



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62819 (13) A

(51) 7 G05F11/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ СИМБІОТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ СОЇ

1

2

(21) 2003065694

(22) 19 06 2003

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.

(72) Кириченко Олена Василівна, Титова Людмила
В'ячеславівна, Коць Серпій Ярославович(73) ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб підвищення симбіотичних властивостей

бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* 6346 передбачає попередню обробку бактеріальної суспензії штаму 6346 екзометаболітами, основну частину яких складають позаклітинні екзополісахариди і білок, а обробку проводять шляхом змішування у співвідношенні 1:1 бактеріального інокуляту штаму 6346 (10^7 кл/мл) з надосадовою рідиною штаму 6346, яку отримано після центрифугування культури ризобій при 60000 g протягом 30 хвилин

Винахід відноситься до сільськогосподарської мікробіології, зокрема, до біотехнології, а саме до підвищення симбіотичних властивостей бульбочкових бактерій сої при утворенні соєво-ризобіальної азотфіксуючої системи

Відомо, що продуктивність бобових рослин визначається ефективністю їх симбіозу з бульбочковими бактеріями. Підвищити ступінь реалізації симбіотичного потенціалу бобово-ризобіальних систем можна за допомогою різних чинників, зокрема метаболітів мікробного походження, які приймають участь у процесі бульбочкоутворення (Косенко Л.В., Антипчук А.Ф., Рангелова В.Н. Влияние экзополисахаридов на формирование и эффективность симбиоза растений гороха с гомотогичными клубеньковыми бактериями // Микробиология — 1995 — 64, №2 — С 205-210)

Задача нашого винаходу полягає у підвищенні симбіотичних властивостей (бульбочкоутворюючої здатності та азотфіксуючої активності) бульбочкових бактерій сої штаму *Bradyrhizobium japonicum* 6346

Поставлена задача вирішується тим, що передбачає передінокуляційну обробку бактеріальної суспензії *Bradyrhizobium japonicum* 6346 (10^7 кл/мл) екзометаболітами (ЕМ) штаму 6346, основну частину яких складають позаклітинні екзополісахариди (19,7 мг/мл) і білок (60,0 мг/мл), а обробку проводять

шляхом змішування у співвідношенні 1:1 бактеріального інокуляту штаму 6346 із надосадовою рідиною (супернатантом) штаму 6346, яку отримано після центрифугування культури ризобій при 60000g протягом 30 хвилин

Ефективність способу, що пропонується, підтверджується експериментальними результатами

Об'єктами дослідження були рослини сої сорту Мар'яна селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та бульбочкові бактерії сої *Bradyrhizobium japonicum* 6346, які утворюють на коренях рослин азотфіксуючі бульбочки

Бульбочкові бактерії вирощували на манітно-дріжджовому агарі протягом 10 діб. Екзометаболіти ризобій отримували шляхом центрифугування клітинної суспензії при 60000g протягом 30 хвилин і збирали супернатант, яким обробляли бактеріальний інокулят у співвідношенні 1:1

Сумішню суспензії бактерій з екзометаболітами інокулювали дводобові проростки сої і висаджували у посудини з піщаним субстратом. Дослідний варіант порівнювали з абсолютним контролем (обробка проростків водою) і моноінокуляцією штамом 6346 без додаткового внесення екзометаболітів штаму 6346. У досліді оцінювали бульбочкоутворюючу здатність ризобій, нитрогеназну активність кореневих бульбочок і ефективність симбіозу. Результати представлені в таблицях 1-3

(13) A

(11) 62819

(19) UA

Таблиця 1

Формування симбіотичного апарату у рослин сої сорту Мар'яна при використанні ЕМ

Варіант	I		II		III	
	Кількість бульбочок на рослині					
	шт	%	шт	%	шт	%
Контроль (вода)	0,0±0,0	-	0,0±0,0	-	16,7±1,6	-
6346	4,7±0,8	100	19,8±2,0	100	44,3±3,8	100
6346+ЕМ ₆₃₄₆	9,8±1,0	209	28,5±1,3	143	71,7±9	162

Примітка ЕМ - екзометаболіти. Рослини у фазі розвитку I – примордального - першого справжнього листка, II - двох пар справжніх листків, III - бутонізації

Отримані результати свідчать, що кількість бульбочок, утворених на коренях сої при інокуляції проростків штамом 6346 із додатковим внесенням в інокулянт екзометаболітів штаму 6346 була максимальною як на початку розвитку рослин (9,8 та 28,5 бульбочок), так і в фазу бутонізації (71,7 бульбочок) (табл. 1)

Комплексний інокулянт, який складається із специфічного сої штаму 6346 з екзометаболітами даного штаму, виявився ефективнішим за показником бульбочкоутворення у порівнянні з моноінокуляцією штамом 6346 у два рази на початку періоду утворен-

ня бульбочок та на 62%-у фазу бутонізації рослин

Отже, додаткове внесення до штаму-інокулянту екзометаболітів даного штаму, основну частину яких складають позаклітинні екзополісахариди і білок, підсилює вірулентність і бульбочкоутворюючу здатність мікросимбіонту

Вивчення нитрогеназної активності кореневих бульбочок сої показало (табл. 2), що обробка бактеріальної суспензії екзометаболітами сприяла збільшенню показника загальної азотфіксувальної активності у фазу бутонізації рослин майже вдвічі порівняно з моноінокуляцією штамом 6346

Таблиця 2

Загальна нитрогеназна активність кореневих бульбочок сої

Варіант	Фаза розвитку трьох пар справжніх листків		Фаза бутонізації	
	Мкмоль C_2H_4 / на рослину за годину	%	Мкмоль C_2H_4 / на рослину за годину	%
Контроль (вода)	0,0±0,0	-	4,4 ±0,5	-
6346	2,3±0,1	100	15,3±1,1	100
6346+ЕМ ₆₃₄₆	7,0±0,3	304	30,4±2,9	198

Примітка ЕМ-екзометаболіти

Аналізуючи показники ефективності соєво-ризобіального симбіозу, зокрема розвиток надземної частини рослин, встановлено (табл. 3), що інокуляція сої сумішшю штаму 6346 із екзометаболітами при-

звела до суттєвого збільшення вагових показників рослин у фазу бутонізації, які відрізнялись від рослин у варіанті з моноінокуляцією штамом 6346 на 81%

Таблиця 3

Ефективність соєво-ризобіального симбіозу (фаза бутонізації)

Варіант	Маса надземної частини					
	Г					%
	I	II	III	IV	Середня	
Контроль (обробка водою)	7,5	9,5	5,7	7,3	7,5±0,8	100
6346	9,6	6,1	10,8	9,8	8,8±1,0	117/100
6346+ЕМ ₆₃₄₆	18,1	16,8	13,3	15,5	15,9±1,0	212/181

Примітка ЕМ - екзометаболіти. В чисельнику - % за відношенням до абсолютного контролю, в знаменнику - % за відношенням до моноінокуляції штамом 6346

Таким чином, запропонований нами спосіб передпосівної обробки бактеріального інокуляту штаму 6346 його екзометаболітами забезпечує посилення бульбочкоутворюючої здатності мікросимбіонту у фазу бутонізації на 62%, нитрогеназної активності

кореневих бульбочок у 2 рази та призводить до більшої активізації процесу формування зеленої маси (на 81%) порівняно з варіантом, де застосовували лише традиційну інокуляцію стандартним штамом