УДК 579.2.871.155.

СТРАТЕГІЯ ДОБОРУ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ЗА ПОЛІПШЕНИМ СИМБІОТИЧНИМ ФЕНОТИПОМ

Н.А. ВОРОБЕЙ, С.Я. КОЦЬ

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

На основі аналізу відомих методів добору активних штамів ризобій представлено стратегію первинного скринінгу за симбіотичними властивостями бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* в умовах модельних вегетаційних дослідів за природних освітлення і температури. Сою сорту Лісабон інокулювали мутантами *B. japonicum*, отриманими методом транспозонового мутагенезу за використання плазмідного вектора pSUP5011::Tn5. Наведено результати селекції ризобій за господарсько-корисними властивостями (вірулентність, нодуляція, азотфіксувальна активність, стимуляція росту надземної маси рослин сої). Виявлено відмінності між транспозоновими мутантами *B. japonicum* за здатністю викликати утворення бульбочок на коренях рослини-хазяїна, динамікою та інтенсивністю асиміляції атмосферного азоту симбіотичними системами соя—ризобії. Зазначено доцільність проведення селекції мікросимбіонтів не лише у ранній період формування симбіотичних систем сої, а й у найактивнішу фазу їх функціонування. Це забезпечує можливість добору штамів із різними типами динаміки азотфіксувальної активності, найагресивніших та високовірулентних штамів у період становлення симбіозу. Відібрано Tn5-мутанти з поліпшеним симбіотичним фенотипом порівняно зі штамом-контролем *Bradyrhizobium japonicum* 634б.

Ключові слова: соя, симбіоз, азотфіксація, бульбочкові бактерії, *Bradyrhizobium japonicum*, азот, ефективність.

Ґрунтові бактерії, насамперед ризобії, у симбіозі з бобовими рослинами фіксують молекулярний азот атмосфери та перетворюють його на сполуки, здатні легко засвоюватися живими організмами, а також продукують фізіологічно активні речовини, що сприяє збільшенню врожаю сільськогосподарських культур [1, 2]. Ефективність бобово-ризобіального симбіозу підвищується, з одного боку, селекцією сучасних сортів, здатних до активного бульбочкоутворення [3, 4], а з іншого — добором нових штамів (створених різними методами) бульбочкових бактерій з високою азотфіксувальною активністю [1, 5].

Нині для експрес-тестування й добору найактивніших форм бульбочкових бактерій запропоновано низку культурально-біохімічних ознак ризобій у чистій культурі, але часто вони не виявляють позитивної кореляції з азотфіксувальною активністю штаму в

© Н.А. ВОРОБЕЙ, С.Я. КОЦЬ, 2018

симбіозі [6]. Зокрема між вмістом у клітинах деяких біополімерів (РНК, ДНК, полісахаридів, ліпідів, волютину, полі-β-оксимасляної кислоти та ін.) і симбіотичною ефективністю штамів ризобій у низці випадків встановлено лише позитивну тенденцію, тому пошук надійних (вивірених) критеріїв при залученні різних методів триває [6, 7].

Відомо, що більшість симбіотичних генів бульбочкових бактерій перебуває в неактивному стані й функціонує лише за умови симбіозу з бобовою рослиною [8, 9]. Зазвичай попередньо властивості штамів швидкорослих бульбочкових бактерій в лабораторних умовах оцінюють на підставі визначення маси та ацетиленредуктазної активності інфікованих бактеріями рослин на ранніх стадіях формування симбіозу. Рослини вирощують у стерильних умовах на агарі, фільтрувальному папері, вермикуліті та вермикуліті з піском [10, 11]. Як правило, використовують бобові рослини різного віку без урахування видових особливостей тривалості розвитку та функціонування їх симбіотичного апарату.

Спосіб добору бульбочкових бактерій для швидкого попереднього оцінювання симбіотичних властивостей ризобій, а також сортів і ліній люцерни, розроблений у ВНДІ сільськогосподарської мікробіології (ДНУ ВНДІСГМ, Санкт-Петербург, Пушкін), успішно використовується лише за інокуляції дрібнонасіннєвих бобових культур за вирощування на безазотистому середовищі Красильникова—Кореняко. Згідно з цією методикою, ефективність штамів визначається за біомасою інокульованих 30-добових рослин за відношенням до неінокульованих, при цьому приріст має становити не менш як 60—70 % [12].

