

УДК 581.557:58.032.3

ФОРМУВАННЯ І ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМ СОЯ—*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ЗА РІЗНОГО ВОДОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

В.М. МЕЛЬНИК, С.Я. КОЦЬ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: vasyliukvm@ukr.net*

Вивчали динаміку вегетативної маси рослин, кількість, масу та азотфіксувальну активність бульбочок сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* за недостатнього водозабезпечення (30 % повної вологоємності (ПВ)) у вегетаційному експерименті. Встановлено, що всі досліджені показники у симбіотичних системах за посушливих умов знижувалися порівняно з тими, що формувалися і функціонували за оптимального поливу (60 % ПВ). Штам *B. japonicum* T21-2 позитивно впливав на азотфіксувальну активність симбіотичного апарату й ріст вегетативної маси сої порівняно з інокуляцією насіння ризобіями штаму 646 за оптимального і недостатнього водозабезпечення рослин.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, соя, симбіоз, нодуляція, азотфіксувальна активність, ефективність, водозабезпечення.

Недостатнє водозабезпечення є одним з основних лімітувальних чинників навколишнього середовища, що обмежує ріст, розвиток і продуктивність бобових культур [3, 13, 17]. Посуха негативно впливає на симбіоз останніх із бульбочковими бактеріями, порушує формування та функціонування симбіотичного апарату, внаслідок чого зменшується біологічна фіксація молекулярного азоту, що призводить до зниження врожаю зерна та погіршення його якості [12]. У результаті стресу, спричиненого водним дефіцитом, порушуються механізми кисневого контролю, що важливо для активної азотфіксації, процеси метаболізму і функціонування бульбочок, що призводить до їх передчасного старіння [7—10, 15]. Однією з відповідей симбіотичних систем на дію абіотичних стресорів, у тому числі посухи, є морфологічні модифікації структури оболонки бульбочки, які сповільнюють проникнення кисню до бактероїдів через дифузійний бар'єр [14].

Відомо, що реакція бобових рослин на посуху змінюється залежно від генотипів макро- і мікросимбіонтів. Згідно з результатами досліджень, використання ефективних штамів бульбочкових бактерій сприяє підвищенню біологічної фіксації азоту в умовах дії стресових чинників [16, 17]. Вивчення фізіологічних відмінностей стійкості організмів до дії несприятливих чинників, зокрема таких, як водний дефіцит, дасть змогу створити нові високопродуктивні комплементарні пари ризобії—бобові рослини.

Отже, дослідження механізмів реакції рослин-партнерів симбіозу на дію водного стресу необхідні для контролю і поліпшення їхніх агрономічних характеристик, а також актуальні у зв'язку з глобальним потеплінням клімату.

Метою цієї роботи було вивчення впливу різних за активністю штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* на наростання вегетативної маси рослин, кількість, масу та азотфіксувальну активність бульбочок сої за умов недостатнього водозабезпечення.

Методика

Об'єктами дослідження слугували симбіотичні системи, створені за участю рослин сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Васильківська (селекція Селекційно-генетичного інституту—Національного центру насіннезнавства та сортовивчення, Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ НАН України) й Інституту землеробства НААН України) і різних за активністю бульбочкових бактерій *B. japonicum*.

Рослини сої вирощували по 8 у 16-кілограмових посудинах Вагнера, попередньо простерилізованих 20 %-м розчином H_2O_2 , на промитому річковому піску, за природного освітлення та оптимального (60 % ПВ) і недостатнього (30 % ПВ) водозабезпечення. Джерелом мінерального живлення була суміш Гельригеля [1], що містила 0,25 норми азоту (повна норма азоту становить 0,708 г $Ca(NO_3)_2$ на 1 кг субстрату), в яку добавляли мікроелементи.

Бульбочкові бактерії вирощували на манітно-дріжджовому агарі (МДА) у термостаті протягом 8 діб за температури 28 °С. Мікроорганізми з поверхні МДА змивали стерильною водопровідною водою. Насіння сої стерилізували протягом 15 хв 70 %-м розчином етанолу, потім промивали протягом 1 год під проточною водою. Насіння інокулювали зволоженням його упродовж 1 год бактеріальною суспензією концентрацією 10^8 кл/мл і висівали в субстрат. У роботі використано бульбочкові бактерії *B. japonicum*, різні за азотфіксувальною (АФА) та нодуляційною активностями: штами 646 (активний, вірулентний), 604к (неактивний, високовірулентний) і Tn5-мутанти, отримані внаслідок транспозонового мутагенезу *B. japonicum* 646 [4]: T21-2 (активний, вірулентний) та 113 (малоактивний, вірулентний). Ризобії взято з музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України.

