

РЕАЛІЗАЦІЯ АЗОТФІКСУВАЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛУ Tn5-МУТАНТІВ *Bradyrhizobium japonicum* У СИМБІОЗІ З РОСЛИНАМИ СОЇ

Н. А. Воробей
С. Я. Коць
П. М. Маменко

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

E-mail: n-vorobey@ukr.net

Отримано 29.01.2013

У результаті проведених досліджень серед Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* селекціоновано бульбочкові бактерії, які відрізнялися за інтенсивністю та динамікою нітрогеназної активності в симбіозі з рослинами сої. Інсерційну природу мутацій, що призводили до появи Km^R -форм *B. japonicum* зі зміненими симбіотичними властивостями, доведено з використанням полімеразної ланцюгової реакції. В умовах вегетаційних та дрібноділянкових дослідів Tn5-мутанти *B. japonicum* проаналізовано за симбіотичними показниками у різні фази онтогенезу сої сортів Аннушка, Васильківська, Мар'яна та Колбі, які належать до трьох груп сортової стиглості. Встановлено, що динаміка та інтенсивність асиміляції N_2 кореневими бульбочками сої залежала від генотипу мікросимбіонта, сорту та фази розвитку рослини-хазяїна. Tn5-мутанти *B. japonicum*, одержані із застосуванням плазмід рSUP5011::Tn5mob, були ефективнішими у симбіозі з ранньостиглими сортами сої Аннушка та Васильківська, а з використанням рSUP2021::Tn5 — із сортами сої Мар'яна та Колбі, вегетаційний період яких є більш тривалим. За результатами досліджень також відібрано Tn5-мутанти *B. japonicum* T66, T21-2, B-18 і B-20 із розширеним спектром комплементарності, які забезпечували інтенсивнішу азотфіксацію сої різних сортів у фазах бутонізації та бутонізації-початку цвітіння, що зумовлювало збільшення урожаю зерна порівняно із застосуванням штамів 646 та 6346. Розглядається стратегія створення полікомпонентних інокулянтів для сортів сої, що належать до різних груп стиглості на основі штамів ризобій із різною інтенсивністю та динамікою азотфіксувальної активності.

Ключові слова: *Glycine max*, бобово-ризобіальний симбіоз, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутанти.

Азотфіксувальний потенціал бобово-ризобіальних систем генетично детермінований і визначається комплементарністю генотипів фіто- і ризобіосимбіонтів [1–3]. У його основі лежить здатність бульбочкових бактерій відновлювати атмосферний азот до амонію і забезпечувати ним рослину-хазяїна, що є істотним джерелом її азотного живлення. Не є винятком у цьому відношенні й симбіоз *Glycine max* — *Bradyrhizobium japonicum*. Незважаючи на те, що сою порівняно недавно інтродуковано в Україні [4], її широко впроваджують у сільськогосподарське виробництво в різних ґрунтово-кліматичних зонах. У більшості ґрунтів зазвичай відсутні специфічні для сої бульбочкові бактерії, проте в місцях систематичного вирощування цієї культури формуються інтродуковані осередки ґрунтових популяцій відповідних ризобій [5]. Для утворення азотфіксувального симбіозу сої із бульбочкови-

ми бактеріями насіння перед посівом обробляють препаратами високоефективних штамів *B. japonicum*, що сприяє підвищенню врожаю рослин, вмісту протеїну в зерні, знижує собівартість продукції [6, 7]. Якість бактеріальних препаратів постійно удосконалюється модернізацією технології виробництва і заміною виробничих штамів ризобій на більш конкурентоздатні та ефективні у симбіозі з культивованими сортами сої [8, 9]. На цей час дослідницькі центри мають великі колекції бульбочкових бактерій сої, які постійно поповнюються [10]. Нові штами *B. japonicum*, одержані методом традиційної селекції, нерідко не забезпечують суттєвих переваг над існуючими виробничими [11], проте мають високий адаптивний потенціал, набутий внаслідок тривалого сапрофітного існування в ґрунтах. Їх доцільно використовувати як штами-реципієнти під час гібридизації та інсерційного мутаге-

незу з метою розширення генетичного фонду та відбору бульбочкових бактерій з поліпшеними господарсько-цінними властивостями [12–20].

Варіювання інтенсивності азотфіксації бобово-ризобіальних систем зумовлено переважно сортовими особливостями рослини-хазяїна, що призводить до відповідних коливань урожайності сої. Водночас різні штами ризобій одного виду у разі випробування на одному сорті рослини-хазяїна можуть суттєво відрізнятися за азотфіксувальною активністю [3, 21]. Тому в основу заходів із оптимізації симбіотичної азотфіксації має бути покладено координовану селекцію обох партнерів симбіозу: бактерій із високою азотфіксувальною активністю та бобових рослин, які раціонально витрачають продукти фотосинтезу на енергоємну реакцію відновлення молекулярного азоту до іону амонію та ефективно його асимілюють [22]. Це, по суті, біотехнологічна проблема, оскільки така селекція передбачає модифікацію генетичного апарату як бактерій, так і рослин методами молекулярної генетики та генної інженерії.

Метою роботи було вивчення симбіотичної азотфіксації сої та Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* із використанням різних сортів рослини-хазяїна та можливості її інтенсифікації доборою комплементарних генотипів макро- і мікросимбіонта.

Матеріали і методи

Досліди проводили із соєю *Glycine max* (L.) Merr. сортів, які належать до різних груп стиглості: ультрашвидкостиглий (вегетаційний період 75–80 днів) — сорт Аннушка — національний стандарт швидкостиглої групи сортів сої; середньоранній (вегетаційний період 101–119 днів) — сорт Васильківська; середньостиглий (вегетаційний період 130–135 днів) — сорти Мар'яна та Колбі. Сорти Аннушка — селекції ЧП НССФ «Соевий вік», Мар'яна та Васильківська — спільної селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, Селекційно-генетичного інституту НАА та Інституту землеробства НАА України, Колбі — канадської селекції Хайленд Сидс Томпсон ЛТД.