Федоров та співавт. розробили також експрес-метод визначення азотфіксувальної активності (АфА) на ранньому етапі розвитку бобово-ризобіального симбіозу в стерильних умовах лабораторного досліду [12]. За цим методом ми успішно провели селекцію та відібрали високоактивні Tn5-мутанти *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* та *Sinorhizobium meliloti* [13]. Для зернобобових культур, до яких належить соя, ці методи непридатні (майже не застосовуються), оскільки запас азоту в насінні дає змогу рослинам успішно долати перші стадії вегетативного розвитку без включення нітрогеназного комплексу бульбочок, сформованих за участю специфічних повільнорослих бульбочкових бактерій. У зв'язку з цим селекція та добір активних форм бульбочкових бактерій, зокрема *B. japonicum*, залишається достатньо тривалим і трудомістким процесом, оскільки потребує оцінювання значної кількості штамів ризобій за комплексом симбіотичних властивостей, за реалізацію яких відповідають різні гени як мікро-, так і макросимбіонта. Методично вдало проведений первинний добір бульбочкових бактерій за поліпшеним симбіотичним фенотипом дає змогу забезпечити генетичний фонд ефективних мікросимбіонтів для бобових рослин.

На прикладі отриманих нами Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum*, які зберігаються в музейній колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики (ІФРГ) НАН Ук-

раїни, запропоновано стратегію добору бульбочкових бактерій сої за поліпшеними симбіотичними властивостями.

Методика

До первинного скринінгу за симбіотичними властивостями залучені бульбочкові бактерії сої, отримані нами методом неспецифічного транспозонового мутагенезу (внаслідок міжродової кон'югації між *Escherichia coli* S17-1 (pSUP5011::Tn5*mob*) і штамами 646, 634б *Bradyrhizobium japonicum*. Tn5-мутанти штаму 646 *B. japonicum* — В74, В75, В77, В78, В79, В80, В81, В82, В85, В87, В93, В94, В128, В130, В131, В132, В133, В135, В137, В143, В144, В145, В146, В149, В155, В157, В158, В159, В164, В165, В168А, В173 та Tn5-мутанти штаму 634б *B. japonicum* — Д1, Д33, Д34, Д35, Д36, Д37, Д38, Д39 унаслідок кон'югації з *E. coli* набули здатності до репродукції на селективному середовищі МДА + Km (200 мкг/мл), чим вони відрізняються від вихідних батьківських штамів.

З метою відновлення фізіологічної активності після зберігання в умовах музею за +4 °С бульбочкові бактерії вирощували у біологічних пробірках на середовищі манітно-дріжджовий агар (МДА), г/л: K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,1; маніт — 10,0; дріжджовий екстракт — 0,5; агар — 15,0—17,0, дистильована вода, pH 6,8—7,0 протягом 7—8 діб за 28 °С.

Для приготування водних суспензій бульбочкових бактерій у стерильних умовах ламінарного боксу з поверхні агаризованого манітно-дріжджового середовища відбирали 1 мікробіологічну петлю біомаси бактерій, вміщували в пробірку зі стерильною водопровідною водою (5 мл), суспендували до однорідної консистенції (оскільки бульбочкові бактерії сої продукують важкорозчинні у воді екзополісахариди). Водні суспензії бактерій (інокулянт) вирівнювали між собою в межах досліду за стандартом каламутності добавлянням необхідної кількості води й готували потрібні розбавляння. Насіння сої інокулювали водними суспензіями бульбочкових бактерій із титром 10^7 клітин/мл.

Досліди проводили з рослинами сої (*Glycine max* L. (Merill)) сорту Лісабон (AgReliant Genetics Inc., Pain Court, Canada) раннього дозрівання (90—105 діб), маса 1000 насінин 190 г. Насіння сої перед посівом стерилізували 70 %-м етанолом упродовж 15 хв, промивали під проточною водою. Для інокуляції насіння одного варіанта досліду (150 насінин) витрачали 3 мл водної суспензії ризобій, що забезпечувало бактеріальне навантаження 200 тис. клітин ризобій на 1 насінину.

Вегетаційні досліди проводили на спеціально обладнаному майданчику ІФРГ НАН України. Пластикові посудини стерилізували 20 %-м розчином H_2O_2, заповнювали річковим піском (3,8 кг), додавали розчини макро- і мікроелементів та 0,25 норми мінерального азоту за Гельригелем [14]. У посудинах вирощували по 8 рослин сої за вологості піску 60 % повної вологоємності й природного освітлення (рис. 1). Контролем слугував варіант досліду з передпосівною бактеризацією насіння сої виробничим штамом *B. japonicum* 634б. Повторність досліду за варіантами п'ятиразова.

Азотфіксувальну активність кореневих бульбочок визначали ацетиленовим методом Харді [15] і виражали в мікромолях етилену, ут-

Рис. 1. Загальний вигляд вегетаційного досліду. Рослини сої у фазу бутонізація—початок цвітіння

вореного бульбочками однієї рослини за 1 год. Газову суміш аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6855 Network GC System (визначення проводили у чотириразовій повторності).

