

молекулярному анализу указанные четыре штамма являются межвидовыми гибридами и содержат более полный ядерный геном дрожжей *S. cerevisiae* и частичный геном *S. bayanus*. Кариотипический анализ более 70 штаммов дрожжей-сахаромицетов, изолированных из виноделия во Франции позволил обнаружить пять штаммов, имеющих в своем кариотипе более 20 хромосомных полос. Согласно рестриктазному анализу девяти ядерных генов четыре из этих штаммов являются межвидовыми гибридами *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, а пятый штамм содержит геномы трех видов *S. cerevisiae* x *S. bayanus* x *S. kudriavzevii*.

Таким образом, нами обнаружены естественные межвидовые гибриды, объединяющие геномы как двух, так и трех биологических видов. Особенность межвидовых гибридов дрожжей *Saccharomyces* – сочетание в одном организме геномов с очень низкой гомологией, что может приводить к эффекту гетерозиса при межвидовых скрещиваниях. В последние годы в мире отмечается резкое увеличение производства плодово-ягодных вин. В Белоруссии и России основным сырьем для выпуска плодово-ягодных вин является яблочное и черносмородиновое сусло. Обнаруженные на ягодах черной смородины в Белоруссии гибридные штаммы обладают хорошими физиолого-биохимическими характеристиками и полученные с их помощью вина отличаются также хорошими органолептическими свойствами [4].

1. G.I. Naumov, S.A. James, E.S. Naumova, E.J. Louis, I.N. Roberts. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2000. - V. 50 - P. 1931-1942.
2. C.P. Kurtzman. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulospora* // FEMS Yeast Res. - 2003. - V. 4. - P. 233-245.
3. E.S. Naumova, G.I. Naumov, I. Masneuf-Pomarede, M. Aigle, D. Dubordieu. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae* // Yeast. - 2005. - V. 22. - P. 1099-1115.
4. И.М. Колесник, М.В. Жолудева, Н.Н. Мартыненко, И.М. Грачева. Новые штаммы для плодово-ягодного виноделия. Сахаромицеты из ягод черной смородины Западной Беларуси // Виноделие и Виноградарство - 2004. - № 3. - С. 15 – 17.

ФОРМИРОВАНИЕ СИМБИОЗА РАСТЕНИЯМИ ЛЮПИНА И Tn5- МУТАНТАМИ *BRADYRHIZOBIUM SP. (LUPINUS)*

С.В. Омельчук, В.Н. Мельник, Л.М. Михалкив, Н.Н. Мельникова, С.Я. Коць

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина
azot@ifrg.kiev.ua*

Исследование бобово-ризобияльных азотфиксирующих систем, обогащающих почву доступными для растений формами азотных соединений, которые являются одним из ведущих факторов, определяющих урожайность культурных растений, имеет большое значение для сельскохозяйственного производства. Развитие современных методов молекулярной биологии и генной инженерии, в частности, использование транспозонного мутагенеза позволяет получить формы микроорганизмов, которые способствуют решению ряда фундаментальных научных вопросов, связанных с изучением процессов, происходящих при установлении симбиотических взаимоотношений бобовых растений и клубеньковых бактерий [1]. Результаты этих исследований могут быть использованы для создания наиболее эффективных азотфиксирующих систем, которые найдут применение в сельскохозяйственном производстве. Одним из первых этапов изучения мутантных клубеньковых бактерий является определение их симбиотических характеристик, а также влияния этих микроорганизмов на эффективность формирования бобово-ризобияльного симбиоза. Целью работы было исследовать эффективность формирования и функционирования бобово-ризобияльного симбиоза у растений люпина при интродукции в

их ризосферу Tn5-мутантов *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* в условиях почвенной культуры в мелкоделяночных экспериментах.

Использовали ранее полученные Tn5-мутанты штамма *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168, а также растения желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) сорта Круглык. Микроорганизмы выращивали на маннито-дрожжевой агаризованной среде на протяжении 8–10 суток при 28 °С. Бактериальную суспензию готовили путем смыва бактериальной биомассы с поверхности среды стерильной водопроводной водой. Бактериальная нагрузка составляла 10⁶ ризобий на семя. Исследование эффективности формирования и функционирования бобово-ризобиального симбиоза у растений люпина при внесении в их ризосферу мутантов гомологичных клубеньковых бактерий проводили на опытных участках Института физиологии растений и генетики НАН Украины (Киевская область, серая супесчаная почва). Семена стерилизовали 16 % раствором перекиси водорода с последующим отмыванием их на протяжении часа водопроводной водой. Семена выдерживали час в бактериальной суспензии и высевали. Образцы отбирали в разные фазы развития растений люпина. Оценивали количество клубеньков и массу надземной части растений. Азотфиксирующую активность бобово-ризобиального симбиоза определяли ацетиленвостанавливающим методом [2]. Семена люпина контрольного варианта инокулировали бактериальной суспензией штамма *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168. Результаты статистически обрабатывали. В каждом варианте анализировали 20 растений.

Экспериментальные данные показали (таблица), что при внесении в ризосферу люпина исследуемых Tn5-мутантов штамма *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 количество сформированных на корнях клубеньков в фазу бутонизации растений достоверно увеличивалось почти во всех вариантах. В случае использования для инокуляции семян люпина мутантов 168-1, 168-9 и 168-54 активность клубенькообразования существенно не отличалась от таковой исходного (родительского) штамма *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168.