Насіння сої інокулювали бульбочковими бактеріями *B. japonicum* із колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України — високоефективними штамами 6346, 646 та Tn5-мутантами, які одержано внаслідок транспозонового мутагенезу штаму 646 *B. japonicum*, з використанням плазмід-век-

торів, що здатні переносити транспозон Tn5 до ризобіальної клітини: pSUP2021::Tn5 — T66, T3-11, T21-2, T9-2 і T17-2 та pSUP5011::Tn5mob — B-2, B-16, B-18, B-20, B-21 [12–14]. Мутанти відібрано за здатністю до репродукції на середовищі ТУ [23], збагаченому антибіотиками сульфатом канаміцину (Km) і сульфатом стрептоміцину (Str), кінцевою концентрацією відповідно 200 і 500 мкг/мл. Бульбочкові бактерії вирощували на манітно-дріжджовому агарі (МДА) [24] при 28 °С протягом 7–8 діб, кишкову паличку *E. coli* S17-1 — на середовищі LB [23] за 37 °С 1 добу.

ПЛР-аналіз проводили на ампліфікаторі Proteus (Великобританія), як описано раніше [25]. Праймери для ПЛР сконструювали за допомогою програми Primer-3 на структурну послідовність ділянки гена неоміцинофосфотрансфери Tn5 завдовжки 517 нуклеотидних пар [21, 25, 26]. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 0,7% -му агарозному гелі [21, 26].

Для проведення вегетаційних дослідів використовували пластикові посудини на 10 кг, простерилізовані 20% -м розчином H₂O₂. Рослини вирощували на річковому піску за 60% -ї вологості субстрату від повної вологості. Джерелом мінерального живлення була суміш Гельрігеля [27] з 0,25 н азоту (1 норма відповідає 708 мг Ca(NO₃)₂·4H₂O на 1 кг піску) та мікроелементами В, Мо і Fe. Насіння сої протягом 15 хв стерилізували 70% -м етанолом, промивали проточною водою та інокулювали 1 год суспензіями бульбочкових бактерій. У посудині вирощували по 8 рослин. Повторюваність варіантів у вегетаційних дослідах — 7-разова.

Дрібноділянкові польові досліди проводили на ділянці Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (ґрунт сірий, супіщаний, рН 5,9–6,0, вміст гумусу 1,2–1,5%, азоту 10,4–12,6, фосфору 8,8–10,1, калію 9,4–10,2 мг / 100 г ґрунту) (рис. 1 Б, В). У рядки завдовжки 1 м висівали по 50 насінням сої, бактеризованих різними Tn5-мутантами *B. japonicum*. Повторюваність варіантів у дослідах — 4-разова, розміщення — рендомізоване (рис. 1, Б, В).

Контролями слугували варіанти досліду з інокуляцією насіння сої штамами 646 (вихідний) і 6346 (виробничий) *B. japonicum* (рис. 1, А, Б, В).

Для приготування інокуляційних суспензій біомасу бактерій змивали з поверхні агаризованого середовища водою, суспендували. Титр суспензій дорівнював 10⁹ клітин/мл.

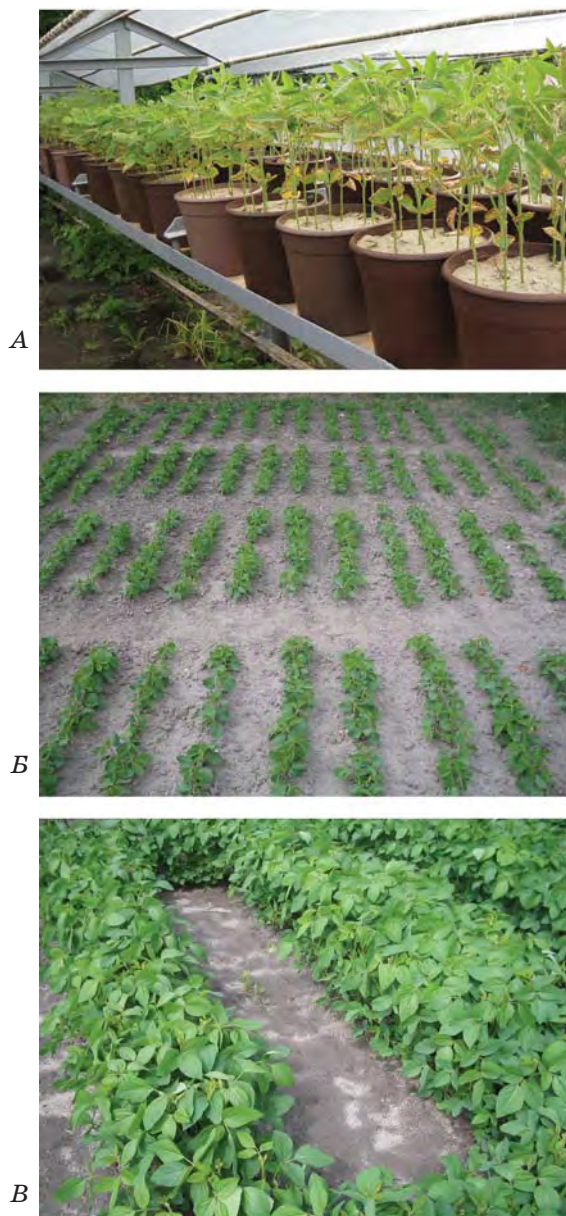


Рис. 1. Рослини сої, вирощені: в умовах вегетаційного (А) та дрібноділянкового польового (Б, В) дослідів

