

УДК 581.851.155

ЗДАТНІСТЬ ТРАНСПОЗОНОВИХ МУТАНТІВ РИЗОБІЙ СОЇ ПРИЖИВАТИСЬ У ҐРУНТІ І ЗБЕРІГАТИ СИМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

С.М. МАЛЧЕНКО, **В.К. ДАЦЕНКО**, П.М. МАМЕНКО, С.Я. КОЦЬ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: azot@ifrg.kiev.ua*

В умовах польового досліду вивчали здатність Tn5-мутантів штаму *Bradyrhizobium japonicum* 646 приживатися в орному шарі ґрунту після інокуляції насіння або внесення інокулюма в ґрунт і в наступному році утворювати ефективний симбіоз із соєю. На підставі різної стійкості штаму-стандарту 6346 і Tn5-мутантів T66, 118, 3-11 до антибіотиків канаміцину та стрептоміцину встановлено, що в наступному після інокуляції році досліджувані ризобії успішно приживались і не втрачали вірулентності й азотфіксувальної активності. Ці властивості ризобій зберігаються незалежно від способу бактеризації сої.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, соя, приживаність, бульбочки, азотфіксація.

Відомо, що передпосівна інокуляція насіння бобових культур бульбочковими бактеріями забезпечує відчутне підвищення їх урожаю на ґрунтах, де ці культури давно не вирощували. Цей агротехнічний захід особливо ефективний при інтродукції окремих родів бобових, які походять з інших, географічно віддалених регіонів. Зокрема це стосується сої, бульбочкові бактерії якої до останнього часу в ґрунтах України були відсутні. Тому бактеризація посівного матеріалу сої ризобіями є обов'язковою ланкою в технології вирощування цієї важливої сільськогосподарської культури для створення азотфіксувального симбіозу. Його ефективність залежить насамперед від вірулентності й азотфіксувальної активності ризобіальних штамів-інокулянтів, їх конкурентоспроможності, стійкості до негативного впливу аборигенної мікрофлори. Не менш важливою в цьому плані є також здатність бульбочкових бактерій приживатись в орному шарі ґрунту і протистояти несприятливим екологічним умовам — екстремальним температурам ґрунту, зниженій вологості тощо [10].

Щоб отримати перспективні для сільськогосподарської практики штамми бульбочкових бактерій, нині застосовують як традиційний метод аналітичної селекції, фізичний і хімічний мутагенез, так і новітні генно-інженерні методи, зокрема транспозоновий мутагенез [9, 15]. За останнім ми отримали низку Tn5-мутантів повільнорослих бульбочкових бактерій, у тім числі і мутантів виробничого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 646 [5—8], на один з яких (T66) отримано патент.

Згідно з програмою досліджень, ми ретельно перевіряли ці мутанти в умовах лабораторних, вегетаційних і польових дослідів на наявність у них агрономічно цінних симбіотичних ознак, насамперед на активність

азотфіксації та ефективність симбіозу із соєю. В результаті було відібрано контрастні за цими властивостями мутанти [2, 3, 6].

У літературі є повідомлення, що ризобій, інтродукованих у ґрунт у вигляді інокулянту посівного матеріалу бобових культур, уже через 1—2 роки не вдається виділити з корневих бульбочок. Так, Броквел та співавт. [14], вивчивши утворення бульбочок протягом першого і другого року після інтродукції 19 штамів *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* у ґрунт, в якому були відсутні місцеві ризобії цього типу, виявили, що впродовж першого після інтродукції року штами ініціюють утворення 80 % бульбочок, а протягом другого залежно від властивостей кожного окремого штаму — 19—94 %. Патика та співавт. [11, 12] встановили, що після інокуляції сої в її ризосфері титр ризобій у процесі вегетації рослин поступово підвищується, але після зимово-весняного періоду — помітно знижується.

З урахуванням важливості передпосівної бактеризації сої бульбочковими бактеріями ми поставили за мету вивчення рівня їх приживаності в ґрунті після інокуляції посівного матеріалу або безпосереднього внесення інокулюма в ґрунт під час передпосівної культивування останнього. Це питання особливо актуальне у зв'язку з отриманням нами нових транспозонових мутантів ризобій сої і необхідністю всебічного їх вивчення, в тім числі з'ясування ступеня приживаності в ґрунті, резистентності до умов навколишнього середовища і здатності зберігати свої симбіотичні властивості після перезимівлі.

