным показателем влияния различных факторов на жизнедеятельность растений, в нашем случае – различных биопрепаратов и гомологичного белка, является их продуктивность. Урожай семян сои, полученный нами ранее в различных почвенно-климатических условиях, указывает на целесообразность использования жидких бактериальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином (Сытников и др., 2007). Так, внесение в бактериальную суспензию перед инокуляцией гомологичного лектина в концентрации 100 мкг/мл приводило к прибавке урожая в среднем на 24,9 %. Внесение 300 мкг/мл бактериальной суспензии повышало этот показатель в среднем на 10,9 % соответственно.

Наиболее эффективными, из изученных нами, оказались биопрепараты на твёрдом носителе, изготовленные с использованием гомологичного лектина в концентрации 100 мкг/мл (табл. 1). Урожай семян при этом составил 37,4 ц/га.

Таблица 1

Продуктивность симбиоза при инокуляции сои (*Glycine max* L. Merr) биопрепаратами (твёрдый носитель) клубеньковых бактерий (*Bradyrhizobium japonicum*, 6346), содержащими гомологичный лектин

Концентрация лектина, мкг/мл бактериальной суспензии	Урожай семян, ц/га*	Прирост урожая в сравнении с контролем	
		ц/га	%
0	30,6 ± 1,1	–	–
100	37,4 ± 1,1	6,8	22,2
300	36,0 ± 1,5	5,4	17,6
НСР _{0,05}	3,9		

Примечание к таблице. «*» – среднее по трём полевым опытам.

Высокая эффективность бактериальных препаратов на твёрдом носителе, очевидно, была обусловлена более благоприятными условиями используемой среды для ризобий и внесением питательных добавок. Можно было бы предположить, что в жидком препарате бактерии больше контактировали с лектином, однако, известно, что после 10 мин инкубирования ризобий с лектином агглютинирующая активность белка в суспензии уменьшается на 50–75 % и остаётся постоянной в течение последующих 20 ч независимо от вида лектина и штамма ризобий. Следовательно, в первые минуты инкубирования происходит частичное связывание лектина клубеньковыми бактериями, которое и оказывает влияние на метаболизм клетки, активируя её и подготавливая к кооперированию с растением-хозяином (Маліченко, 2002). Возможно, с этими процессами связан и характер влияния различных концентраций

лектина, вносимого в бактериальную суспензию, тем более, что значительная его часть, оставаясь несвязанной, может сохраняет свою активность.

Для создания эффективных симбиотических систем «бобовые растения – ризобии» необходим подбор не только растений, но и микросимбионтов. Последние получают с помощью различных методов, в том числе и генно-инженерных. Известно, что гены, контролирующие взаимодействие клубеньковых бактерий с макросимбионтом, не могут проявляться в чистой культуре, поэтому анализ симбиотических свойств бактерий возможен только в условиях симбиоза (Тихонович, Проворов, 1998).

В нашей работе препараты на твёрдом носителе готовили не только на основе штамма-эталона 6346, но и с использованием Tn5-мутантов, полученных методом транспозонового мутагенеза, и их исходного штамма 646. Из таблицы 2 следует, что продуктивность растений, инокулированных штаммами-транспозантами превышала (Т66 и Т3-11) аналогичные показатели их исходного штамма (646) или оставалась в пределах ошибки опыта (Т118). Внесение гомологичного лектина в бактериальную суспензию штамма-эталона 6346, а также Tn5-мутантов Т66 и Т3-11 достоверно увеличивало урожай семян сои (см. табл. 2).

Таблица 2

Продуктивность симбиоза при инокуляции сои (*Glycine max* L. Merr) биопрепаратами (твёрдый носитель) клубеньковых бактерий (*Bradyrhizobium japonicum*) и их Tn5-мутантов, содержащими гомологичный лектин

Штамм	Концентрация лектина, мкг/мл бактериальной суспензии	Урожай семян, ц/га	Прирост урожая в сравнении с штаммом-эталон	
			ц/га	%
6346 (эталон)	0	22,5 ± 0,7	–	–
	100	25,8 ± 1,1*	3,3	14,7
646 (исходный)	0	22,2 ± 0,8	– 0,3	– 1,3
	100	--	--	--
Т66 (Tn5)	0	26,1 ± 0,7*	3,6	16,0
	100	29,0 ± 0,7*	6,5	28,9
Т3-11 (Tn5)	0	23,6 ± 0,8	1,1	4,8
	100	26,4 ± 0,7*	3,9	17,3
Т118 (Tn5)	0	21,1 ± 0,9	– 1,4	– 6,2
	100	24,9 ± 0,7	2,4	10,7
НСР _{0,05}		2,5		

Примечание к таблице. «--» – показатель не определяли; «*» – разница достоверна в сравнении с штаммом-эталон без использования гомологичного лектина.