В умовах первинного скринінгу ефективність інокуляції ризобіями зазвичай встановлюють за стимуляцією росту вегетативних органів рослин. Біометричні показники — маси сирої речовини надземної частини рослин, коренів і бульбочок визначали у десятиразовій повторності у фази початок утворення 3-го справжнього листка (I відбір) та бутонізації—початку цвітіння сої (II відбір). Слід зазначити, що у фінальних дослідженнях (за ступеневої селекції) ефективність бобово-ризобіального симбіозу встановлюють за урожаєм зерна сої та його якісними показниками.

Експериментальні дані оброблено статистично з використанням програми Microsoft Excel 2010. Отримані числові значення показників перераховано у відсотки відносно контролю й наведено на гістограмах і в таблиці.

Результати та обговорення

У процесі інфікування кореневої системи бобових рослин важливе значення має вірулентність бульбочкових бактерій. Якщо специфічністю визначається спектр ризобій, то вірулентність характеризує активність їх дії в межах певного спектра. Під вірулентністю розуміють здатність бульбочкових бактерій проникати в тканину кореня, розмножуватися там і спричинювати утворення бульбочок. Вірулентність досліджуваних ризобій визначали за кількістю ініційованих бульбочок різних за розміром (від ледве помітних візуально до повноцінно сформованих).

На 25-ту добу після появи сходів (фаза розвитку початок утворення 3-го справжнього трійчастого листка) Tn5-мутанти *B. japonicum* виявили вірулентність, тобто були здатні утворювати бульбочки на коренях сої. У цей період та у фазу бутонізації—початку цвітіння виявлено істотні відмінності між рослинами залежно від використаного для бактеризації насіння Tn5-мутанта *B. japonicum* за кількістю й розміщенням кореневих бульбочок: а) оптимальна кількість бульбо-

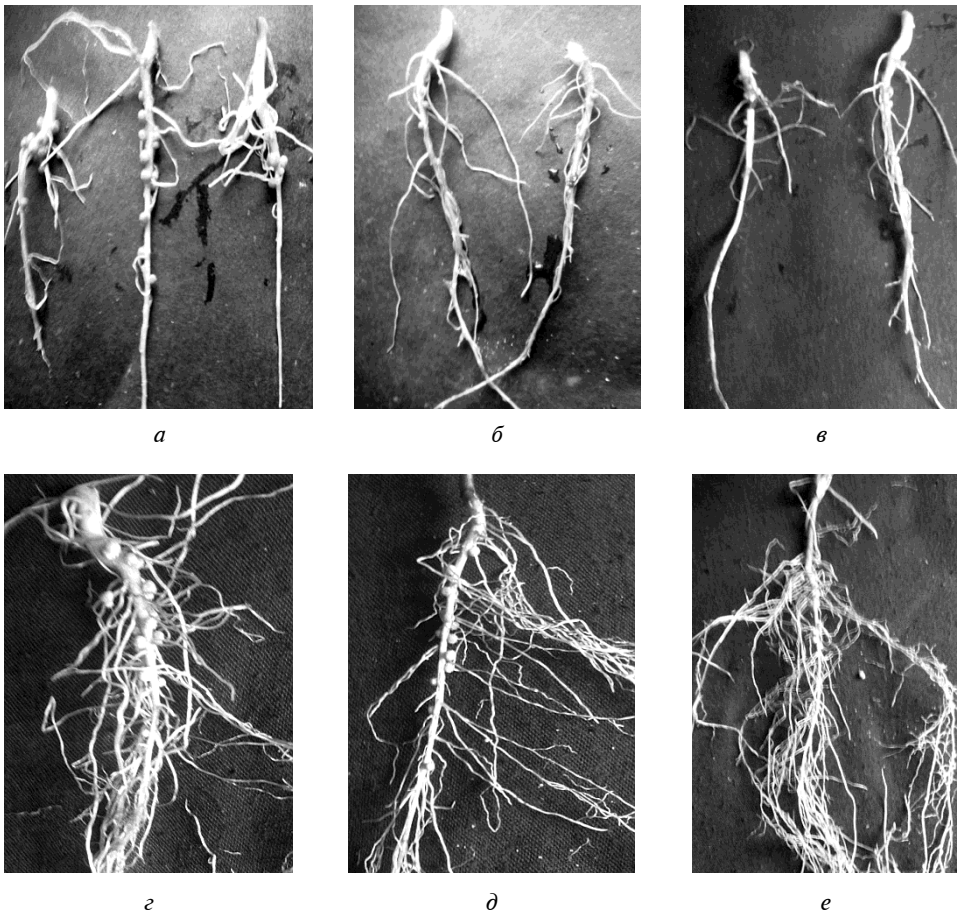

Рис. 2. Формування бульбочок на коренях сої залежно від досліджуваного Tn5-мутанта *B. japonicum* у фази початок утворення 3-го справжнього листка (*а—в*), бутонізація—початок цвітіння (*г—е*)

чок, що розміщені переважно на головному корені, зазвичай ближче до його базальної частини; б) дрібні бульбочки, сформовані вздовж головного кореня; в) поодинокі дрібні бульбочки на головному й бічних коренях (рис. 2).