Азотфіксувальну активність (АфА кореневих бульбочок) визначали методом Hardy et al. [28]. Газову суміш аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6855 Network GC System USA (визначення проводили у п'ятикратній повторюваності). Статистичну обробку експериментальних даних виконували за Доспеховим [29] та з використанням програми Microsoft Excel 2010. У таблицях і на рисунках подано середні арифметичні та їхні стандартні похибки. Достовірними вважали розбіжності за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Інсерційну природу мутацій, які призводили до появи канаміцинстійких (Km^R) бульбочкових бактерій *B. japonicum* зі зміненими симбіотичними властивостями, доведено методом ПЛР. Позитивним контролем була ДНК *E. coli* S17-1(pSUP2021::Tn5) і *E. coli* S17-1(pSUP5011::Tn5mob), негативним — *B. japonicum* 646. На рис. 2 наведено результати продуктів ампліфікації ДНК бульбочкових бактерій сої двох Tn5-мутантів, одержаних із застосуванням вектора pSUP2021::Tn5 (рис. 2, А) та п'яти мутантів, отриманих із використанням вектора pSUP5011::Tn5 mob (рис. 2, Б).

Результати молекулярно-генетичного аналізу ПЦР-методом з використанням праймерів до гена неоміцинофосфотрансферази транспозона Tn5 підтвердили наявність фрагмента транспозона у Tn5-мутантів *B. japonicum*, що свідчить про інтеграцію в їхній геном гена, що зумовлює стійкість до канаміцину. Водночас встановлено, що штам-реципієнт 646 *B. japonicum* не містить у геномі фрагмента ДНК гена стійкості до канаміцину транспозона Tn5.

В умовах вегетаційних та дрібноділянкових дослідів Tn5-мутанти *B. japonicum* проаналізовано за симбіотичними показниками у різні фази онтогенезу сої сортів Аннушка, Мар'яна, Васильківська та Колбі. Особливу увагу при цьому було акцентовано на реалізацію азотфіксувального потенціалу Tn5-мутантів залежно від сорту рослини-хазяїна. У процесі досліджень виявлено активне формування симбіотичних органів на коренях усіх без винятку рослин сої, інокульованих Tn5-мутантами та штамми *B. japonicum* 646 і 6346. Поряд із цим встановлено відмінності за кількістю та масою бульбочок між рослинами різних варіантів дослідів залежно від сорту сої та генотипу мікросимбіонта (табл. 1). В інокульованих рослин сої кількість сформованих бульбочок коливалась для сортів: Аннушка — в межах 15–27, Васильківська — 9–23, Мар'яна — 27–33, Колбі — 13–29 на одному корені, що свідчить про високу вірулентність і нодуляційну активність досліджуваних Tn5-мутантів *B. im*.

За показником «маса сформованих бульбочок» (г/рослину) вихідний штам 646 на сої сорту Аннушка перевищували всі 10 мутантних культур *B. japonicum*, Васильківська — 6, Мар'яна — 6, Колбі — 8, тимчасом як над виробничим штамом мали перевагу тільки Tn5-мутанти Т66, Т9-2, Т17-2 і В-18 — на сої сорту Аннушка та Т3-11, В-2, В-20, В-

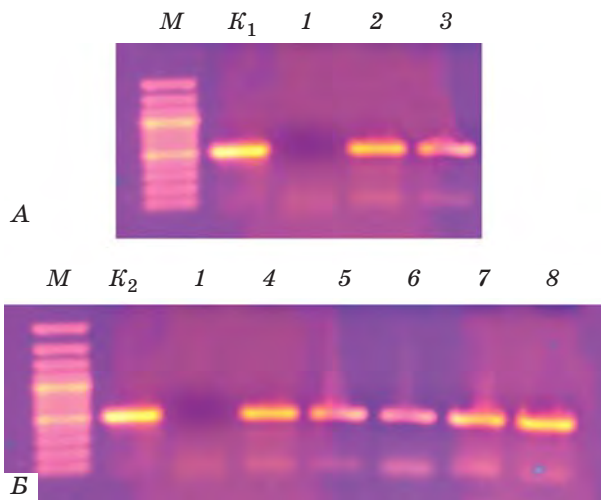


Рис. 2. Електрофорез в 0,7% -му агарозному гелі продуктів ампліфікації ДНК *B. japonicum* та *E. coli* з використанням праймерів до гена неоміцинфосфотрансферази Tn5:

1 — вихідний штам 646 *B. japonicum*;
2, 3 — Tn5-мутанти (pSUP2021::Tn5) штаму 646 — T66 і T21-2;
4–8 — Tn5-мутанти (pSUP5011::Tn5mob) штаму 646 — B-2, B-16, B-18, B-20, B-21;
 K_1 — *E. coli* S17-1(pSUP2021::Tn5);
 K_2 — *E. coli* S17-1(pSUP5011::Tn5mob);
M — маркер молекулярних мас (DNA Ladder Mix, Fermentas)

21 — на сої сорту Васильківська. На коренях сої сортів Мар'яна та Колбі найбільшу масу бульбочок було сформовано за участю штаму 6346.

Інтенсивність азотфіксації бульбочок сої змінювалася залежно від штаму-інокулянта, фази розвитку і сорту рослини-хазяїна. Так, у фазі бутонізації сої сорту Аннушка найбільшу АфА бульбочок зафіксовано у рослин, інокульованих мутантами Т66, 17-2, В-2, В-18 (рис. 3, А), а у фазі бутонізації–початок цвітіння — мутантами В-16, В-18, В-20 і В-21 *B. japonicum* (рис. 3, Б).