Методика

Здатність нових транспозонових мутантів бульбочкових бактерій приживатися після перезимівлі в орному шарі темно-сірого лісового ґрунту і зберігати свої основні симбіотичні властивості — вірулентність та азотфіксувальну активність у симбіозі з соєю сорту Мар'яна вивчали шляхом посіву неінокульованого досліджуваними ризобіями насіння на ділянці, де в попередній рік вирощували сою із застосуванням інокуляції насіння, або коли інокулянт вносили безпосередньо в ґрунт. Використано Tn5-мутанти T66, 118 і 3-11 штаму *B. japonicum* 646, які в результаті мутагенезу набули стійкості до 200 мкг/мл канаміцину (Km) і зберегли резистентність до 1000 мкг/мл стрептоміцину (Str) у поживному середовищі. Контролем слугував чутливий до цих антибіотиків штам-стандарт 634б (Km^S Str^S). Титр усіх культур під час інокуляції був 10⁸. Щоб запобігти потраплянню ризобій з однієї ділянки на іншу, відстань між ними була 1 м. Крім того, на другий рік дослідів ґрунт не перекопували, а окремо розпушували кожну ділянку. Визначали кількість бульбочок та їх загальну азотфіксувальну активність [13] у період найінтенсивнішого функціонування симбіозу — на початку утворення соєю бобів. Повторність дослідів чотириразова, лабораторних досліджень — десятиразова.

Культуру ризобій, які індукували спонтанне утворення корневих бульбочок у наступному після закладання дослідів році, визначали за відомою методикою [10] у нашій модифікації [8]. З відмитих коренів 20 типових рослин кожного варіанта дослідів відділяли бульбочки і підраховували їх середню кількість на 1 рослину, тим самим визначали вірулентність досліджуваних ризобій. Потім відбирали 10 найхарактерніших із них, щоб з'ясувати, яка саме ризобіальна культура ініціювала утворення бульбочок.

Результати та обговорення

Найголовніші симбіотичні властивості транспозонових мутантів штаму 646 *V. japonicum*, а саме їх вірулентність та азотфіксувальна активність в обидва роки досліджень наведені в табл. 1. Усім вивченим культурам притаманна висока вірулентність, про що свідчить велика кількість ініційованих ними корневих бульбочок. При цьому помітна тенденція до збільшення кількості бульбочок, утворених Tn5-мутантами, порівняно зі стандартним штамом 6346 як у разі застосування передпосівної інокуляції насіння, так і за безпосереднього внесення інокулювальної суспензії бульбочкових бактерій у ґрунт під передпосівну культивування. Така закономірність зберігається і в наступному після бактеризації дослідних ділянок році. Принагідно зазначимо, що вірулентність взятих для вивчення бульбочкових бактерій в обидва роки досліджень була в основному вищою в разі внесення інокулюма в ґрунт.

Бульбочки на коренях сої успішно утворились унаслідок спонтанної інокуляції ризобіями, які залишились у ґрунті і зберегли свою вірулентність після перезимівлі. Серед трьох узятих для дослідження транспозонових мутантів ризобій найкращу здатність приживатися в ґрунті виявив Tn5-мутант 3-11, що підтверджує майже дворазове збільшення в наступному році випробувань кількості утворених корневих бульбочок у сої на ділянках, бактеризованих цим мутантом у попередньому році.

Стосовно загальної азотфіксувальної активності, виміряної ацетилен-редукційним методом, зазначимо, що за винятком Tn5-мутанта 118 решта досліджуваних ризобій, в основному переважали за цим показником штам-стандарт 6346.

