



УДК 579.262:575.224.4:581.132

© 2008

В. М. Василюк, Д. А. Кірізій, С. Я. Коць

Динаміка фотосинтетичної й азотфіксувальної активностей та продуктивність сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*

(Представлено академіком НАН України В. В. Моргуном)

Influence of the inoculation of soybean by new Tn5-mutants of Bradyrhizobium japonicum 646 on seed productivity and change of nitrogen fixing activity (NFA) and photosynthetic rate (PR) on the different stages of plant development were studied in vegetative experiment. Two types of dynamics of NFA and PR were shown in the symbiotic systems with different efficiencies. Tn5-mutants 21-2, 113, 35-2 and strain B. japonicum 646 belong to the first type with the maximum NFA and PR in budding with a following decrease of these indices in the phase of flowering. The second one (Tn5-mutant 17-2 and strain B. japonicum 634b) was characterized by the increase of NFA and PR during the observation period and had the highest absolute values at flowering. We have shown the enhance of the seed yield by 16.6 and 14.3%, respectively, in comparison with wild strain B. japonicum 634b in soybean inoculated with Tn5-mutants B. japonicum 21-2 and 17-2 which had the highest NFA among the researched mutants.

Ефективність процесу фіксації молекулярного азоту визначається взаємодією обох партнерів — макро- і мікросимбіонта, вплив яких на активність симбіозу істотно залежить від добору сортів рослин і комплементарних їм штамів бактерій [1]. Застосування нових біотехнологічних підходів сприяло створенню методів генетичної інженерії, які дають можливість з підвищеною частотою отримувати ризобії з контрастними симбіотичними характеристиками. Одним із них є транспозоновий мутагенез, що має ряд переваг у порівнянні із застосуванням традиційних методів у селекції мікроорганізмів [2].

У процесі еволюції бобово-ризобіального симбіозу між макро- та мікропартнерами виробилася добре скоординована система обміну речовин і енергії. Рослина-хазяїн використовує продукти азотфіксації, у той же час вона постачає вуглецеві сполуки до бактероїдів бульбочок, а також забезпечує надходження енергії для функціонування ферментного комплексу нітрогенази [3]. Тісний зв'язок азотфіксації і фотосинтезу показаний в роботах багатьох дослідників [4-6]. Проте питання, наскільки постачання бактероїдів енергією обмежує процес

азотфіксації, є складним і до кінця не вивченим. Відомо, що існує пряма кореляційна залежність між інтенсивністю фотосинтезу і вмістом пігментів у рослинах. Кількість хлорофілів може бути одним із опосередкованих показників ефективності симбіозу [7].

Отже, актуальним є дослідження можливості використання показників інтенсивності фотосинтезу в селекції бобових рослин щодо підвищення симбіотичної ефективності, яка, у свою чергу, визначається активністю функціонування основного нітрогеназного ферментного комплексу ризобій.

У зв'язку з вищесказаним метою нашого дослідження було з'ясування особливостей взаємозв'язку між азотфіксацією, фотосинтезом, накопиченням пігментів і продуктивністю різних за ефективністю симбіотичних систем, сформованих за участю рослин сої та Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum*.

Об'єктами дослідження були симбіотичні системи різної ефективності, створені за участю сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Мар'яна і Tn5-мутантів *B. japonicum* штаму 646. Мутанти повільнорослих бульбочкових бактерій були отримані в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України [8] за допомогою методу транспозонового мутагенезу з використанням плазмиди pSUP2021 [9].

Насіння сої (схожість 95%) 15 хв стерилізували 70%-м розчином етанолу, після чого промивали проточною водою. Мікроорганізми висівали на манітно-дріжджовий агар з наступним інкубуванням у термостаті протягом 8 діб при 28 °С. Бактерії з поверхні манітно-дріжджового агару змивали стерильною водою. Інокуляцію насіння здійснювали шляхом зволоження його протягом 1 год бактеріальною суспензією із концентрацією 10^8 кл./мл.

Рослини вирощували в умовах вегетаційного досліду по шість штук у 8-кг посудинах Вагнера, які попередньо стерилізували 20%-м розчином H_2O_2 , на промитому річковому піску, за природного освітлення та вологості субстрату 60% повної вологості. Джерелом мінерального живлення була суміш Гельрігеля, що містила 0,25 норми азоту. Як контроль використовували штам-стандарт *B. japonicum* 6346 і вихідний штам *B. japonicum* 646. Відбір зразків для аналізу проводили у фазах появи трьох справжніх листків, бутонізації і цвітіння.

