

УДК 581.579.841.3

## ВЗАЄМОДІЯ Tn5-МУТАНТІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* З ІНШИМИ РИЗОБІАЛЬНИМИ ШТАМАМИ ЗА СУМІСНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ СОЇ

С.М. МАЛІЧЕНКО, В.К. ДАЦЕНКО, П.М. МАМЕНКО, С.В. ОМЕЛЬЧУК, С.Я. КОЦЬ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Досліджено здатність двох Tn5-мутантів штаму 646 *Bradyrhizobium japonicum* приживатись у ризосфері сої й індукувати бульбочкоутворення. Встановлено, що як моноінокуляція цими мутантами, так і бактеризація насіння їхньою сумішшю із вихідним 646 і виробничим 6346 штамами *B. japonicum* забезпечує оптимальну азотфіксувальну активність. Здатність мікробних культур, ізольованих із бульбочок, утворених за сумісної інокуляції, рости на манітно-дріжджовому середовищі без антибіотиків та середовищі зі стрептоміцином і канаміцином засвідчує приблизно однакову участь кожної з досліджених форм ризобій в утворенні бульбочок сої.

*Ключові слова:* Tn5-мутанти, утворення бульбочок, азотфіксація, соя, антибіотики.

Однією з необхідних умов досягнення високих урожаїв бобових культур є наявність їх ефективного симбіозу з бульбочковими бактеріями. Відомо, що в ґрунтах України, де традиційно вирощують горох, конюшину, люцерну, сформувалися природні популяції відповідних цим культурам бульбочкових бактерій чисельністю  $10^4$ – $10^6$  клітин на 1 г ґрунту [7]. Згідно з експериментальними даними, успішна інокуляція бобових відбувається тоді, коли титр бульбочкових бактерій не менший за  $10^4$  клітин на 1 г ґрунту [10]. Якщо ж бобову культуру, наприклад сою, висівають у нетрадиційному для неї регіоні вперше, то специфічні ризобії в ґрунті відсутні. Тому для функціонування процесу фіксації азоту в цьому разі необхідна інокуляція інтродукованих рослин ефективними ризобіями.

Особливістю ґрунтових популяцій бульбочкових бактерій є їх висока гетерогенність та екотипний поліморфізм, зумовлений стабільним існуванням симбіотичних й асимбіотичних форм. Крім того, популяціям ризобій у ґрунті притаманна панміктичність, тобто поява великої кількості рекомбінантних форм [8, 9, 16]. Ці властивості безпосередньо пов'язані з наявністю в життєвому циклі ризобій симбіотичної взаємодії, оскільки в присутності рослини-хазяїна підвищується гетерогенність і панміктичність їх популяцій [15].

У зв'язу з тим що більшість аборигенних штамів бульбочкових бактерій мають низьку азотфіксувальну активність, але часто відзначаються високими агресивністю й конкурентоспроможністю, рослини, які взаємодіють із ними, не можуть повністю реалізувати свій потенціал продуктивності. Недостатня конкурентоспроможність виробничих штамів ризобій, що використовуються для виготовлення бактеріальних добрив під

бобові культури, є одним із основних чинників, які знижують потенційний рівень азотфіксації. Ця властивість залежить не тільки від генетичних особливостей ризобій, а й від здатності рослини-хазяїна на стадії передінфекції спрямовано взаємодіяти з певними штамми бактерій, у тім числі й тих, що рідко трапляються в популяції ризосферних ризобій [14].