Модельну посуху (30 % ПВ) створювали, починаючи з фази двох справжніх листків за допомогою контрольованого поливу упродовж 16 діб, після чого полив відновлювали до рівня оптимальної вологості субстрату (60 % ПВ). Рослини для аналізу відбирали у фази двох справжніх листків (до посухи), трьох справжніх листків, бутонізації, цвітіння (відповідно 3-тя, 10-та і 16-та доби посухи). Контролем слугували рослини відповідних варіантів, вирощені за оптимального водозабезпечення.

Азотфіксувальну активність кореневих бульбочок визначали ацетиленовим методом [11] на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США) у чотириразовій повторності.

Біометричні показники — масу рослин і масу бульбочок — вимірювали у шести—дев'ятиразовій повторності.

Усі результати оброблено статистично за загальноприйнятою методикою [2]. В таблицях наведено середньоарифметичні дані та їх стандартні похибки.

Результати та обговорення

Протягом усього періоду спостереження кількість бульбочок, сформованих на коренях сої різними за активністю мікросимбіонтами в умовах недостатнього поливу, була меншою, ніж у відповідних рослин, вирощених за оптимального водозабезпечення (табл. 1). При цьому з наростанням посухи різниця в кількостях сформованих бульбочок у рослин усіх дослідних варіантів помітно зростала порівняно з контрольними.

За нодуляційною активністю найчутливішими до стресу виявилися штами *V. japonicum* 604к і T21-2: кількість бульбочок, утворених ними за 30 % ПВ була меншою, ніж у варіанті з 60 % ПВ (відповідно в 1,5—1,6 раза на 3-тю і в 1,9—2,1 раза на 16-ту добу посухи) (див. табл. 1). В умовах недостатнього водозабезпечення на коренях сої, інокульованої Tn5-мутантом 113, кількість сформованих бульбочок була лише в 1,1—1,3 раза меншою порівняно з рослинами, вирощеними за оптимального поливу. Це означає, що посуха чинила найменший негативний вплив на нодуляційну активність цих ризобій. Виявлено, що за 30 % ПВ бульбочки на коренях рослин наростали протягом усього періоду спостереження.

За недостатнього водозабезпечення рослин сої (30 % ПВ) маса бульбочок на їх коренях була меншою, ніж на коренях рослин, вирощених за оптимального поливу (60 % ПВ) (табл. 2). Протягом дослідженого періоду найбільший приріст маси бульбочок за 60 % ПВ давала обробка штамами T21-2 і 646. Встановлено, що за 30 % ПВ маса бульбочок, сформованих *V. japonicum* 646, зменшувалася в 1,8 і 1,6 раза, а штамом T21-2 — у 2,6 і 3,3 раза відповідно на 10- і 16-ту доби посухи порівняно з рослинами, вирощеними за 60 % ПВ (див. табл. 2).

Відомо, що на інфікування бобових рослин бульбочковими бактеріями впливає здатність останніх проникати в тканину кореня і розмножуватися в ній [5]. Ймовірно, посуха пригнічувала цей процес, унаслідок чого кількість і маса бульбочок, сформованих на коренях рослин за недостатнього поливу, зменшувалися порівняно з контрольними варіантами.

ТАБЛИЦЯ 1. Кількість бульбочок (шт/рослину) на коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями *V. japonicum* за різного водозабезпечення

Варіант	До посухи	Тривалість посухи, доба		
		3-тя	10-та	16-та
60 % ПВ				
646	15,0±0,7	19,0±0,6	27,5±1,2	38,3±1,4
604к	23,0±1,1	32,3±0,9	80,0±5,5	114,0±5,8
113	12,0±0,4	20,0±0,6	26,3±1,2	33,3±1,4
T21-2	16,0±0,7	24,3±0,9	38,3±4,3	48,0±1,5
30 % ПВ				
646	—	15,7±0,9	25,2±1,1	27,3±1,4
604к	—	21,7±0,9	44,0±1,2	60,3±2,6
113	—	15,0±0,6	23,0±1,1	28,7±0,9
T21-2	—	14,7±0,3	21,3±0,8	23,0±0,6

ТАБЛИЦЯ 2. Динаміка маси бульбочок (г сухої речовини/рослину) на коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями *V. jarrowii* за різного водозабезпечення