На основі визначених показників нодуляції (кількість і маса бульбочок, сформованих на коренях рослин) у різні фази розвитку сої здійснено розподіл Tn5-мутантів *B. japonicum* на групи (таблиця). У фазу початку утворення 3-го справжнього листка сої мутант В75 переважав штам 634б за вірулентністю на 25 %, в інших 17 мутантів ця здатність була на рівні контролю. У 10 досліджених ризобій цей показник був нижчим більш як на 40 %, у 9 мутантів *B. japonicum* — більш як на 50 %. Tn5-мутанти Д38 та В129 спричинили появу лише поодиноких бульбочок. У рослин, інокульованих *B. japonicum* В159 і Д34, у цей період кореневі бульбочки не утворились (див. таблицю). Отже, в ранній період формування симбіотичної системи можна виявити ризобії з високою вірулентністю, а також зі сповільненою здатністю проникнення до кореневих волосків сої. У фазу бутонізації—початку цвітіння сої інтенсивність нодуляції посилювалась,

Кількісний розподіл Tn5-мутантів B. japonicum у групах за симбіотичними показниками

Симбіотичний показник	Кількість Tn5-мутантів						
	Показник більший за контрольний			Показник на рівні контрольного	Показник менший за контрольний		Примітка
	понад 100 %	понад 50 %	понад 20 %		понад 20 %	понад 50 %	
Вірулентність, I відбір	0	0	1(B75)	17	10	9	У Tn5-мутантів Д38, B129 — поодинокі бульбочки, у B159, Д34 — відсутні бульбочки
Вірулентність, II відбір	4	11	7	16	4	0	
Маса бульбочок, I відбір	0	3 (B75, Д87, B128)	6 (B81, B94, B131, B137, B139, B157)	17	12	3	
Маса бульбочок, II відбір	0	3 (B130, B140, B157)	6 (Д37, Д87, B78, B94, B131, B157)	13	7	11	У Tn5-мутантів Д34, B159 — знижена на 80 %
АфА, I відбір	5 (Д87, B75, B94, B144, B154)	5 (B78, B81, B130, B131, B137)	1 (B157)	11	10	10	
АфА, II відбір	1 (B157)	4 (B78, Д87, B130, B166)	6 (B79, B139, B140, B154, B144, B163)	17	7	4	У Tn5-мутантів Д34, Д38, B129 — знижена у 8,3—9,8 раза

як наслідок, на коренях усіх досліджених рослин сформувались бульбочки. При цьому у 16 варіантах показник вірулентності Tn5-мутантів був на рівні контролю, у 4 мутантів — нижчим більш як на 20 %. За здатністю утворювати бульбочок більше від контролю понад 100 % відібрано 4 мутанти, понад 50 % — 11, понад 20 % — 7, що сукупно становило 22 високовірулентних Tn5-мутанти *B. japonicum* у фазу бутонізації—початку цвітіння рослин (див. таблицю). Проте вірулентність ризобій повною мірою не визначає в подальшому їх симбіотичної активності.

Значна кількість кореневих симбіотичних органів (бульбочок) може бути ініційована як ефективними, так і мало- й неефективними за нітрогеназною активністю бульбочковими бактеріями [16]. Тому наступним етапом у стратегії добору активних ризобій обов'язковим є визначення показника загальної маси (г/рослину) кореневих бульбочок, утворених за їх участю. Показник «маса бульбочок» по суті є інтегральним на етапі формування симбіотичної системи як результат вияву таких властивостей ризобій, як адаптаційна здатність до навколишнього середовища, агресивність, рухливість, вірулентність та ін. За розміром та загальною масою бульбочок на коренях рослин можна спрогнозувати потенційний рівень азотфіксувальної активності ризобій.

У фазу початку утворення 3-го справжнього листка у рослин, насіння яких було бактеризоване мутантами В75 (дібраний як високовірулентний), Д87 і В128, маса сформованих бульбочок була більшою на 60—90 % від контрольних значень, а бактеризованого мутантами В81, В94, В131, В137, В139, В157 — на 23,3—37,0 %. Низка мутантів ініціювала наростання маси бульбочок на рівні контрольних або нижчих показників.