Полученные данные указывают на эффективность использования бактериальных препаратов, как жидких, так и изготовленных на твёрдом носителе. При изготовлении бактериальных препаратов возможно использование различных штаммов ризобий, в том числе полученных генетическими методами. Использование биопрепаратов на различных носителях, содержащих гомологичный лектин, даёт возможность повышать эффективность симбиотической системы сои и увеличивать её продуктивность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе изготовления бактериальных препаратов возможно использование отходов пищевой промышленности и кормопроизводства в качестве альтернативного источника углеводов. Перлит, использовавшийся нами в серии полевых испытаний, проявил себя как технологичный носитель для изготовления бактериальных препаратов клубеньковых бактерий сои.

Урожай семян сои, полученный в различных почвенно-климатических условиях, подтверждает целесообразность использования жидких бактериальных препаратов для предпосевной инокуляции. Наиболее эффективными оказались биопрепараты ризобий на твёрдом носителе (перлит), изготовленные с использованием гомологичного лектина.

Результаты проведённых исследований указывают на возможность применения бактериальных препаратов на основе различных штаммов клубеньковых бактерий, в том числе полученных генетическими методами.

Список литературы

- Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
- Завалин А. А., Духанина Т. М., Чистотин М. В. и др. Оценка эффективности микробных препаратов в земледелии. – М.: РАСХН, 2000. – 82 с.
- Коць С. Я., Сытников Д. М., Маличенко С. М., Воробей Н. А. Жизнеспособность и эффективность *Bradyrhizobium japonicum* при различных технологиях изготовления бактериальных препаратов // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. – Чернігов, 2006. – Вып. 4. – С. 39–50.
- Маличенко С. М., Даценко В. К., Маменко П. М., Коць С. Я. Участь лектинів специфічних і неспецифічних до бульбочкових бактерій бобових рослин у формуванні і функціонуванні азотфіксуючого симбіозу // Наукові записки Тернопільського педагогічного університету. – 2002. – № 3 (18). – С. 49–57.
- Маменко П. М., Маїченко С. М., Даценко В. К., Коць С. Я. Симбіотичні властивості і продуктивність сої залежно від концентрації її лектину в інокуляційній суспензії *Bradyrhizobium japonicum* 6346 // Физиология и биохимия культ. растений. – 2003. – Т. 35, № 3. – С. 215–221.
- Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии / [Ред. А. И. Нетрусов]. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.
- Новикова Н. И., Шарьпова Л. А., Симаров Б. В. Транспозоновый мутагенез у штамма СХМ1-105 *Rhizobium meliloti* // Молекулярная генетика. Микробиология и вирусология. – 1986. – № 8. – С. 32–36.
- Сытников Д. М. Биотехнология микроорганизмов-азотфиксаторов и перспективы применения препаратов на их основе // Biotechnologia Acta. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 34–45.
- Сытников Д. М. Эффективность биопрепаратов клубеньковых бактерий сои, модифицированных гомологичным лектином // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 304–310.
- Тихонович И. А., Проворов Н. А. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. – СПб.: Наука, 1998. – 194 с.
- Child J. J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. Association with non-leguminous plant cell cultures // Nature. – 1975. – Vol. 253, Iss. 5490. – P. 350–351.
- Simon R., O'Connell M., Labes M., Pühler A. Plasmid vector for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria // Methods Enzymol. – 1986. – 118. – P. 640–659.

Sytnikov D. M., Sheyko E. A. Productivity of symbiosis upon inoculation of soybeans with various preparative forms of rhizobia and their Tn5-mutants // Ekosistemy. 2021. Iss. 28. P. 76–81.

In field trials, the productivity of symbiotic systems of soybean *Glycine max* L. (Merr) was studied upon inoculation of seeds with biological preparations based on nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* obtained by analytical selection (strains 634b and 646) and transposon mutagenesis (Tn5-mutants T118, T3-11 and T66). It is proved that is possible to use waste from the food industry and animal feed production industry as an alternative source of carbohydrates for manufacturing bacterial preparations. Perlite is a technological carrier for the production of bacterial preparations of soybean nodule bacteria. The harvest of seeds obtained in various soil and climatic conditions confirms the justification of using liquid bacterial preparations for pre-sowing inoculation of soybean. The most effective of studied preparations are biopreparations on a solid carrier which was produced using homologous lectin. The maximum seed yield reached 37.4 kg/ha. The addition of homologous lectin to the bacterial suspension of Tn5-mutants T66 and T3-11 during the production of biopreparations significantly increased the productivity of soybean. The results of the research indicate the possibility of application of bacterial preparations based on various strains of nodule bacteria, including preparations produced by genetic methods.

Key words: symbiosis, soybean, nodule bacteria, productivity, bacterial preparations, homologous lectin.

*Поступила в редакцию 17.11.21
Принята к печати 20.11.21*