Азотфіксувальну активність (АФА) визначали ацетиленовим методом [10]. Газову суміш аналізували на хроматографі "Chromatograf-504" (Польща). Активність нітрогенази вимірювали у мкмольях етилену, утвореного рослиною за годину.

Вміст пігментів визначали у повністю сформованих листках верхніх ярусів рослин у фазу бутонізації — початку цвітіння. Концентрацію хлорофілів і каротиноїдів вимірювали їх екстракцією із висічок листків диметилсульфоксидом [11] із наступною реестрацією коефіцієнтів поглинання на спектрофотометрі BIO RAD Smartspectm PLUS.

Інтенсивність фотосинтезу визначали за допомогою оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ПІАМ-5М (Росія), включеного за диференціальною схемою. Середню частину повністю сформованого листка сої без видимих ознак старіння розміщували в термостатованій камері з робочою площею 20 см². Густина потоку ФАР у камері становила 400 Вт/м², температуру підтримували на рівні 25 °С. Через камеру продували повітря із природною концентрацією CO₂ зі швидкістю 1 л/хв. Інтенсивність поглинання CO₂ на світлі вимірювали через 30–40 хв після розміщення листка у камері, при досягненні стаціонарного рівня.

Усі досліди проводили у 3–6-кратній біологічній повторності. Результати обробляли статистично [12].

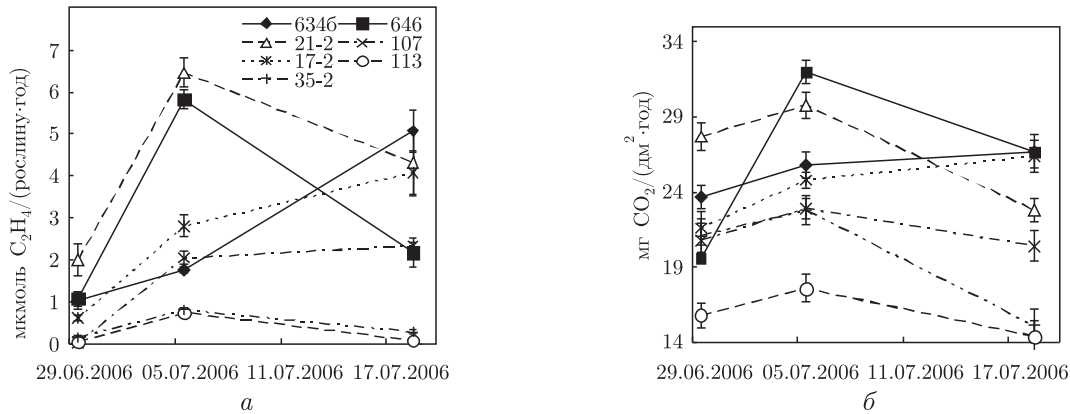


Рис. 1. Динаміка азотфіксувальної активності (а) і фотосинтезу листків (б) рослин, інокульованих різними штамами і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*, протягом фаз трьох справжніх листків, бутонізації та цвітіння

При дослідженні АФА рослин, інокульованих різними штамами та Tn5-мутантами ризобій, виявлені істотні відмінності за динамікою цього показника протягом вегетаційного періоду (рис. 1, а). За характером цієї динаміки досліджені генотипи можна умовно поділити на дві групи. До першої належать такі, в яких АФА збільшується від фази трьох справжніх листків до фази бутонізації, а у фазу цвітіння помітно зменшується. Тобто максимальні значення АФА у рослин цієї групи припадають на фазу бутонізації. До другої групи належать варіанти, у яких АФА збільшується від фази трьох справжніх листків до фази цвітіння (хоча і з різною швидкістю). Отже, значення цього показника максимальні у фазу цвітіння. Цікаво, що за характером динаміки АФА рослини, інокульовані штамами 646 і 6346, належали до різних груп — першої і другої відповідно, тоді як варіанти з інокуляцією Tn5-мутантами штаму 646 виявляли різну динаміку. У трьох із них (21-2, 35-2 і 113) вона була подібною до вихідного штаму (тобто відповідала першій групі), у одного (17-2) максимум спостерігався у фазу цвітіння (тобто разом із штамом 6346 утворював другу групу) і ще один (107) займав проміжне положення. В останньому варіанті інокуляції АФА рослин за період між бутонізацією та цвітінням змінилася мало.