Привертає увагу і той факт, що інтенсивність азотфіксації сої в усіх без винятку варіантах дослідження в наступному після виробничої інокуляції насіння році дещо знизилася. З одного боку, це можна пояснити можливим зменшенням азотфіксувальної активності ризобіальних клітин у результаті перезимівлі в орному шарі ґрунту, з іншого — причиною такого феномену може бути те, що попередником сої при її вирощуванні в наступному році була ця ж сама культура, яка, як відомо, добре збагачує ґрунт сполуками азоту за рахунок післяжнивних решток. Тому за наявності в ґрунті достатньої кількості азоту соя успішно поєднує симбіотрофне азотне живлення з автотрофізмом. Не можна також не брати до уваги й відмінність погодних умов протягом обох років досліджень, яка безперечно впливала на інтенсивність симбіотичної азотфіксації.

До початку досліджень здатності ризобій сої приживатися в ґрунті за різних способів їх внесення ми встановили [8], що стандартний штам *V. japonicum* 6346 і Tn5-мутанти T66, 118, 3-11 штаму *V. japonicum* 646 відрізняються за ступенем стійкості до певних антибіотиків. Так, якщо штам 6346 чутливий до канаміцину (Km^S) і стрептоміцину (Str^S), то досліджувані транспозонові мутанти здатні рости на середовищі МДА, збагаченому 1000 мкг/мл Str і 200 мкг/мл Km. У зв'язку з цим можна диференціювати, якими ризобіями — штамом-стандартом чи мутантами утворена та чи інша коренева бульбочка.

Здатність ризобій, ізольованих із бульбочок сої, що утворилися внаслідок спонтанної інокуляції застосованими в попередньому році різними культурами бульбочкових бактерій, рости на МДА з антибіотиками і без них ілюструють дані табл. 2, де показано, що ізоляти усіх десяти проаналізованих типових бульбочок, які утворилися за спонтанної

ТАБЛИЦА 1. Симбиотичні властивості Tn5-мутантів *Vraduhtizobium japonicum* 646 залежно від способу та часу інокуляції (початок утворення бобів)

Інокулянт	Спосіб інокуляції	Виробнича інокуляція, 2007 р.		Спонгана інокуляція, 2008 р.	
		Кількість бульбочок, шт./рослину	Азотфіксувальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /(рослина · год)	Кількість бульбочок, шт./рослину	Азотфіксувальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /(рослина · год)
Штам 6346 (контроль)	ґрунт	58 ± 8	211 ± 10	80 ± 13	63 ± 9
	Насіння	42 ± 4	183 ± 18	70 ± 10	78 ± 10
Tn5-мутант T66	ґрунт	70 ± 4	243 ± 14	91 ± 14	82 ± 16
	Насіння	50 ± 4	218 ± 4	77 ± 8	86 ± 8
Tn5-мутант 118	ґрунт	89 ± 6	40 ± 5	107 ± 15	60 ± 6
	Насіння	76 ± 3	21 ± 3	82 ± 10	62 ± 4
Tn5-мутант 3-11	ґрунт	90 ± 12	200 ± 18	194 ± 18	99 ± 9
	Насіння	75 ± 5	179 ± 15	135 ± 13	86 ± 7

інокуляції штамом *V. japonicum* 6346, мали суцільний ріст на середовищі МДА без антибіотиків. Водночас ізоляти двох бульбочок утворили поодинокі колонії на МДА, збагаченому Km і Str. Це означає, що в цьому процесі брав участь один із Tn5-мутантів. Мабуть, це був T66 або 118, варіанти з інокуляцією якими територіально розміщені поряд із варіантом, де інокулянт слугував штам 6346. Ізоляти з восьми бульбочок, які могли б рости на МДА + Str або МДА + Km, не виділялись. Це означає, що вони утворені лише штамом 6346.