Слід зазначити, що бульбочки на сої сорту Аннушка, утворені мутантом В-18, виявляли стабільно вищий рівень азотфіксації у фазах бутонізації та бутонізації–початку цвітіння рослин порівняно з використанням контрольних штамів на тому самому сорті. У цих фазах розвитку сої сорту Васильківська максимальну азотфіксувальну активність бульбочкам забезпечували різні Tn5-мутанти. Зокрема, у фазі бутонізації це — В-20 і В-21, а бутонізації–початку цвітіння — Т3-11 і Т21-2 *B. japonicum*. Унаслідок формування симбіозу сої сорту Мар'яна із Tn5-мутантами Т66, Т21-2,

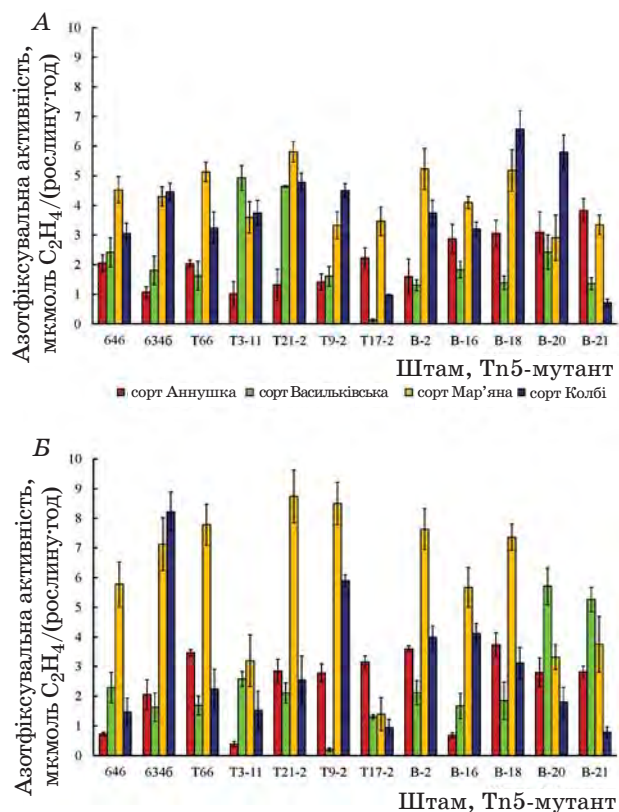


Рис. 3. Азотфіксувальна активність кореневих бульбочок сої:

А — 30-та доба (фаза бутонізації);

Б — 40-ва доба після появи сходів (фаза бутонізації–початку цвітіння) залежно від сорту рослини-хазяїна і використаних для інокуляції Tn5-мутантів *B. japonicum* (дрібноділянковий польовий дослід).

Достовірність розбіжностей від контрольного значення $P < 0,05$

В-2 і В-18 азотфіксувальна активність бульбочок збільшилася на 27,0–50,0% у фазі бутонізації (30-та доба) і на 14,0–28,0% у фазі бутонізації–початку цвітіння (40-ва доба) порівняно із застосуванням батьківського штаму 646. Водночас, суттєву перевагу за АфА (на 20,0–35,0%) над бульбочками, утвореними штамом 6346, ці мутанти мали тільки у фазі бутонізації–початку цвітіння (як виняток, у фазі бутонізації азотфіксація бульбочок сої за участю штаму Т21-2 була більшою в 1,3 раза, ніж бульбочок штаму 6346). Слід зазначити, що показник інтенсивності азотфіксації бульбочок сої сорту Мар'яна у фазі бутонізації досягав 7,36–8,74 проти 5,13–5,81 мкмоль C_2H_4 / (рослину/год) у фазі бутонізації–початку цвітіння рослин, інокульованих зазначеними мутантами.

Інокуляція сої сорту Колбі мутантами (за винятком Т17-2, В-21) призводила до збіль-

Таблиця 1. Формування симбіотичного апарату в різних сортів сої за інокуляції Tn5-мутантами бульбочкових бактерій сої (30-а доба після сходів, дрібноділянковий польовий дослід)

Варіант	Сорт Аннушка		Сорт Васильківська		Сорт Мар'яна		Сорт Колбі	
	а	б	а	б	а	б	а	б
646	13,3±2,0	0,04±0,003	11,3±0,7	0,06±0,001	35,0±4,5	0,12±0,02	17,3±2,3	0,04±0,00
6346	19,3±1,8	0,12±0,01	24,0±1,5	0,06±0,008	42,0±3,2	0,28±0,04	25,7±2,7	0,19±0,02
Tn5-мутанти <i>B. japonicum</i>, одержані з використанням вектора pSUP2021::Tn5								
T66	27,6±1,8	0,11±0,008	14,6±0,3	0,04±0,00	28,3±4,4	0,13±0,01	27,3±1,2	0,08±0,01
T3-11	22,0±1,2	0,08±0,006	20,0±1,5	0,07±0,003	27,0±2,0	0,05±0,01	17,0±5,8	0,07±0,03
T21-2	26,6±2,0	0,08±0,002	21,3±2,7	0,06±0,003	30,6±1,2	0,17±0,01	26,3±2,3	0,02±0,01
T9-2	25,0±0,6	0,16±0,003	9,60±1,4	0,02±0,00	32,0±4,7	0,15±0,03	28,7±3,0	0,10±0,00
T17-2	25,0±1,0	0,13±0,10	18,0±3,0	0,05±0,001	32,0±5,5	0,06±0,01	17,7±3,8	0,08±0,03
Tn5-мутанти <i>B. japonicum</i>, одержані з використанням вектора pSUP5011::Tn5 mob								
B-2	24,0±1,0	0,10±0,01	18,0±1,0	0,08±0,03	28,7±5,7	0,17±0,02	29,0±3,0	0,12±0,01
B-16	15,3±5,0	0,09±0,02	14,0±0,9	0,04±0,006	31,0±7,2	0,11±0,03	26,3±2,0	0,11±0,03
B-18	22,0±1,2	0,14±0,00	15,3±1,2	0,06±0,01	33,0±5,4	0,15±0,02	17,0±1,0	0,10±0,00
B-20	20,0±2,5	0,10±0,01	23,0±3,7	0,15±0,01	27,3±5,4	0,09±0,03	21,7±2,0	0,08±0,01
B-21	18,0±1,7	0,09±0,02	21,0±2,0	0,19±0,02	26,7±1,4	0,14±0,03	13,0±0,5	0,03±0,01

Примітка: а — кількість бульбочок, шт./рослину; б — маса бульбочок, г/рослину.