У процесі інфікування бобових рослин бульбочковими бактеріями велике значення має також вірулентність останніх, тобто здатність проникати в клітини кореня, розмножуватись там і викликати утворення бульбочок [6]. Однак у природних умовах за наявності в ґрунті популяції аборигенних рас ризобій вірулентний штам, внесений у вигляді бактеріального добрива, не завжди першим інфікує рослину, оскільки місцеві ризобії через більшу пристосованість до певних умов довкілля займають домінуюче положення в ризосфері, швидше розмножуються й утворюють більшу кількість бульбочок порівняно з інтродукованими штамми [13]. Тому пошук активних штамів ризобій із задовільною конкурентоспроможністю, високими вірулентністю й азотфіксувальною активністю залишається актуальним [2, 5, 11]. Для створення нових ризобіальних штамів дослідники останнім часом поряд із класичним методом аналітичної селекції широко використовують також методи генетичної інженерії, зокрема транспозоновий мутагенез. Останнім методом ми отримали низку Tn5-мутантів високоактивного штаму *B. japonicum* 646 із різними симбіотичними властивостями [3, 4]. Із них відібрали мутанти з високими вірулентністю, конкурентоспроможністю й азотфіксувальною активністю.

Метою нашої роботи було визначення в модельних умовах взаємодії цих мутантів із вихідним штамом 646 та штамом-стандартом 6346, а також частки утворених бульбочок за інокуляції ними сої.

## Методика

Досліджуваними інокулянтами сої сорту Мар'яна були Tn5-мутанти *B. japonicum* 646 — T66 і 3-11, які в результаті мутагенезу набули стійкості до канаміцину (Km). Контролем слугували чутливі до цього антибіотику вихідний (батьківський) штам 646 і штам-стандарт 6346, який також чутливий і до стрептоміцину (Str). Сою вирощували в пластикових посудинах місткістю 3,6 кг річкового піску, куди вносили збіднену на азот (0,2 норми) і збагачену мікроелементами Mo, B, Mn, Cu поживну суміш Гельрігеля. Насіння перед висіванням стерилізували 75 %-м етанолом, промивали під проточною водою і проводили моноінокуляцію кожним згаданим інокулянтом або їх сумішшю (6346 + 646 + T66, 6346 + 646 + 3-11, 6346 + 3-11, 646 + 3-11) у співвідношенні 1:1:1 чи 1:1. Бактеріальний титр інокуляту за моно- та сумісної інокуляції становив  $10^8$  клітин на 1 мл.

Реізоляцію Tn5-мутантів і контрольних штамів із бульбочок проводили у фазу цвітіння сої за загальновідомою методикою [6]. Для ідентифікації форм ризобій, після інокуляції якими утворювалися кореневі бульбочки, водну суспензію кожної з 25 зруйнованих бульбочок, зібраних окремо з рослин усіх досліджених варіантів, висівали на манітно-дріжджовий агар (МДА) (контроль), а також на МДА + 200 мкг/мл Km, МДА + 800 мкг/мл Str і МДА + 200 мкг/мл Km + 800 мкг/мл Str. Облік результатів проводили через 8—10 діб. Азотфіксувальну активність виз-

начали ацетиленовим методом [12]. Результати аналізів оброблено статистично [1].

### Результати та обговорення

Для характеристики ефективності соєво-ризобіального симбіозу в умовах дослід у фазу цвітіння рослин визначали їх масу, нітрогеназну активність бульбочок, а також масу й кількість останніх.

З'ясовано, що в усіх варіантах дослід на цей час формувалась майже однакова надземна маса рослин — 10—11 г. Лише у варіанті з композицією трьох інокулянтів (634б + 646 + Т66) вона становила в середньому 12,1 г.

Кількість утворених на коренях бульбочок характеризувала вірулентність використаних у досліді ризобій, а їх маса в основному була прямо пов'язана з азотфіксувальною активністю останніх. Згідно з даними табл. 1, усі досліджені бульбочкові бактерії сої мають високу вірулентність. У піщаній культурі за відсутності різноманітної ґрунтової мікрофлори ризобії формували доволі великі кількість і масу бульбочок. У цьому досліді винятком був штам 634б, який індукував утворення дещо менших кількості й маси бульбочок, що зазвичай для нього нехарактерно.