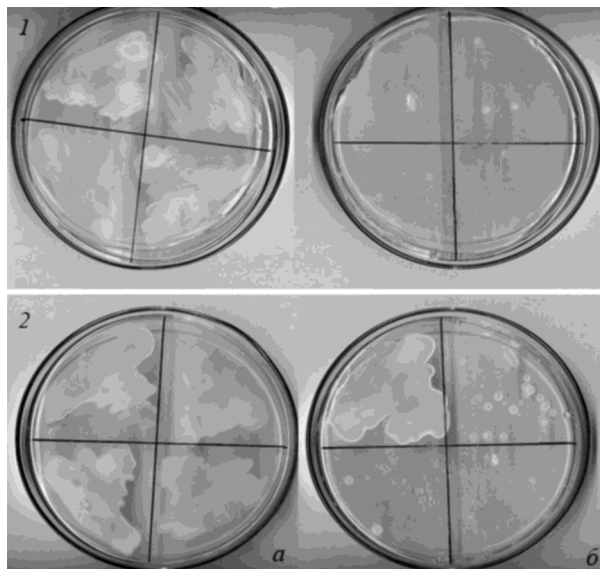
У табл. 2 і на рисунку наведено дані, які ілюструють участь Tn5-мутанта T66 в утворенні 10 типових бульбочок. Видно, що всі ізоляти з них були здатні рости на середовищі з антибіотиками. Отже, проаналізовані бульбочки ініційовані транспозоновими мутантами незалежно від способу інокуляції сої. У даному випадку це транспозант T66, оскільки в рік закладання досліду він був застосований як інокулянт саме на цих ділянках, звідки в наступному році відбиралися зразки бульбочок для аналізу.

У варіантах, де інокулянтами слугували рекомбіанти 118, 3-11 (див. табл. 2), ізоляти лише з однієї бульбочки як в одному, так і в іншому випадку не росли на МДА, збагаченому антибіотиками Km і Str. Безсумнівно, ця бульбочка утворена за участю штаму 6346, адже інших чутливих до використаних у досліді антибіотиків штамів ризобій у ґрунті не було, що підтверджує відсутність кореневих бульбочок у неінокульованої сої, висіяної в попередньому році.

На підставі наведеного можна зробити висновок, що через 1 рік після передпосівної інокуляції сої, незалежно від способу її застосування бульбочковій бак-

ТАБЛИЦЯ 2. Резистентність до канаміцину і стрептоміцину 10 ізолятів із бульбочок сої, утворених за інокуляції *V. jarrowii* 6346 і Tп5-мутантами

Інтенсивність росту ізолятів	МДА		МДА + Str		МДА + Km	
	Інокуляція насіння	Внесення інокулянта в ґрунт	Інокуляція насіння	Внесення інокулянта в ґрунт	Інокуляція насіння	Внесення інокулянта в ґрунт
<i>V. jarrowii</i> 6346 (контроль)						
Судільний ріст	10	10	—	—	—	—
Поодинокі колонії	—	—	2	2	2	2
Відсутність росту	—	—	8	8	8	8
Tп5-мутант T66						
Судільний ріст	10	10	6	6	6	4
Поодинокі колонії	—	—	4	4	4	6
Відсутність росту	—	—	—	—	—	—
Tп5-мутант 118						
Судільний ріст	10	10	5	6	6	5
Поодинокі колонії	—	—	4	3	4	4
Відсутність росту	—	—	1	1	—	1
Tп5-мутант 3-11						
Судільний ріст	10	10	6	9	8	7
Поодинокі колонії	—	—	3	1	2	3
Відсутність росту	—	—	1	—	—	—



Реізоляти культур *B. japonicum*, виділені з бульбочок рослин у варіанті з інокуляцією насіння:

1 — 6346; 2 — Т66; а — контроль (середовище МДА без антибіотиків); б — МДА + Км

терії сої, зокрема Тn5-мутанти штаму *B. japonicum* 646 — Т66, 118 і 3-11, здатні приживатися в орному шарі ґрунту, не втрачають своєї вірулентності і зберігають при цьому притаманну їм азотфіксувальну активність та резистентність до канаміцину і стрептоміцину.