шення асиміляції N_2 бульбочками рослин у фазі бутонізації тільки порівняно з бактеризацією штамом 646. Два мутанти — B-18 і B-20 — домінували за АфА над обома контрольними штамми 646 і 6346 також і у фазі бутонізації-початку цвітіння.

У результаті дослідження виявлено максимум продуктивності за ознакою азотфіксаційної активності симбіотичні системи із урахуванням генетичних особливостей сортів сої та мікросимбіонтів: 1) сорту Аннушка — B-16, B-18, B-20, B-21, T66, T17-2; 2) сорту Васильківська — B-20, T21-2, T3-11; 3) сорту Мар'яна — T66, T21-2, B-2, B-18; 4) сорту Колбі — B-18, B-20; рівень їх асиміляції N_2 перевищував активність симбіозів, утворених штамми 6346 та 646 (рис. 3).

Інтенсивність симбіотичної азотфіксації сої сортів Аннушка, Васильківська, Мар'яна і Колбі значною мірою визначалася функціональною активністю мікросимбіонта у відповідній фазі розвитку рослини-хазяїна. На нашу думку, здатність окремих мутантів *B. japonicum* інтенсивніше зв'язувати атмосферний N_2 у симбіозі з рослиною у певній фазі її розвитку можна реалізувати, якщо залучити їх як один із компонентів комплексних азотфіксувальних препаратів. Наприклад, для бактеризації сої сорту Колбі це можуть бути Tn5-мутанти B-18, B-20, T9-2 або T21-2, а для сорту Васильківська —

мутанти T3-11, T21-2, B-20 і B-21, оскільки інтенсивність зв'язування N_2 бульбочками, утвореними за їхньої участю, суттєво відрізняється у фазах бутонізації та бутонізації-цвітіння.

Таким чином, один із шляхів посилення інтенсивності біологічної азотфіксації сої протягом фаз бутонізації та бутонізації-початку цвітіння — використання Tn5-мутантів із різним генетично-детермінованим рівнем активності ензиму нітрогенази, які комплементарні до відповідного сорту. Результати показують можливість розроблення комплексних бактеріальних препаратів на основі штамів бульбочкових бактерій із підвищеним рівнем реалізації азотфіксувальної здатності в різні фази розвитку сої та залежно від тривалості вегетаційного періоду рослини-хазяїна.

Особливості формування та функціонування симбіотичних систем сої сортів Аннушка, Васильківська, Мар'яна та Колбі за участю Tn5-мутантів *B. japonicum* зумовили різний ступінь реалізації продуктивного потенціалу рослин. Найефективнішою порівняно із застосуванням виробничого штаму *B. japonicum* 6346 виявилась інокуляція сої сорту Аннушка Tn5-мутантами B-16, B-18 і B-20 (приріст урожаю зерна становив 19,5–30,0%), сорту Васильківська — мутантами T66, T21-2, T9-2, T17-2 (8,8–29,5%),

сорту Мар'яна — мутантами Т66, Т21-2, Т17-2, В-20 (8,8–20,1%), сорту Колбі — мутантами Т66, Т21-2 Т17-2, В1-16 (8,2–12,5%) (табл. 2).

У результаті досліджень відібрано Тn5-мутанти Т66, Т21-2, В-18 і В-20 *B. japonicum* із розширеним спектром комплементарності, які забезпечували інтенсивнішу азотфіксацію сої різних сортів у фазах бутонізації та бутонізації–початку цвітіння, що сприяло одержанню більшого урожаю зерна порівняно із застосуванням штамів 646 та 6346.

Однією з причин неповної реалізації потенціальної генетично детермінованої активності Тn5-мутантів *B. japonicum* ймовірно є певна невідповідність між фізіологічною активністю сої, яка пов'язана із фазами розвитку, тривалістю вегетаційного періоду, сортовою стиглістю рослини-хазяїна, і динамікою азотфіксувальної активності бульбочок, зумовленою функціонуванням нітрогенази мікросимбіонта.

Зважаючи на те, що сорти сої за тривалістю вегетаційного періоду, який коливається від 75 до 135 днів, умовно поділяють на чотири групи (за сортовою стиглістю), доцільним було б збалансувати формування і функціонування симбіотичної системи рослин, використовуючи ризобії з відповідним типом динаміки азотфіксувальної активності. Таким чином, мета подальших досліджень полягала в доборі активних штамів

B. japonicum за динамікою азотфіксувальної активності до сортів сої з різною тривалістю періоду вегетації.

В умовах вегетаційного досліду для інокуляції насіння сої сортів Аннушка, Васильківська і Мар'яна використали перспективні Тn5-мутанти *B. japonicum* — Т66(pSUP2021::Tn5) і В-16, В-20(pSUP5011::Tn5), одержані із застосуванням різних плазмід-векторів. Фази розвитку сої сортів, які належать до різних груп стиглості, відрізнялись, а тому азотфіксувальну активність бульбочок оцінювали на 22-гу, 30-ту, 40-ву, 47-му та 55-ту добу після появи сходів рослин (рис. 4). Бобово-ризобіальні системи, утворені на основі різних сортів сої за участю одного й того самого мікросимбіонта — Тn5-мутанта, відрізнялися за динамікою азотфіксувальної активності. Водночас, рослини сої певного сорту, інокульовані відмінними транспозоновими мутантами *B. japonicum*, різнилися як за інтенсивністю, так і за динамікою АфА бульбочок.