Аналогічно проаналізовано масу бульбочок у фазу бутонізації—початку цвітіння рослин (див. таблицю). У варіантах за інокуляції насіння сої мутантами В130, В140, В157 маса бульбочок збільшилася на 54,6—75,8 %, а за інокуляції Tn5-мутантами Д37, Д87, В78, В94, В131, В143 — на 21,1—49,9 % порівняно з контролем. У 13 мутантів виявлено нодуляцію на рівні контрольних рослин, у 18 (7 + 11) мутантів *B. japonicum* вона була істотно знижена, 2 мутанти (Д34, В159) ініціювали поодинокі бульбочки, маса яких була на 80 % нижчою, ніж у контрольному варіанті.

Отже, за результатами двох доборів за здатністю утворювати на коренях рослин бульбочки більшої загальної маси відібрано шість Tn5-мутантів *B. japonicum* — В75, В78, Д87, В94, В131, В157 (рис. 3). Кореневі бульбочки найменшої маси ініціювали мутанти В74, В166, В199, Д33, Д38.

Відомо, що маса бульбочок, сформованих на корені рослини, зазвичай позитивно корелює з їх азотфіксувальною активністю. Показник АфА відображає інтенсивність функціонування нітрогеназного комплексу симбіотичної системи, що зумовлена високою чутливістю перебігу фізіологічних процесів унаслідок навіть незначних коливань параметрів навколишнього середовища, багатогранністю регуляторних зв'язків у симбіотичній системі та залежністю їх вияву від генетичних особливостей макро- і мікросимбіонта.

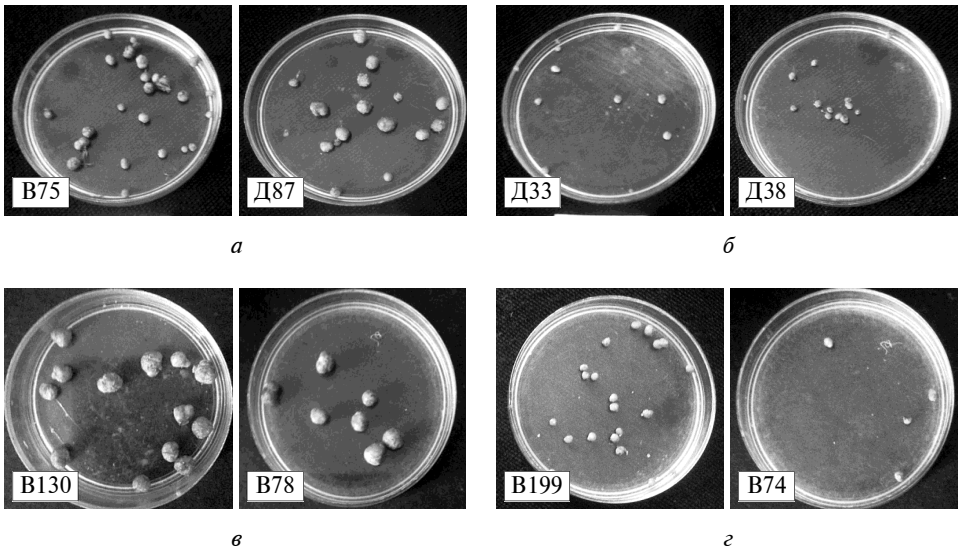

Рис. 3. Кореневі бульбочки (відокремлені від кореня), утворені за інокуляції сої Tn5-мутантами *B. japonicum* активними (*а*, *в*) і малоактивними (*б*, *г*) у фази розвитку сої початок утворення 3-го справжнього листка (*а*, *б*, I відбір рослин), бутонізація—початок цвітіння (*в*, *г*, II відбір рослин)

За результатами дослідження 42 Tn5-мутантів *B. japonicum* у фазу початку утворення 3-го справжнього листка відібрано 11 із найбільшою інтенсивністю азотфіксації (Fix^{++}-фенотип). Бульбочки на коренях сої, утворені за участю 5 мутантів — Д87, В75, В154, В144, В94, асимілювали N_2 активніше в 1,8—3,0 раза, інших 6 мутантів — В81, В128, В130, В131, В137, В157 — в 1,2—1,5 раза інтенсивніше порівняно з бульбочками контрольних рослин. Як бачимо, в числі дібраних є також Tn5-мутанти *B. japonicum* із підвищеною нодуляцією (В75, Д87, В94, В131, В157), що засвідчує позитивну кореляцію показників «маса бульбочок» і «АфА». Водночас 18 Tn5-мутантів забезпечували різну інтенсивність фіксації N_2 бактероїдами кореневих бульбочок, але поступались штаму 634б, із них 8 мутантів оцінено як малоактивні, зокрема вкрай низьку АфА (0,0039 мкмоль C_2H_4/(рослину·год)) мали бульбочки, ініційовані Tn5-мутантом В80, не виявлено АфА у варіантах із передпосівною інокуляцією насіння сої мутантами В159 і Д34 за відсутності кореневих бульбочок. Показники АфА бульбочок в 11 варіантах досліду були на рівні контролю.