Варіант	До посухи	Тривалість посухи, доба		
		3-тя	10-та	16-та
60 % ПВ				
646	0,010±0	0,014±0,001	0,023±0,003	0,050±0,007
604к	0,005±0	0,010±0	0,014±0	0,029±0,001
113	0,005±0	0,007±0,001	0,018±0,002	0,051±0,008
T21-2	0,007±0	0,008±0,001	0,042±0,004	0,073±0,005
30 % ПВ				
646	—	0,008±0	0,013±0,001	0,032±0,005
604к	—	0,007±0	0,009±0,001	0,016±0,001
113	—	0,006±0	0,012±0,001	0,022±0,002
T21-2	—	0,008±0	0,016±0,002	0,022±0,004

З літератури відомо, що водний дефіцит обмежує симбіотичну азотфіксацію у бобових, що негативно впливає на функціонування симбіотичних систем і призводить до зниження їх продуктивності [3, 16, 17]. У результаті досліджень ми виявили значне зменшення АФА у рослин, вирощених за умов недостатнього поливу (табл. 3). Так, за 30 % ПВ у варіантах з інокуляцією сої штамом T21-2 АФА кореневих бульбочок протягом усього досліджуваного періоду зменшувалася у 2,3—6,5 раза порівняно з рослинами, інокульованими цим же штамом, але вирощеними за нормального водозабезпечення (60 % ПВ). Бактеризація насіння *V. jarrowii* 646 за аналогічних умов призводила до зниження АФА у 2,1—6,5 раза.

Між нодуляційною та азотфіксувальною активностями бульбочкових бактерій не завжди існує прямий зв'язок. Так, за дефіциту вологи

ТАБЛИЦЯ 3. Динаміка загальної азотфіксувальної активності (мкмоль C_2H_4 /(рослину · год)) кореневих бульбочок сої, інокульованої бульбочковими бактеріями *V. jarrowii* за різного водозабезпечення

Варіант	До посухи	Тривалість посухи, доба		
		3-тя	10-та	16-та
60 % ПВ				
646	0	0,033±0,001	0,041±0,01	0,415±0,093
604к	0	0	0	0
113	0	0,004±0	0,030±0,003	0,123±0,025
T21-2	0	0,014±0,001	0,202±0,019	0,771±0,095
30 % ПВ				
646	—	0,005±0	0,019±0,005	0,069±0,014
604к	—	0	0	0
113	—	0,001±0	0,006±0,001	0,011±0,001
T21-2	—	0,006±0	0,024±0,004	0,118±0,001

АФА бульбочок, сформованих штамом Т21-2, на 10-ту добу посухи була більшою на 26 %, на 16-ту добу — на 71 % порівняно з відповідними варіантами з інокуляцією насіння *V. japonicum* 646 (див. табл. 3). Аналогічну тенденцію спостерігали і за оптимального поливу. Проте за посушливих умов за кількістю сформованих на коренях сої бульбочок *V. japonicum* Т21-2 поступався штаму 646 (див. табл. 1).

Недостатнє водозабезпечення у бобово-ризобіальних системах призводить до порушення експресії генів і перебігу основних метаболічних процесів у рослинах, таких як зміни функціонування фотосинтетичного апарату, азотного й вуглецевого обміну [3, 12, 13]. Надмірне внутрішньоклітинне генерування активних форм кисню, зумовлене водним дефіцитом, ініціює зміни в роботі антиоксидантної системи захисту і може призвести до окиснювального «вибуху» і навіть до загибелі клітин [7, 8]. Через усе це недостатньою мірою реалізується генетичний потенціал продуктивності рослин — макропартнерів симбіозу, що спричинює зменшення кількості та погіршення якості врожаю.

Головним критерієм у селекції ризобій є їх здатність формувати ефективний симбіоз із бобовими культурами, що визначається насамперед збільшенням продуктивності останніх порівняно з використанням виробничих штамів бульбочкових бактерій. Тому важливим завданням є отримання нових штамів ризобій із поліпшеними симбіотичними властивостями, які виявляються за різних умов вирощування рослини-хазяїна, у тому числі й за недостатнього водозабезпечення.

Виявлено зменшення надземної маси рослин залежно від генотипу мікросимбіонта та умов водного дефіциту (табл. 4). Так, на 10-ту добу посухи надземна маса рослин, вирощених за 30 % ПВ, була в 1,1–1,2 раза меншою порівняно з контрольними (60 % ПВ). У міру наростання водного дефіциту ця різниця збільшувалась і на 16-ту добу посухи зростала до 1,5–1,7 раза.

Найбільший приріст надземної маси рослин як за оптимальних, так і за посушливих умов, отримано в результаті бактеризації насіння штамом Т21-2: на 16-ту добу посухи він був більший, відповідно 33 і 25 % відносно варіанта із інокуляцією сої *V. japonicum* 646.