На ранніх етапах онтогенезу рослин (22-га і 30-та доба після сходів) інтенсивність асиміляції N₂ бульбочками сої сорту Аннушка була найбільшою у варіантах з інокуляцією насіння мутантом В-16. На пізніших етапах розвитку рослин (40-ва, 47-ма та 55-та доба) домінували за цим показником симбіотичні системи сої за участю Тn5-мутанта Т66. Таким чином, з метою посилення

Таблиця 2. Урожай (ц/га) зерна сої, інокульованої Тn5-мутантами *B. japonicum* (дрібноділянковий польовий дослід)

Варіант	Сорт			
	Аннушка	Васильківська	Мар'яна	Колбі
<i>B. japonicum</i> 646	22,8±0,9	26,5±1,2	24,3±1,2	32,5±1,9
<i>B. japonicum</i> 6346	23,6±0,8	29,5±1,2	24,9±0,7	32,8±1,8
Тn5-мутанти <i>B. japonicum</i> (pSUP2021::Tn5)				
Т66	24,5±1,9	32,1±2,1*	27,1±1,2	35,8±2,1*
Т3-11	26,4±1,1*	25,4±1,3	25,8±1,3*	33,7±2,0
Т21-2	27,7±1,2*	33,4±1,4*	27,2±1,3*	36,9±2,4*
Т9-2	21,6±0,8	38,2±1,2*	25,5±0,9	32,1±1,9
Т17-2	26,0±0,9*	32,7±1,2*	29,9±1,3*	35,7±1,7*
Тn5-мутанти <i>B. japonicum</i> (pSUP5011::Tn5mob)				
В-2	25,2±1,2	29,3±1,2	24,9±0,8	27,4±0,9
В-16	30,7±1,5*	20,7±0,9	21,6±1,3	35,5±1,3*
В-18	28,4±1,2*	26,3±0,8	20,4±1,3	33,6±1,4
В-20	28,2±1,3*	29,7±1,2	29,5±1,2*	33,8±1,7
В-21	23,0±1,1	16,2±0,4	25,7±1,3*	28,1±1,1

* $P < 0,05$ порівняно з контролем.

симбіотичної азотфіксації сої сорту Аннушка як перспективну можна розглядати комплексну інокуляцію насіння бульбочковими бактеріями B-16 + T66.

У варіантах за інокуляції сої сорту Мар'яна мутантами T66, B-16, B-20 і 6346 азотфіксувальна активність бульбочок була подібною за динамікою (рис. 4, Б), але відрізнялася за інтенсивністю у певній фазі розвитку рослин. Упродовж вегетаційного періоду найбільша інтенсивність азотфіксації була притаманна бульбочкам сої сорту Мар'яна, утвореним мікросимбіонтом T66. Як перспективну для цього сорту слід розглядати композицію бульбочкових бактерій сої T66+6346.

Оптимізувати азотфіксувальний потенціал симбіотичної системи сої сорту Васильківська на початкових етапах функціонування можна, застосовуючи Tn5-мутанти B-16 і B-20, які здатні забезпечити більшу азотфіксацію, ніж мікросимбіонти T66 і 6346 *B. japonicum*. Максимальні значення показників азотфіксації бульбочок сої сорту Васильківська, утворених мутантами B-16 і B-20, зафіксовано на 22-гу та 30-ту добу вегетації рослин. Для порівняння варто зазначити, що в результаті бактеризації сої сорту Васильківська штамом 6346 спостерігали збільшення асиміляції N_2 бульбочками на 40-ву та 47-му добу вегетації сої (відповідно фази — початок цвітіння та початок утворення бобів). Для інокуляції насіння сої сорту Васильківська доцільно застосовувати суміші на основі бульбочкових бактерій B-16+T66, B-20+T66, а також B-16+6346 та B-20+6346.

Отже, динаміка та інтенсивність зв'язування атмосферного азоту бобово-ризобіальними системами залежить як від генотипу мікросимбіонта (у даному разі різні Tn5-мутанти та штами 646 і 6346 *B. japonicum*), так і від сорту рослини-хазяїна та її фази розвитку. Бульбочкові бактерії *B. japonicum*, одержані з використанням плазмід рSUP5011::Tn5mob, активізували симбіотрофне живлення і забезпечували зернову продуктивність більшою мірою за інокуляції ранньостиглих сортів сої — Аннушка, Васильківська, а з допомогою вектора рSUP2021::Tn5 — сортів сої Мар'яна і Колбі, вегетаційний період яких є більш тривалим.

Таким чином, використання бульбочкових бактерій *B. japonicum*, одержаних транспозоновим мутагенезом, як штамів-інокулянтів можна розглядати як можливі