Із літературних джерел відомо, що ризобії у симбіозі з рослиною-хазяїном здатні до різних типів динаміки азотфіксувальної активності. При цьому піки АфА виявляються як у ранній період функціонування симбіотичної системи, так і в найактивнішу фазу перебігу асимілятивних процесів у рослин сої (фаза бутонізація—початок цвітіння). Нерідко АфА кореневих бульбочок сої може мати пролонгований характер [17]. Якщо проводити одноразовий добір (зокрема, у ранній період формування симбіотичної системи) за показником АфА, існує ймовірність вибраковування (втрати) ризобій із піками асиміляції N_2 в наступні фази вегетації рослин. Тому доцільно повторно оцінювати симбіотичні системи за АфА у фазу бутонізації—початку цвітіння сої.

Як уже зазначалось, у фазу бутонізації—початку цвітіння на коренях усіх рослин сої сформувалися бульбочки. У цей період ми відібрали 11 активних мутантів за підвищеною АфА (понад 20 %) утворених ними бульбочок порівняно з контролем. Серед них найактивнішими були мутанти Д87, В78, В79, В130, В144, В157, В166, у цю фазу також відмічені 17 мутантів з АфА на рівні контролю й 11 мутантів зі зниженою АфА на 25—50 % порівняно зі штамом 634б (див. таблицю). Відібрано три Tn5-мутанти (Д34, Д38, В129) зі зниженою у 8,3—9,8 раза активністю азотфіксації (АфА утворених ними бульбочок дорівнювала відповідно 0,131, 0,149 та 0,156 проти 1,58 мкмоль C_2H_4/(рослину·год) у штаму 634б у цей період).

Залежно від штаму-інокулянта інтенсивність азотфіксації кореневих бульбочок у фазу бутонізація—цвітіння сої збільшилась у 2,0—10,0 раза порівняно з рослинами відповідних варіантів у фазу трьох справжніх листків. Аналогічно АфА кореневих бульбочок, ініційованих штамом *B. japonicum* 634б, зросла лише в 2,0 раза. Отже, за результатами двох доборів виявлено три Tn5-мутанти — Д87, В144, В157, які за активністю азотфіксації стабільно перевищували штам 634б у фази початок утворення 3-го справжнього листка та бутонізація—початок цвітіння.

У процесі аналізу й добору активних штамів ризобій успішно використовують також показник «сумарна загальна АфА кореневих бульбочок за вегетаційний період» (на цьому етапі селекції ми обмежилися періодом визначення (I і II відбори рослин) (рис. 4). За показником сумарної АфА за період визначення дібрали 7 найліпших мутантів — Д87, В75, В130, В131, В144, В154, В130 (показник збільшився на 22,5—64,5 %). У рослин 5 варіантів показник АфА домінував на 14,7—20,3 % порівняно з контрольними, в інших 6 — коливався на рівні контролю, в 14 — зменшився на 20 %. Вкрай низьку інтенсивність асиміляції N_2 (сумарну за два відбори) виявили симбіотичні системи сої за участю трьох мікросимбіонтів: В129 — 0,199, Д34 — 0,131, Д38 — 0,225 мкмоль C_2H_4/(рослину·год).

Аналогічно оцінено сумарну питому АфА кореневих бульбочок сої й відібрано 8 ліпших Tn5-мутантів, які підвищували АфА бульбо-

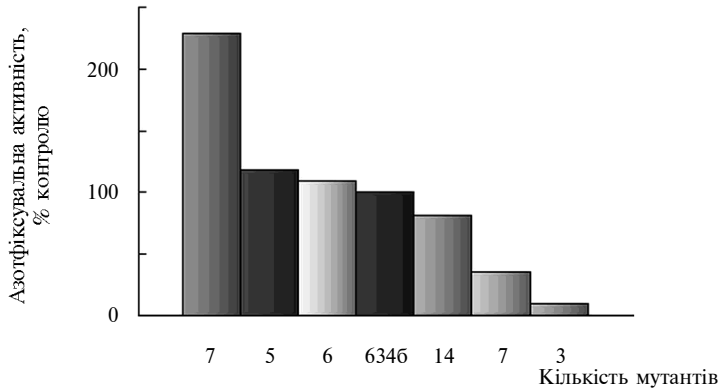

Рис. 4. Гістограма розподілу кількості Tn5-мутантів (штам-контроль 634б) за показником сумарна загальна азотфіксувальна активність бульбочок на 1 рослині за період визначення за інокуляції Tn5-мутантами *B. japonicum*

чок порівняно з контрольними значеннями на 19,1—69,2 %, серед них мутанти — В157, В81, В166, В163 (АфА зросла на 51,3—69,2 % порівняно з контрольними показниками).