Таким чином, недостатнє водозабезпечення (30 % ПВ) негативно впливає на процеси формування та функціонування симбіотичних систем соя—*V. japonicum*. Посуха пригнічувала ріст кореневих бульбочок, азотфіксувальну активність симбіотичного апарату та наростання вегетативної маси рослин.

Симбіотичні системи, створені за участю штамів і Тn5-мутантів, які відрізнялися за симбіотичними властивостями, по-різному реагували на умови недостатнього водозабезпечення. Так, за нодуляційною активністю та масою сформованих на коренях бульбочок штамів Т21-2 і 604к виявилися найчутливішими до посухи з усіх досліджених. Водночас *V. japonicum* Т21-2 мав найвищу АФА і сприяв істотному приросту вегетативної маси за стресових умов вирощування сої. Оскільки штам Т21-2 є висококомплементарним до сої сорту Васильківська [6], ймовірно, метаболічні процеси у симбіотичних системах, створених за участю цих партнерів, відбувалися активніше. Отже, незважаючи на меншу інтенсивність бульбочкоутворення, штам Т21-2 за недостатнього водозабезпечення посилював азотфіксацію та наростання маси рослин.

За кількістю утворених бульбочок Тn5-мутант 113 виявився на рівні варіанта з використанням штаму *V. japonicum* 646, але АФА

ТАБЛИЦЯ 4. Динаміка вегетативної маси (г сухої речовини/рослину) сої, інкульованої бульбачковими бактеріями В. жароїсит за різного водозабезпечення

Варіант	До посухи		Тривалість посухи, доба					
	Надземна частина	Корінь	3-тя		10-га		16-га	
			Надземна частина	Корінь	Надземна частина	Корінь	Надземна частина	Корінь
			60 % ПВ					
646	0,51±0,02	0,08±0	1,14±0,05	0,17±0,01	1,41±0,08	0,42±0,02	2,08±0,06	0,66±0,03
604к	0,49±0,02	0,08±0	0,82±0,04	0,14±0,01	1,18±0,03	0,45±0,02	1,72±0,07	0,55±0,02
113	0,47±0,02	0,07±0	1,00±0,04	0,15±0,01	1,36±0,06	0,42±0,02	1,92±0,06	0,66±0,03
T21-2	0,50±0,02	0,07±0	1,37±0,07	0,21±0,01	1,46±0,07	0,43±0,02	2,77±0,12	0,76±0,03
			30 % ПВ					
646	—	—	1,17±0,05	0,17±0,01	1,18±0,05	0,41±0,01	1,37±0,06	0,39±0,02
604к	—	—	1,03±0,05	0,12±0,01	1,00±0,04	0,23±0,01	1,10±0,05	0,32±0,01
113	—	—	0,99±0,04	0,15±0,01	1,09±0,05	0,31±0,01	1,12±0,04	0,32±0,01
T21-2	—	—	1,42±0,06	0,17±0,01	1,29±0,05	0,46±0,01	1,71±0,06	0,51±0,02

симбіотичних органів, утворених за його участю за посушливих умов, була найнижчою порівняно з аналогічними варіантами за оптимального водозабезпечення. За недостатнього поливу в разі бактеризації сої штамом 646 отримували найбільший приріст кількості та маси бульбочок, проте АФА кореневих бульбочок, ним сформованих, і вегетативна маса рослин поступалися цим показникам при використанні штаму Т21-2.

У результаті проведених досліджень ми встановили, що за водного дефіциту 30 % ПВ протягом вегетації пригнічувалось наростання бульбочок на коренях сої, а також знижувались продуктивність вегетативної маси та азотфіксувальна активність симбіотичного апарату, утвореного за участю штамів і Тn5-мутантів *V. japonicum*, що відрізнялися за симбіотичними характеристиками. Показано, що зі збільшенням тривалості недостатнього водозабезпечення різниця за цими показниками у дослідних рослин помітно зростала порівняно з відповідними контрольними варіантами.