Абсолютні значення АФА варіювали в широкому діапазоні. Найвищими вони були у рослин, інокульованих Tn5-мутантом 21-2, а найнижчими — у рослин, інокульованих Tn5-мутантами 35-2 і 113.

Інтенсивність фотосинтезу листків рослин у досліджений період вегетації також не була сталою, причому за характером її динаміки варіанти з інокуляцією різними Tn5-мутантами ризобій також можна поділити на дві групи — з максимумами у фази бутонізації та цвітіння (див. рис. 1, б). Номери варіантів, що входять до цих груп, повністю збігаються із зазначеними вище при аналізі динаміки АФА. Отже, виявлений у нашому досліді паралелізм у змінах цих двох найважливіших показників асиміляційної діяльності бобової рослини ще раз (але під новим кутом зору) свідчить про тісний зв'язок між азотфіксацією та фотосинтезом. При цьому варіанти, АФА яких протягом фаз бутонізації — цвітіння була найменшою, мали і найнижчу інтенсивність фотосинтезу. Очевидно, що характер динаміки АФА і фотосинтезу відображає особливості взаємодії мікро- і макросимбіонтів та функціонування бобово-ризобіальної симбіотичної системи в цілому. Виявлені нами два типи такої динаміки можуть бути обумовлені в першу чергу властивостями мікросимбіонта, а саме зміною його

нодуляційної здатності та АФА у часі. У свою чергу, інтенсивність фотосинтезу листків залежить від постачання сполуками азоту, необхідними для формування і функціонування пігментних комплексів, мембранних структур і ферментативної системи фотосинтетичного апарату. (Хоча можливий і зворотний зв'язок, про що буде згадано пізніше).

Це підтверджується результатами аналізу вмісту основних фотосинтетичних пігментів — хлорофілів і каротиноїдів — у листках сої на початку фази цвітіння (табл. 1). Добре видно, що рослини, інокульовані штамом 6346 і Tn5-мутантами 21-2 і 17-2, які мали у цю фазу найвищу АФА серед досліджених варіантів, містили найбільше хлорофілів і каротиноїдів у листках. У рослин, інокульованих штамом 646, вміст фотосинтетичних пігментів був помітно нижчим, що добре узгоджується зі зменшенням у них АФА в цей період (див. рис. 1). Рослини, інокульовані Tn5-мутантом 113, що мали найнижчу АФА протягом усієї вегетації, характеризувались утричі меншим вмістом хлорофілу в листках і найнижчою інтенсивністю фотосинтезу.

Зазначимо, що на початку вегетації, у фазу трьох справжніх листків, АФА рослин, інокульованих найбільш і найменш ефективними Tn5-мутантами ризобій, відрізнялася на порядок, тоді як різниця за інтенсивністю фотосинтезу у них становила лише 1,7 раза. Це обумовлено використанням рослинами “стартової” дози мінерального азоту, а отже, і меншою залежністю від симбіотичного апарату, який до того ж ще остаточно не сформований. У подальшому за нестачі азоту (внаслідок утворення малоефективного симбіозу) він реутилізується із нижніх, старіших, у більш молоді верхні листки, завдяки чому коливання рівня фотосинтетичної активності листків верхньої частини рослини не такі різкі, як АФА. Проте і за умови реутилізації з подальшим ростом рослин, інокульованих неефективними Tn5-мутантами ризобій, дефіцит азоту стає все більш напруженим, що призводить до зменшення інтенсивності фотосинтезу в порівнянні з початковою (див. рис. 1, б, Tn5-мутанти 35-2 і 113). На фоні загального гальмування росту, а також пожовтіння і відмирання листків нижніх ярусів зменщується кількість вуглекислого газу, що поглинається цілою рослиною. У результаті знижується її загальна біологічна і, особливо, зернова продуктивність (див. табл. 1). Так, насіннева продуктивність була найнижчою у рослин, інокульованих малоефективними Tn5-мутантами 35-2 і 113, а найвищою — за бактеризації 21-2 і 17-2. Останні перевищували контрольні показники на 16,6 і 14,3% відповідно. Рослини, інокульовані штамом-стандартом 6346 і вихідним штамом 646, не відрізнялися за насінневою продуктивністю.