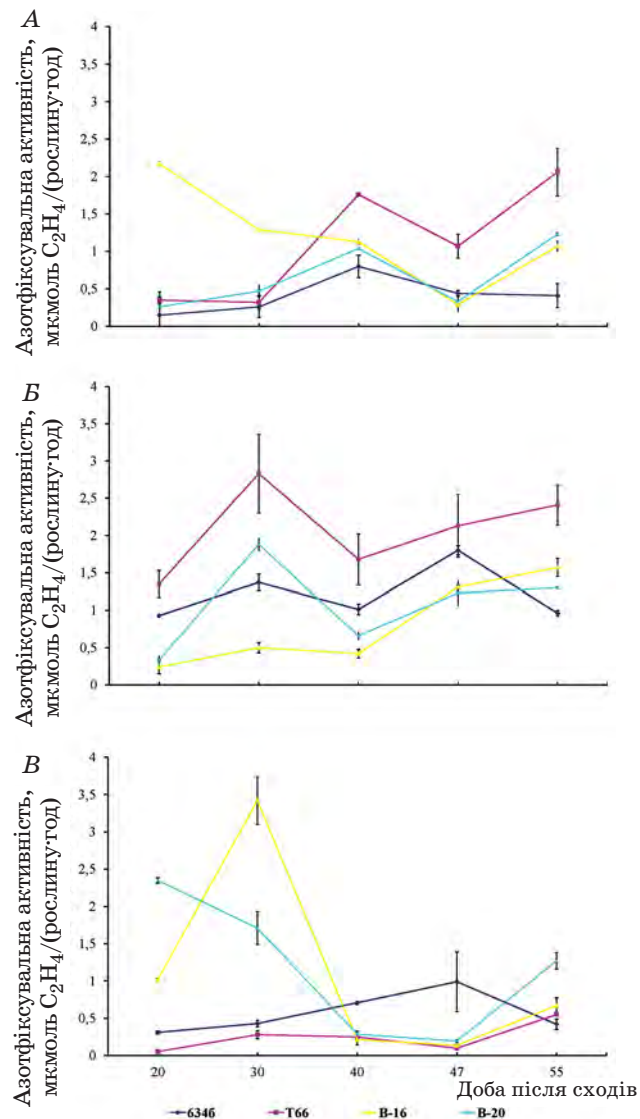


Рис. 4. Азотфіксувальна активність симбіотичних систем сої сортів:

А — Аннушка; Б — Мар'яна; В — Васильківська за участю різних Tn5-мутантів *B. japonicum*. Доба після появи сходів рослин: 1 — 22-га; 2 — 30-та; 3 — 40-ва; 4 — 47-ма; 5 — 55-та

напрями інтенсифікації симбіотичної азотфіксації сої. Перший (моноінокуляція) — підбір бульбочкових бактерій за відповідним типом динаміки азотфіксувальної активності до певного сорту сої з урахуванням тривалості вегетаційного періоду рослини-хазяїна. Другий — використання бінарних або полікомпонентних препаратів на основі культур *Bradyrhizobium*, які подібні за динамікою, але відрізняються за інтенсивністю азотфіксувальної активності у різних фазах розвитку рослини-хазяїна або ж поєднання інокулянтів із різним типом динаміки АФА.

ЛІТЕРАТУРА

1. Коць С. Я., Моргун В. В., Патыка В. Ф. и др. / Биологическая фиксация азота: бобово-ризобийный симбиоз. — К.: Логос, 2010. — Т. 1. — 508 с.
2. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под. ред. Тихоновича И. А., Проворова Н. А. — СПб.: Наука, 1998. — 194 с.
3. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Спайнка Г., Кондороши А., Хукаса П. Пер. Тихонович И. А., Проворов Н. А. — СПб., 2002. — 567 с.
4. Бабич О. А., Немцов А. В., Петриненко В. Ф. Наукові основи сучасних технологій вирощування сої на насіння в умовах Лісостепу України / Зб. наук. праць Вінницького ДАУ. — Вінниця, 2000. — Вип. 7. — С. 10–13.
5. Толкачев М. З., Дідович С. В., Адамень Ф. Ф., Нестерчук Н. Н. Эффективность нитрагенизации зрощуваної сої на фоні ґрунтової популяції *Bradyrhizobium japonicum* // Физиол. биохим. культ. раст. — 2001. — Т. 33, № 5. — С. 436–440.
6. Адамень Ф. Ф. Теоретическое обоснование минерального питания растений сои в условиях юга Украины. — Симферополь: Таврида, 1995. — 94 с.
7. Коць С. Я. Роль біологічного азоту у підвищенні продуктивності сільськогосподарських рослин // Физиол. биохим. культ. раст. — 2001. — Т. 33, № 3. — С. 208–215.
8. Антипчук А. Ф., Андреюк Е. И., Рангелова В. И. и др. Ростова активність и технологические свойства азотфиксирующих микроорганизмов при их гетерофазном культивировании // Мікробіол. журн. — 1997. — Т. 59, № 4. — С. 117–123.
9. Smith R. S. Rhizobial inoculant technology in North America // Biology of Plant-Microbe Interactions: New Bridges between Past and Future: Proceedings of the 11 International congress on Molecular Plant — Microbe Interactions. St. Petersburg. July 18–26, 2003. — St. Paul. (Minn.). — 2004 — P. 294–596.
10. Патыка В. Ф., Толкачев Н. З., Бутвина Ю. З. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современном земледелии Украины // Физиол. биохим. культ. раст. — 2005. — Т. 37, № 5. — С. 384–393.
11. Патыка В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін. Біологічний азот. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
12. Маліченко С. М., Даценко В. К., Василюк В. М. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиол. биохим. культ. раст. — 2007. — Т. 39, № 5. — С. 409–418.
13. Simon R., O'Connell M., Labes M., Puhler A. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulations of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria // Methods in enzymology. — Academ. Press Inc. — 1986. — V. 118. — P. 640–659.
14. Коць С. Я., Моргун В. В., Тихонович И. А. и др. Биологическая фиксация азота: Генетика азотфиксации, генетическая инженерия штаммов. — К.: Логос. — 2011. — Т. 3. — 404 с.
15. Коць С. Я., Маліченко С. М., Даценко В. К. та ін. Tn5-мутанти *Bradyrhizobium japonicum*: отримання та вивчення їхніх властивостей // Факт. експерим. евол. мікроорг. — Зб. наук. пр. — Т. 7. — К.: Логос, 2009. — С. 28–32.
16. Comfort N. C. From controlling elements to transposons: Barbara McClintock and the Nobel Prize // Trends Biochem. Sci. — 2001. — V. 26. — P. 454–457.
17. Воробей Н. А., Коць С. Я., Маліченко С. М., Якимчук Р. А. Дослідження симбіотичних систем сої, утворених за участю транспозантів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиол. биохим. культ. раст. — 2006. — Т. 38, № 5. — С. 418–426.
18. Karr D. B., Rong-Ti L., Reuhs B. L., Emerich D. W. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation // Planta. — 2000. — V. 211. — P. 218–226.
19. Marrogui S., Zorreguieta A., Santamari C. et al. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants // J. Bacteriol. — 2001. — V. 183, N 3. — P. 854–864.
20. Prevost D., Bromfield E. S. P. Diversity of symbiotic rhizobia resident in Canadian soils // Can. J. Soil Sci. — 2003. — V. 83, N 3. — P. 311–319.
21. Коць С. Я., Моргун В. В., Патыка В. Ф. и др. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобийный симбиоз: Т. 1. — К.: Логос, 2019. — 508 с.
22. Chachaty E., Saulnier P. Isolation chromosomal DNA from bacteria / The Nucleic Acid Protocols Handbook (R. Rapley Ed.). — Humana Press Inc., Totowa NJ. — 2000. — P. 29–32.
23. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 395 с.
24. Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. — 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 1998.
25. Воробей Н. А., Заєць В. М., Коць С. Я. Біотехнологія створення ефективних Tn5-мутантів бульбичкових бактерій конюшини *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 3 — С. 53–61.