1. Андронов Е.Е., Петрова С.Н., Чижевская Е.П. и др. Влияние внесения генетически модифицированного штамма *Sinorhizobium meliloti* АСН-5 на структуру почвенного сообщества микроорганизмов // Микробиология. — 2009. — 78, № 4. — С. 525—534.
2. Воробей Н.А., Коць С.Я., Маліченко С.М., Якимчук Р.А. Дослідження симбіотичних систем сої, утворених за участю транспозантів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2006. — 38, № 5. — С. 1—9.
3. Даценко В.К., Мельник В.М., Коць С.Я., Омельчук С.В. Фізіологічна взаємодія сої з новими Тn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // С.-г. мікробіологія. — 2008. — Вип. 8. — С. 52—60.
4. Коць С.Я., Маліченко С.М., Даценко В.К. та ін. Тn5-мутанти *Bradyrhizobium japonicum* — отримання та вивчення їхніх властивостей / Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць. Т. 7. — К.: Логос, 2009. — С. 28—32.
5. Коць С.Я., Маліченко С.М., Маменко П.М., Дрозденко Г.М. Перспективність використання Тn5-мутантів ризобій при виготовленні бактеріальних добрив // С.-г. мікробіологія. — 2008. — Вип. 8. — С. 32—38.
6. Маліченко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М. Ефективність симбіотичних систем, утворених за участю сої і транспозантів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 646 // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. — 2006. — Вип. 18. — С. 144—148.
7. Маліченко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М., Коць С.Я. Транспозоновий мутагенез штаму *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — 39, № 5. — С. 409—418.
8. Маліченко С.М., Даценко В.К., Маменко П.М. та ін. Взаємодія Тn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* з іншими ризобіальними штамами за сумісної інокуляції сої // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 3. — С. 235—241.
9. Новикова Н.И., Шарыпова Л.А., Симаров Б.В. Транспозоновый мутагенез у штамма СХМ1-105 *Rhizobium meliloti* // Молекул. мікробіологія, вірусологія. — 1986. — № 8. — С. 32—36.
10. Патица В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. Біологічний азот. — К.: Світ, 2003. — 422 с.
11. Патица В.П., Тихонович І.А., Філін'єв І.Д. та ін. Мікроорганізми і альтернативне землеробство. — К.: Урожай, 1993. — 175 с.

12. Патыка В.Ф., Толкачев Н.З., Шерстобоева Е.В. и др. Препараты клубеньковых бактерий для повышения урожайности бобовых культур / Украина в світових земельних продовольчих і кормових ресурсах і економічних відносинах: Тези доп. Міжнар. конф. (грудень 1995). — С. 313—314.
13. Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E.K. et al. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. — 1968. — 43, N 8. — P. 1185—1207.
14. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнка, А. Кондорози, П. Хукаса / Пер. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. — СПб: Б.и., 2002. — 567 с.
15. Simon P., O'Connell M., Labes M., Puhler A. Plasmid vector for the genetic analysis and manipulations of *Rhizobium* and other gram-negative bacteria // Methods in enzymol. — 1986. — 108. — P. 640—659.

Отримано 14.12.2009

СПОСОБНОСТЬ ТРАНСПОЗОНОВЫХ МУТАНТОВ РИЗОБИЙ СОИ ПРИЖИВАТЬСЯ В ПОЧВЕ И СОХРАНЯТЬ СИМБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

С.М. Маличенко, [В.К. Даценко], П.Н. Маменко, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

В условиях полевого опыта изучали способность Tn5-мутантов штамма *Bradyrhizobium japonicum* 646 приживаться в пахотном слое почвы после инокуляции семян или внесения инокулюма в почву и в следующем году образовывать эффективный симбиоз с соей. Исходя из различной устойчивости штамма-стандарта 634b и Tn5-мутантов T66, 118, 3—11 к антибиотикам канамицину и стрептомицину, установлено, что в следующем после инокуляции году исследуемые ризобии успешно приживались и не теряли вирулентности и азотфиксирующей активности. Данные свойства ризобий сохраняются независимо от способа бактеризации сои.

THE ABILITY OF TRANSPOSON MUTANTS OF SOYBEAN RHIZOBIA TO ECIZE IN SOIL AND PRESERVE THEIR SYMBIOTIC PROPERTIES

S.M. Malichenko, [V.K. Datsenko], P.M. Mamenko, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The ecizing ability of Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* 646 in soil plough-layer after the presowing seeds inoculation or inoculum application into the soil as well as preservation of their symbiotic properties was studied in field experiments. Basing on various resistance capability of standard strain 634b and Tn5-mutants T66, 118 and 3—11 to kanamycin and streptomycin it was shown that studied rhizobia well ecized in the soil and maintained their virulence and nitrogen fixing activity. The named rhizobial characteristics were preserved independently of used soybean inoculation means.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, ecizing ability, nodules, nitrogen fixation.