Цікаво, що рослини, бактеризовані контрольними штамми і найефективнішими Tn5-мутантами, належали до різних за динамікою АФА і фотосинтезу груп: варіанти з інокуляцією

Таблиця 1. Вміст пігментів у листках (початок цвітіння) та насіннева продуктивність сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* 646

Варіант	Пігменти, мг/г сирової речовини		Насіннева продуктивність	
	Сума хлорофілів <i>a + b</i>	Каротиноїди	Маса насіння, г/посудину	% до штаму- стандарту 6346
<i>B. japonicum</i> 6346	3,40	0,47 ± 0,02	17,40 ± 0,15	100,00
<i>B. japonicum</i> 646	2,90	0,41 ± 0,03	17,54 ± 0,24	100,80
Tn5-мутант 21-2	3,19	0,48 ± 0,03	20,29 ± 0,39	116,61
Tn5-мутант 107	1,52	0,28 ± 0,02	14,41 ± 0,65	82,82
Tn5-мутант 17-2	3,38	0,52 ± 0,02	19,89 ± 0,99	114,31
Tn5-мутант 113	0,94	0,31 ± 0,02	6,63 ± 0,20	38,10
Tn5-мутант 35-2	2,23	0,27 ± 0,06	10,17 ± 0,41	58,45

штамом 646 і Tn5-мутантом 21–2 — до першої групи з максимумом у фазу бутонізації, тоді як варіанти з бактеризацією штамом 6346 і Tn5-мутантом 17–2 — до другої, із максимумом у фазу цвітіння. Отже, для досягнення високої насінневої продуктивності рослин виділені нами два типи динаміки азотфіксувальних і фотосинтетичних показників протягом усього періоду спостереження не мають переваги один перед одним. У симбіотичних системах із другим типом динаміки порівняно невисокі значення цих параметрів у першій половині вегетації компенсуються підвищенням АФА і фотосинтезу у фазу цвітіння, і вони “наздоганяють” рослини першої групи, у яких в цей час активність головних асиміляційних процесів вже зменшується. Зернова продуктивність рослин, інокульованих Tn5-мутантом 107, який у фази бутонізації — цвітіння виявив стабільну, але невисоку інтенсивність азотфіксації та фотосинтезу, була нижчою за контроль, проте істотно вищою, ніж у варіантах з інокуляцією неефективними Tn5-мутантами 113 і 35–2.

Якщо проаналізувати динаміку АФА та інтенсивності фотосинтезу рослин у варіантах, у яких насіннева продуктивність була найвищою — за інокуляції Tn5-мутантами 21–2 і 17–2, видно, що практично однаковий результат був досягнутий двома дещо різними шляхами. У першому випадку висока інтенсивність асиміляційної діяльності спостерігалась у першій половині вегетації (у фазах трьох справжніх листків і бутонізації) зі зменшенням у фазу цвітіння. У другому варіанті асиміляційна активність симбіотичної системи була порівняно невисокою, проте у фазу цвітіння рослини, інокульовані Tn5-мутантом 17–2, за АФА зрівнялися з варіантом 21–2 (із тенденцією до подальшого збільшення), а за інтенсивністю фотосинтезу помітно перевищували останній.

Можна припустити, що оптимальною для досягнення найвищої продуктивності бобово-ризобіальної симбіотичної системи була б така динаміка асиміляційної активності, яка б поєднувала риси обох типів. Тобто швидке зростання інтенсивності АФА і фотосинтезу у першу половину вегетації в період трьох справжніх листків — бутонізації (перший тип) та підтримання їх на високому рівні у другу половину (бутонізація — цвітіння, другий тип). Вирішення цього питання, на нашу думку, лежить у площині оптимізації взаємовідношень між симбіотичним та фотосинтетичним апаратом, а точніше — у змозі останнього забезпечити асимілятами як енергетичні потреби бактероїдів, що фіксують азот у кореневих бульбочках, так і процесів вегетативного і, особливо, репродуктивного росту і розвитку рослини. У літературі є дані про отримання ліній сої з пролонгованою азотфіксацією шляхом селекції на більшу тривалість фотосинтезу, що приводило до підвищення її насінневої продуктивності [13]. Не виключено, що падіння інтенсивності азотфіксації у рослин із першим типом динаміки обумовлене саме надто високою АФА у фазу бутонізації, енергетичне забезпечення якої відбувається за рахунок інтенсифікації роботи фотосинтетичного апарату. Із переходом рослин до цвітіння квітки та зав'язі, які мають найвищий пріоритет у постачанні асимілятами, переорієнтують їх розподіл на себе. Оскільки потенційні можливості фотосинтетичного апарату рослин обмежені, це спричинює зниження надходження асимілятів до бульбочок, а отже, й зменшення їхньої АФА. У свою чергу, знижується забезпеченість листків азотом, що до того ж поглиблюється його реутилізацією до генеративних органів, і зменшується інтенсивність фотосинтезу. Тобто для досягнення “ідеальної” динаміки асиміляційної активності для оптимізації продукційного процесу симбіотичних систем соя — *V. japonicum* потрібний добір комплементарних генотипів не тільки за ефективністю мікросимбіонта, але й за високою потенційною активністю фотосинтетичного апарату, здатного забезпечити асимілятами як бульбочки, так і процеси росту і розвитку рослин, особливо на генеративній стадії.