26. Reznikoff W. S. Transposon Tn5 // Annu. Rev. Genet. — 2008. — V. 42. — P. 151–158.
 27. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений. — К.: Наук. думка, 1964. — 388 с.

28. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene-etylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. — 1968. — V. 43, N8. — P. 1185–1207.
 29. Доснехов Б. А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 352 с.

**РЕАЛИЗАЦИЯ АЗОТФИКСИРУЮЩЕГО
ПОТЕНЦИАЛА Tn5-МУТАНТОВ
Bradyrhizobium japonicum В СИМБИОЗЕ
С РАСТЕНИЯМИ СОИ**

Н. А. Воробей, С. Я. Коць, П. Н. Маменко

Институт физиологии растений и генетики
НАН Украины, Киев

E-mail: n-vorobey@ukr.net

В результате проведенных исследований среди Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* селекционированы клубеньковые бактерии, которые отличались интенсивностью и динамикой нитрогеназной активности в симбиозе с растениями сои. Инсерционная природа мутаций, обуславливающих появление Km^R-форм *B. japonicum* с измененными симбиотическими свойствами, доказана при использовании полимеразной цепной реакции. В условиях вегетационных и мелкоучастковых опытов Tn5-мутанты *B. japonicum* проанализированы по симбиотическим показателям в разные фазы онтогенеза сои сортов Аннушка, Васильковская, Марьяна и Колби, которые относятся к трем группам сортовой спелости. Установлено, что динамика и интенсивность ассимиляции N₂ корневыми клубеньками сои зависела от генотипа микросимбионта, сорта и фазы развития растения-хозяина. Tn5-мутанты *B. japonicum*, полученные с применением плазмиды pSUP5011::Tn5mob, были более эффективны в симбиозе с раннеспелыми сортами сои Аннушка и Васильковская, а с использованием pSUP2021::Tn5 — с сортами сои Марьяна и Колби, вегетационный период которых более продолжителен. По результатам исследований также отобраны Tn5-мутанты *B. japonicum* T66, T21-2, B-18 и B-20 с расширенным спектром комплементарности, обеспечивающие более интенсивную азотфиксацию сои разных сортов в фазах бутонизации и бутонизации–начала цветения, что обуславливало увеличение урожая зерна в сравнении с использованием штаммов 646 и 634b. Рассматривается стратегия создания поликомпонентных инокулянтов для сортов сои, которые принадлежат к разным группам спелости, на основе штаммов ризобий с различной интенсивностью и динамикой азотфиксирующей активности.

Ключевые слова: бобово-ризобияльный симбиоз, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутанты.

**REALIZATION OF NITROGEN FIXATION
POTENTIAL OF Tn5-MUTANTS
Bradyrhizobium japonicum IN SYMBIOSIS
WITH SOYBEAN PLANTS**

N. A. Vorobey, S. Ya. Kots, P. M. Mamenko

Institute of Plant Physiology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

E-mail: n-vorobey@ukr.net

Nodule bacteria of different rate and dynamics of nitrogenase activity in symbiosis with soybean plants were selected as the result of investigation of *Bradyrhizobium japonicum* Tn5-mutants. Insertion nature of mutations that lead to appearance of Km^R forms of *B. japonicum* with changed symbiotic properties was proved by PCR- technique. Tn5-mutants of *B. japonicum* were analyzed for their symbiotic characteristics in vegetative and small plot experiments during different ontogenesis stages of various soybean plants (Annushka, Vasylkivska, Maryana, Colbi) that cover three cultivar maturity groups. It was established that dynamics and intensity of nitrogen assimilation in soybean root nodules depended on microsymbiote genotype, as well as cultivar and development stage of host plant. It was shown that Tn5-mutants obtained with the plasmid pSUP5011::Tn5mob were more efficient in symbiosis with early-maturing soybean cultivars Annushka and Vasylkivska, while mutants obtained with the pSUP2021::Tn5 plasmid — more efficient in symbiosis with Maryana and Colbi soybean cultivars with the prolonged vegetation period. Tn5-mutants of *B. japonicum* T66, T21-2, B-18 and B-20 with advanced complementarity properties, that ensure higher nitrogen fixation rates in soybean plants during budding and budding–early flowering stages resulting in yield increase as comparing to the *B. japonicum* strains 646 and 634b were selected. The possibilities of creation of polycomponent inoculum for soybean cultivars belonging to different maturity groups based on the rhizobia strains with various intensity and dynamics of nitrogen fixation activity are discussed.

Key words: legume-rhizobial symbiosis, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-mutants.