Відомо, що одним з інтегральних показників ефективності формування і функціонування симбіозу між бобовими рослинами і бульбочковими бактеріями є вегетативна маса рослин. Оскільки *V. japonicum* Т21-2 висококомплементарний до сої сорту Васильківська [6], його використання як штаму-інокулянта виявилось ефективнішим порівняно з варіантами з бактеризацією насіння ризобіями штаму 646 як за оптимальних, так і за посушливих умов вирощування. Соя — високоспецифічна культура за відношенням до штамів бульбочкових бактерій. Ефективність функціонування її симбіотичної системи та реалізація високого потенціалу продуктивності за умов водного дефіциту можуть бути пов'язані з комплементарністю рослин певного сорту до того чи іншого штаму ризобій. Тому при вирощуванні сої за недостатнього водозабезпечення одним із дієвих заходів зменшення депресивного впливу посухи на ефективність симбіозу може слугувати інокуляція активними комплементарними штамми *V. japonicum*.

1. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1964. — 388 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
3. Коць С.Я., Михалків Л.М. Физиология симбиоза та азотне живлення люцерни. — К.: Логос, 2005. — 299 с.
4. Маліченко 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. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. — СПб.: Наука, 1998. — 194 с.
6. Патент № 64086 на корисну модель «Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* Т21-2 (ІМВ В-7322) для одержання бактеріального добрива під сою» / С.Я. Коць, Н.А. Воробей, П.М. Маменко, С.М. Маліченко, Р.А. Якимчук, заявл. 18.04.11. — Опубл. 25.10.11, Бюл. № 20.
7. Apel A., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. — 2004. — 55. — P. 373—399.
8. Becana M., Dalton D.A., Moran J.F. et al. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules // Physiol. Plant. — 2000. — 109, N 4. — P. 372—381.
9. Dalton D.A., Joyner S.L., Becana M. et al. Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules // Plant Physiol. — 1998. — 116. — P. 37—43.
10. Esfahani M.N., Mostajeran A. Rhizobial strain involvement in symbiosis efficiency of chickpea-rhizobia under drought stress: plant growth, nitrogen fixation and antioxidant enzyme activities // Acta Physiol. Plant. — 2011. — 33. — P. 1075—1083.

11. 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. — **43**, N 8. — P. 1185—1207.
12. Kots S.Ya., Mykhalkiv L.M., Mamenko P.M., Volkogon M.V. The study of alfalfa — *Sinorhizobium meliloti* symbiosis productivity under different water conditions and the influence of the legume seed lectin // *J. of Agricult. Sci. Technol. B 1.* — 2011. — N 3. — P. 454—457.
13. Marino D., Frendo P., Ladreza R. et al. Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? // *Plant Physiol.* — 2008. — **143**. — P. 1968—1974.
14. Matamoros M.A., Baird L.M., Escuredo P.R. et al. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical and structural alternation // *Plant Physiol.* — 1999. — **121**. — P. 97—111.
15. Matamoros M.A., Dalton D.A., Ramos J. et al. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis // *Plant Physiol.* — 2003. — **133**. — P. 449—509.
16. Serraj R., Sinclair T.R., Purcell L.C. Symbiotic N₂ fixation response to drought // *J. Exp. Bot.* — 1999. — **50**. — P. 143—155.
17. Zahran H.H. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1999. — **63**. — P. 968—989.

Отримано 14.09.2015

ФОРМИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОЯ—*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ПРИ РАЗНОМ ВОДОБЕСПЕЧЕНИИ

В.Н. Мельник, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Изучали динамику вегетативной массы растений, количество, массу и азотфиксирующую активность клубеньков сои, инокулированной разными по симбиотическим свойствам штаммами и Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* при недостаточном водобеспечении (30 % полной влагоемкости (ПВ)) в вегетационном эксперименте. Установлено, что все исследованные показатели в симбиотических системах в условиях засухи снижались по сравнению с теми, которые формировались и функционировали при оптимальном поливе (60 % ПВ). Штамм *B. japonicum* T21-2 положительно влиял на азотфиксирующую активность симбиотического аппарата и рост вегетативной массы сои по сравнению с инокуляцией семян ризобиями штамма 646 при оптимальном и недостаточном водобеспечении растений.

FORMATION AND FUNCTIONING OF THE SYMBIOTIC SYSTEMS SOYBEAN—*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* UNDER DROUGHT

V.M. Melnyk, S.Ya. Kots

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

The plant biomass production, the number, weight and nitrogen-fixing activity of soybean nodules formed by strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with different symbiotic properties under drought (30 % of full water supply (FWS)) in pot experiment were studied. It was shown that water stress decreased all this parameters in symbiotic systems compared to those that formed and functioned under optimal water supply (60 % FWS). Application of strain *B. japonicum* T21-2 caused positive effect on nitrogen-fixing activity of the symbiotic systems and plant biomass production in soybean compared with inoculation of the seeds by strain 646 under optimal and insufficient water supply.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, symbiosis, nodulation, nitrogen fixation, efficiency, drought.