Меншим кількості й масі бульбочок у цьому варіанті відповідала нижча загальна ацетиленвідновлювальна активність (табл. 2), хоча питома активність була доволі високою, що вказує на великі потенційні можливості штаму 634б. Надземна маса рослин сої та нітрогеназна активність бульбочок були найвищими у варіанті, де насіння інокулювали композицією з трьох штамів: 634б + 646 + Т66. За моноінокуляції обома Tn5-мутантами формувались бульбочки хоч і з незначною, але все-таки вищою активністю, ніж за бактеризації контрольними штамми. Слід зазначити, що в усіх варіантах дослід як за моно-, так і за комплексної інокуляції сформувались ефективні симбіотичні системи, що підтверджує досить високий рівень питомої і загальної ацетиленвідновлювальної активності (див. табл. 2).

Основне завдання цих досліджень полягало у визначенні частки участі кожної культури ризобій за сумісної інокуляції у формуванні кореневих бульбочок сої. Згідно з ефективністю симбіотичних систем, схарактеризованою за наростанням зеленої маси рослин, кількістю й масою

ТАБЛИЦЯ 1. Утворення бульбочок сої залежно від інокуляції окремими штамми ризобій та їх композиціями

Варіант	Кількість бульбочок, шт/рослину	Маса бульбочок, г/рослину
634б	49 ± 9	0,99 ± 0,10
646	78 ± 8	1,17 ± 0,12
Т66	64 ± 5	1,02 ± 0,09
3-11	67 ± 7	1,07 ± 0,07
634б + 646 + Т66	61 ± 4	1,34 ± 0,08
634б + 646 + 3-11	80 ± 2	1,34 ± 0,03
634б + 3-11	67 ± 5	1,10 ± 0,60
646 + 3-11	67 ± 12	1,70 ± 0,17

ТАБЛИЦЯ 2. Ацетиленвідновлювальна активність кореневих бульбочок сої залежно від інокуляції окремими штамами ризобій та їх композиціями

Варіант	Ацетиленвідновлювальна активність, мкмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /год	
	загальна (на 1 рослину)	питома (на 1 г бульбочок)
6346	124,60 ± 7,75	135,81 ± 6,07
646	134,10 ± 7,67	117,70 ± 10,32
T66	147,18 ± 4,76	144,17 ± 9,79
3-11	142,03 ± 8,82	129,02 ± 9,02
6346 + 646 + T66	156,32 ± 8,49	134,41 ± 13,67
6346 + 646 + 3-11	146,29 ± 9,02	112,28 ± 4,27
6346 + 3-11	135,67 ± 3,62	126,17 ± 8,02
646 + 3-11	132,96 ± 7,45	73,01 ± 5,10

бульбочок та нітрогеназною активністю, можна вважати, що використані в роботі ризобії не є антагоністами один відносно одного. Щоб визначити співвідношення бульбочок, утворених окремими культурами ризобій за змішаної інокуляції сої, відбирали всі бульбочки із 20 рослин кожного варіанта. Штам, який утворив певну бульбочку, ідентифікували за його здатністю рости на манітно-дріжджовому агаризованому середовищі, збагаченому Str концентрацією 800 мкг/мл або Km — 200 мкг/мл.

Раніше [4] встановлено, що виробничий штам 6346 чутливий до Str і Km у зазначених вище концентраціях, тому нездатний рости на МДА з цими антибіотиками. Штам-реципієнт 646, використаний у транспозоновому мутагенезі, резистентний до 800 мкг/мл Str і витримує тільки 25 мкг/мл Km, тоді як транспозанти T66 і 3-11 успадкували резистентність до Str від батьківського штаму 646 й набули стійкості до 200 мкг/мл Km за Tn5-мутагенезу (табл. 3). Ці властивості бульбочкових бактерій сої використано як маркери, що дало змогу ідентифікувати той чи інший штам, який сформував певну бульбочку.

З'ясувалося (табл. 4), що реізоляти 200 проаналізованих бульбочок (по 25 з усіх восьми варіантів досліду) на МДА без антибіотиків виростили добре і за терміном появи колоній та їхнім зовнішнім виглядом не різнилися від росту чистих культур *V. japonicum*. На МДА зі Str виростили ізоляти зі 100 % бульбочок у варіанті з моноінокуляцією штамом 646, а також мутанти T66 і 3-11, оскільки ці ризобії стійкі до даного антибіотика.