Інтегральним показником ефективного функціонування симбіотичних систем сої за участю бульбочкових бактерій є формування надземної маси та урожаю зерна. На етапі первинного скринінгу (відбору) симбіотичних систем сої із залученням великої вибірки (варіантів) обмежимося визначенням надземної маси рослин. При цьому слід враховувати, що АфА і здатність збільшувати масу рослин (ефективність симбіозу) контролюють різні гени ризобіопартнера [18, 19], унаслідок чого корелятивний зв'язок між АфА бульбочок і надземною масою фітосимбіонта не завжди існує. Проте це більше стосується штамів ризобій із посереднім рівнем АфА. Високоактивні штами з посиленим синтезом нітрогенази функціонально стабільно забезпечують вищий рівень надходження біологічного азоту до системи живлення рослин, що реалізується в збільшенні їх продуктивності. Селективний добір транспозонових мутантів *B. japonicum* за комплексом поліпшених симбіотичних показників в умовах вегетаційного досліду є трудомістким, проте виправданим щодо встановлення їх впливу на рослину та слугує підставою для залучення їх як біологічних агентів бактеріальних добрив під сою.

11 (7+4) Tn5-мутантів, якими бактеризували насіння сої, чинили стимулювальний вплив на ріст надземної маси рослин, про що свідчить її приріст на 19,7—31,3 % (рис. 5). Найефективнішою за період визначення була інокуляція сої мутантами Д37, В81, В130, В131, В140, В144, В154. У рослин, інокульованих 26 (12+14) Tn5-мутантами, накопичення надземної маси було на рівні контрольних значень, до цієї групи нерідко долучають ризобії з достатньо високим азотфіксувальним потенціалом. Підтвердженням їх ефективності у подальшому може слугувати аналіз зразків зерна сої на вміст білка. Тому в процесі відбору цінних за господарськими властивостями бульбочкових бактерій слід враховувати також і цей факт.

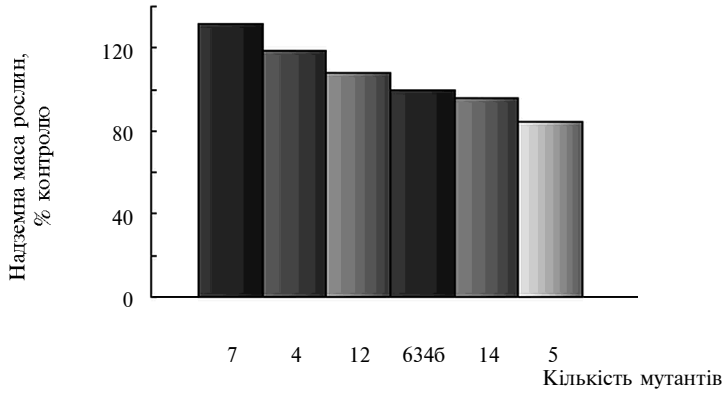

Рис. 5. Гістограма розподілу кількості Tn5-мутантів (штам-контроль 634б) за показником Eff^+-фенотип—ефективність за інокуляції Tn5-мутантами *B. japonicum* (фаза бутонізація—початок цвітіння)

У п'яти варіантах досліду інокуляція сої транспозоновими мутантами не дала позитивного ефекту, а навпаки, призводила до сповільнення вегетативного росту рослин на 16,0—35 % порівняно з рослинами, інокульованими штамом 634б.

Таким чином, у результаті первинного скринінгу 42 Tn5-мутантів *B. japonicum* у фази трьох справжніх листків та бутонізації—початку цвітіння за симбіотичним фенотипом встановлено, що Tn5-мутанти істотно відрізняються за вірулентністю, формуванням маси кореневих бульбочок, інтенсивністю та динамікою АфА. У фазу трьох справжніх листків не утворювались кореневі бульбочки у сої, інокульованої мутантами В159 і Д34. Бульбочки найменшої маси сформувались за участю мутантів В166, Д33, Д38 у фазу трьох справжніх листків, а також Д34, В159 — у фазу бутонізації—початку цвітіння.

Серед дослідженої колекції визначено високоактивні мутанти за фіксацією N_2, із середнім рівнем активності та малоактивні форми бульбочкових бактерій у різні фази вегетації сої. Відібрано три Tn5-мутанти з найвищим рівнем АфА (підвищення на 64,5—128,7 %) — Д87, В144, В157. За сумарною інтенсивністю азотфіксації відібрано мутанти Д87, В75, В130, В144, В154, В157, В166, в інших чотирьох мутантів цей показник збільшився на 14,7—20,3 % (див. таблицю, рис. 4).