Таблица

Влияние Tn5-мутантов штамма *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 на клубенькообразование, азотфиксирующую активность симбиоза и формирование надземной массы люпина (бутонизация)

Штамм <i>Bradyrhizobium sp. (Lupinus)</i> 168 и его Tn5-мутанты	Количество клубеньков, шт	Азотфиксирующая активность, мкмоль C ₂ H ₄ /(г клубеньков · час)	Надземная масса, г/растение
168	14,6 ± 1,8	13,9 ± 1,4	6,7 ± 0,5
168-1	14,6 ± 2,4	19,2 ± 2,0	5,6 ± 0,3
168-4	20,6 ± 2,9	19,7 ± 0,9	5,3 ± 0,6
168-9	15,6 ± 2,1	18,6 ± 1,0	5,7 ± 0,4
168-14	20,5 ± 1,9	20,8 ± 1,1	5,4 ± 0,3
168-19	19,5 ± 1,9	19,3 ± 0,8	7,1 ± 0,7
168-21	20,8 ± 1,9	32,9 ± 1,2	6,5 ± 0,5
168-52	22,4 ± 3,3	21,4 ± 1,6	5,1 ± 0,6
168-54	16,9 ± 1,9	28,6 ± 2,7	5,8 ± 0,5
168-57	18,6 ± 1,1	29,9 ± 3,6	7,8 ± 0,5

Позже, во время цветения растений, формирование симбиотического аппарата продолжалось только в варианте, где использовали транспозоновый мутант 168-9, в то время

как в других вариантах, включая и контрольный, максимальные показатели активности клубенькообразования были получены в фазу бутонизации растений. Это может свидетельствовать о некотором замедлении процесса формирования симбиоза. Полученные в опытных вариантах данные по уровням клубенькообразования могут определяться рядом условий, которые включают симбиотические и другие свойства генетически модифицированных микроорганизмов, влияние биотических и абиотических факторов окружающей среды. Так, было показано, что инокуляция люцерны транспозоновыми мутантами *Sinorhizobium meliloti* вызывала усиление ростовой активности популяций ризосферных бактерий [3]. С другой стороны, в присутствии ризосферных микроорганизмов могут изменяться некоторые физиологические характеристики ризобий [4]. Бобово-ризобиальный симбиоз у люпина, сформированный при внесении в ризосферу растений мутантов 168-21, 168-54 и 168-57, характеризовался более высокими показателями удельной азотфиксирующей активности в фазу бутонизации по сравнению с контролем (таблица).

В фазу цветения азотфиксирующая активность клубеньков уменьшалась приблизительно в 6–10 раз, тогда как в фазу формирования бобов в ряде случаев наблюдалось незначительное усиление процессов восстановления азота. При этом наиболее существенное увеличение азотфиксации было отмечено в вариантах с использованием для инокуляции семян люпина мутантов 168-4, 168-9, 168-14. Необходимо отметить, что только мутант 168-57 способствовал увеличению массы надземной части люпина на протяжении всего периода вегетации растений (таблица). Таким образом, из всех исследуемых Tn5-мутантов штамма *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 наиболее перспективными с целью дальнейшего изучения их ростстимулирующей и метаболической активности, могут быть мутанты 168-9, 168-14 и 168-57.

1. Noel K.D.R., Forsberge L.E., Carlson R.W. Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris* // J. Bacteriol. - 2000. - V.182, N19. - P.5317-5324.
2. 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. – V.43. – P.1185-1207.
3. Da H.N., Deng S.P. Survival and persistence of genetically modified *Sinorhizobium meliloti* in soil // Appl. Soil Ecol. – 2003. – V.22, N 1. – P. 1-14.
4. Суховицкая Л.А., Мохорт Т.Г., Клышко Г.М. Выживаемость *Rhizobium* в бинарных популяциях с фосфатмобилизующими бактериями и некоторые критерии подбора ризобиально-фосфатмобилизующих композитов // Весці АН Беларусі. Сер. біял. – 1997. – №3. – С.12-16.

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ГЕНОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ (*SINORHIZOBUM MELILOTI*), ВОВЛЕЧЕННЫХ В КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОЗА С *MEDICAGO SATIVA*

О.П. Онищук, Е.П. Чижевская, О.Н. Курчак, Б.В. Симаров

ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

genet@yandex.ru

Клубеньковые бактерии (ризобии) – азотфиксирующие симбионты бобовых растений – играют ключевую роль в накоплении азота в природных экосистемах и агроценозах. Со стороны ризобий симбиотическая эффективность (СЭ) – способность повышать продуктивность инокулированных растений благодаря интенсивной фиксации N₂ – контролируется сложной системой генов, которая включает элементы как позитивного контроля (их инактивация в результате мутаций приводит к снижению или полной утрате СЭ), так и негативного контроля (их инактивация приводит к возрастанию СЭ). Ранее с использованием Tn5-мутационного скрининга в лаборатории генетики и селекции микроорганизмов ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии у клубеньковых бактерий люцерны (*S. meliloti*) была получена серия мутантов, превышающих по СЭ эффективные исходные