У варіанті, де бульбочки були утворені чутливим до Km і Str штамом 6346, суспензія жодної з 25 бульбочок не забезпечувала росту ризобій на МДА із Str і Km. За змішаної інокуляції композиціями різних

ТАБЛИЦЯ 3. Здатність штамів *Bradyrhizobium japonicum* рости на середовищах з антибіотиками

Варіант	МДА + 800 мкг/мл Str	МДА + 200 мкг/мл Km
6346	—	—
646	+	—
T66	+	+
3-11	+	+

Примітка: «—» чутливий до антибіотика; «+» резистентний до антибіотика.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Tn-5 МУТАНТОВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

ТАБЛИЦЯ 4. Здатність реізолятів бульбочок сої рости на середовищах з антибіотиками

Варіант	Середовище			
	МДА (контроль)	МДА + + 800 мкг/мл Str	МДА + + 200 мкг/мл Km	МДА + + 800 мкг/мл Str + + 200 мкг/мл Km
6346	25	0	0	0
646	25	25	0	0
T66	25	25	25	25
3-11	25	25	25	25
6346+646+T66	25	17	9	9
6346+646+3-11	25	19	10	10
6346 + 3-11	25	13	13	13
646 + 3-11	25	25	14	14

ТАБЛИЦЯ 5. Кількість корневих бульбочок сої, утворених культурами ризобій за інокуляції (вибірка бульбочок становила 25 для кожного варіанта)

Варіант	Кількість бульбочок, утворених штамом			
	6346	646	T66	3-11
6346 + 646 + T66	8	8	9	—
6346 + 646 + 3-11	6	9	—	10
6346 + 3-11	12	—	—	13
646 + 3-11	—	11	—	14

штамів і Tn5-мутантів кількість бульбочок, ізоляти яких росли на селективних середовищах, була різною. Так, у варіанті, де рослини були інокульовані композицією 6346 + 646 + T66, на середовищах МДА + Km та МДА + Km + Str ріст виявлено у 9 випадках із 25. Це засвідчує, що в утворенні цих бульбочок однозначно брав участь резистентний до згаданих антибіотиків транспозант T66. У цьому ж варіанті на середовищі, збагаченому 800 мкг/мл Str, вирости реізоляти із 17 бульбочок. Якщо 9 із них сформовані мутантом T66, то 8 явно походять від штаму 646. Однак це не суперечить тому, що бульбочки можуть бути утворені не одним, а двома і навіть трьома штамми ризобій. Так, якщо у формуванні бульбочки разом із мутантом T66 брав участь штам 6346, то виявити його наявність у разі застосування використаних у досліді селективних середовищ неможливо через його високу чутливість до антибіотиків. Це стосується й мутанта 3-11, який за потрійної інокуляції утворював 10 бульбочок, а за подвійної — 13. Частку участі кожної з досліджених форм бульбочкових бактерій в утворенні корневих бульбочок сої за змішаної інокуляції ілюструють дані табл. 5.

Отже, за вирощування в піщаній культурі сої, інокульованої новими Tn5-мутантами штаму *B. japonicum* 646, бактерії-інокулянти успішно приживаються в ризосфері рослини-хазяїна і стимулюють утворення такої ж кількості корневих бульбочок, як і контрольні ризобіальні штами, що підтверджується майже однаковою кількістю бульбочок, сформованих за участю цих ризобій.

1. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
2. Коць С.Я., Береговенко С.К., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов. — Киев: Наук. думка, 2007. — 315 с.
3. Маличенко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М. Эффективность симбиотических систем, utworенных за участю сои і транспозантів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 646 // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. — 2006. — Вип. 18. — С. 144—148.
4. Маличенко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М., Коць С.Я. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — 39, № 5. — С. 409—418.
5. Марьюшкин В.Ф., Даценко В.К., Курочкина Л.Л. и др. Изменчивость симбиотической азотфиксации у различных генотипов сои // Там же. — 1990. — 22, № 2. — С. 132—136.
6. Патица В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. Біологічний азот. — К.: Світ, 2003. — 422 с.
7. Патыка В.Ф., Толкачев Н.З., Шерстобоева Е.В. и др. Препараты клубеньковых бактерий для повышения урожайности бобовых культур // Україна в світових земельних, продовольчих і кормових ресурсах і економічних відносинах. Тези доп. Міжнар. конф. (Вінниця, грудень 1995). — Вінниця: Аграрна наука, 1995. — С. 313—314.
8. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Микроэволюция клубеньковых бактерий при возникновении мутантов с измененной выживаемостью в системе растение—почва // Генетика микроорганизмов. — 2003. — 39, № 12. — С. 1594—1605.
9. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. — 2000. — 36, № 12. — С. 1573—1587.
10. Самошкина В.И., Толкачев Н.З. Влияние инокуляции и азота минеральных удобрений на фиксацию соей молекулярного азота // Биологическая фиксация молекулярного азота. — К.: Наук. думка, 1983. — С. 74—76.
11. Толкачев Н.З., Сичкарь В.И. Координированная селекция сои и *Bradyrhizobium japonicum* на высокоэффективный симбиоз // Біологічні науки і проблеми рослинництва: Зб. наук. праць Уман. аграр. ун-ту. — Умань, 2003. — С. 270—276.
12. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene—ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. — 1968. — 43, N 8. — P. 1185—1207.
13. Okogun J.A., Sanginga N. Can introducer and indigenous rhizobial strains compete for nodule formation by promiscuous soybean in the moist savanna agroecological zone of Nigeria? // Biol. Fert. Soils. — 2003. — 38, N 1. — P. 26—31.
14. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнка, А. Кондороши, П. Хукаса; Рус. перевод под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. — СПб., 2002. — 567 с.
15. Schloter M., Zebuhn M., Heulin T., Hartmann A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity // FEMS Microbiol. Rev. — 2000. — 24. — P. 647—660.
16. Young J.P.W. Molecular population genetics and evolution of rhizobia // The nitrogen fixation and its research in China / Ed. G.F. Hong. — Berlin; Heidelberg: Springer—Verlag, 1992. — P. 366—381.

Отримано 06.11.2008

#### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Tn5-МУТАНТОВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* С ДРУГИМИ РИЗОБИАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ ПРИ СОВМЕСТНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ СОИ

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

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследована способность двух Tn5-мутантов штамма 646 *Bradyrhizobium japonicum* прижиться в ризосфере сои и индуцировать клубенькообразование. Установлено, что как моноинокуляция этими мутантами, так и бактериализация семян их смесью с исходным 646 и производственным 6346 штаммами *B. japonicum* обеспечивает оптимальную азотфиксирующую активность. Способность микробных культур, изолированных из клубеньков, образованных при совместной инокуляции, расти на маннитно-дрожжевой среде без антибиотиков и на среде со стрептомицином и канамицином свидетельствует о приблизительно одинаковом участии каждой из исследованных форм ризобий в образовании клубеньков сои.

INTERACTION OF Tn5-MUTANTS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* WITH OTHER RHIZOBIAL STRAINS AT COMBINED INOCULATION OF SOYBEAN

*S.M. Malichenko, V.K. Datsenko, P.M. Mamenko, S.V. Omelchuk, S.Ya. Kots*

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

Ability of two Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* strain 646 to adapt in soybean rhizosphere and induce nodulation was studied. It was established that monoinoculation with mutants as well as seeds bacterization with their joint suspension with primary strain 646 and industrial strain 634b of *B. japonicum* had ensured optimal nitrogen fixation activity. Ability of microbial cultures isolated from nodules to grow on mannitol-yeast medium without antibiotics and on medium with streptomycin and kanamycine testifies even role of each investigated rhizobia in formation of soybeans nodules.

*Key words:* Tn5-mutants, nodulation, nitrogen fixation, soybean, antibiotic.