Таким чином, у дослідях з інокуляцією сої різними штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* виявлено два типи динаміки азотфіксувальної та фотосинтетичної активності рослин. Перший тип характеризувався максимумом АФА і фотосинтезу у фазу бутонізації і зменшенням цих параметрів у фазу цвітіння, тоді як для другого типу спостерігалось збільшення цих показників протягом усього дослідженого періоду вегетації із максимумом у фазу цвітіння. Два із семи досліджених варіантів (з інокуляцією Tn5-мутантами 21–2 і 17–2), в яких насіннева продуктивність рослин була більшою за контроль на 16,6 і 14,3%, виявляли відповідно перший і другий типи динаміки асиміляційної активності. Очевидно, подальший ріст продуктивності симбіотичних систем сої може бути досягнутий шляхом добору різних генотипів мікро- і макросимбіонтів для поєднання особливостей обох типів динаміки з підтримкою високої АФА і фотосинтезу в генеративну фазу розвитку. Необхідною умовою такого поєднання є висока потенційна активність фотосинтетичного апарату рослин та гальмування старіння листків після цвітіння.

1. Патика В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В та ін. Біологічний азот. – Київ: Світ, 2003. – 424 с.
2. Симаров Б. В., Аронштам А. А., Новикова Н. И. и др. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий. – Ленинград: Агропромиздат, 1990. – 192 с.
3. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под. ред. Г. Спайнка, А. Кондороди, П. Хукаса. – Ст.-Петербург, 2002. – 563 с.
4. Романов В. И., Алисова С. М., Тихонович И. А. и др. Фотоассимиляты в клубеньках гороха, различающегося по интенсивности азотфиксации // Прикл. биохимия и микробиология. – 1985. – **21**, № 2. – С. 228–233.
5. Vance C. P., Heichel G. H. Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation? // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1991. – **42**. – P. 373–392.
6. Сытников Д. М., Коць С. Я., Маличенко С. М., Киризий Д. А. Интенсивность фотосинтеза и лектиновая активность листьев сои при инокуляции ризобиями совместно с гомологичным лектином // Физиология растений. – 2006. – **53**, № 2. – С. 189–195.
7. Антипчук А. Ф., Канцелярук Р. М., Рангелова В. Н. и др. Связь между показателями фотоассимиляционной активности бобовых растений и их симбиотической азотфиксацией // Микробиол. журн. – 1990. – **52**, № 6. – С. 49–53.
8. Маличенко С. М., Воробей Н. А., Даценко В. К., Коць С. Я. Одержання та первинний скринінг за симбіотичними властивостями транспозантів бульбочкових бактерій сої // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин: Матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. до 90-річчя від дня народження проф. О. Ф. Михайлова. – Дніпропетровськ: ДНУ, 2005. – С. 32–33.
9. Simon R., Priefer U., Pühler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria // Biotechnology. – 1983. – **1**, No 11. – P. 784–791.
10. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – **43**, No 8. – P. 1185–1207.
11. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // Ibid. – 1994. – **144**. – P. 307–313.
12. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. – Москва: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
13. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под. ред. И. А. Тихоновича, Н. А. Проорова. – Ст.-Петербург: Наука, 1998. – 194 с.

Інститут фізіології рослин
і генетики НАН України, Київ

Надійшло до редакції 24.04.2007