За інокуляції насіння Tn5-мутантом В80 рівень азотфіксації кореневих бульбочок сої у фазу трьох справжніх листків був найнижчим, але істотно зростав у фазу бутонізації—початку цвітіння. У фазу бутонізації—початку цвітіння знижувалась АфА бульбочок, утворених мутантами Д34, Д38, В129 (вона становила 0,131, 0,149 та 0,156 проти 1,57 мкмоль C_2H_4/(рослина·год) штаму 634б у цей період), що спричинило загальну вкрай низьку інтенсивність асиміляції N_2 за період визначень.

Отже, стратегія вивчення за симбіотичним фенотипом ризобій сої у модельних вегетаційних дослідах забезпечує можливість ідентифікації високовірулентних, конкурентоспроможних транспозонових мутантів *B. japonicum* із підвищеною АфА та здатністю стимулювати ріст надземної маси рослин сої для подальшого дослідження з метою створення генетичної бази ефективних мікросимбіонтів рослин сої.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф., Маличенко С.М., Маменко П.Н., Киризий Д.А., Михалкив Л.М., Береговенко С.К., Мельникова Н.Н. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз. Киев: Логос, 2011. Т. 2. 523 с.
2. Petrychenko V.F., Kots S.Ya. Symbiotic system in modern agricultural manufacture. *Bull. NAS Ukraine*. 2014. **3**. P. 57—66.
3. Рябуха С.С., Чернышенко П.В., Сєрікова Л.Г. Ефективність застосування хімічних мутагенів в селекції сої. *Селекція і насінництво*. 2012. Вип. 102. С. 60—62.
4. Aranjuelo I., Arrese-Igor C., Molero G. Nodule performance within a changing environmental context. *Plant Physiol.* 2014. **171**, N 12. P. 1076—1090.
5. Коць С.Я., Воробей Н.А., Кириченко О.В., Мельникова Н.М., Михалків Л.М., Пухтаєвич П.П. Мікробіологічні препарати для сільського господарства. Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. Київ: Логос, 2016. 48 с.

6. Provorov N.A., Tikhonovich I.A. Genetic and molecular basis of symbiotic adaptations. *Biol. Bull. Reviews*. 2014. **4**, N 6. P. 211—226.
7. Aghaei K., Komatsu S. Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. *Fron. Plant Sci*. 2014. **4**(8). P. 1—9.
8. Проворов Н.А., Онищук О.П., Юргель С.Н., Курчак О.Н., Чижевская Е.П., Воробьев Н.И., Затовская Т.В., Симаров Б.В. Конструирование высокоэффективных симбиотических бактерий: эволюционные модели и генетические подходы. *Генетика*. 2014. **50**(11). P. 1273—1285. doi: https://doi: 10.7868/S0016675814110113.
9. Спайнк Г., Герман П., Кондороши А., Хукас П. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. Перевод под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. С.-Петербург, 2002. 567 с.
10. Rilfe B.G., Greshoff P.M., Shine J. Rapid screening for symbiotic mutants of Rhizobium and white clover. *Plant Sci. Lett*. 1980. **19**. P. 265—268.
11. Sirois J.C., Peterson P.A. A rapid screening method for Rhizobium meliloti symbiotic nitrogenase activity. *Can. J. Microbiol*. 1981. **28**. P. 265—268.
12. Федоров С.Н., Фокина И.Г., Симаров Б.В. Оценка симбиотических свойств клубеньковых бактерий люцерны в лабораторных условиях. *С.-х. биология*. 1986. № 1. С. 112—118.
13. Воробей Н.А., Заєць В.М., Коць С.Я. Біотехнологія створення ефективних Tn5-мутантів бульбочкових бактерій конюшини *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Біотехнологія*. 2012. **5**, № 3. С. 53—61.
14. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наук. думка, 1964. 388 с.
15. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2-fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol*. 1968. **43**, N 8. P. 1185—1207.
16. Krutylo D.V., Zotov V.S. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine. *Russ. J. Genet.: Appl. Res*. 2015. **5**, N 2. P. 102—109.
17. Воробей Н.А., Коць С.Я., Маменко П.М. Реалізація азотфіксувального потенціалу Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* у симбіозі з рослинами сої. *Biotechnologia Acta*. 2013. **6**, № 5. С. 122—130.
18. Provorov N.A., Vorobyov N.I. Adaptive and progressive evolution of plant-microbial symbiosis. *Russ. J. Genet.: Appl. Res*. 2014. **4**, N 2. P. 88—97.
19. Bonaldi K., Gourion B., Fardoux J., Hannibal L., Cartieaux F., Boursot M., Vallenet D., Chaintreuil C., Prin Y., Nouwen N., Giraud E. Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic Bradyrhizobium sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for nod-independent symbiosis with Aeschynomene indica. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2010. **23**. P. 760—770. doi: 10.1094/MPMI-23-6-0760

Отримано 18.07.2018

REFERENCES

1. Kots, S.Ya., Morgun, V.V., Patyka, V.F., Malichenko, S.M., Mamenko, P.M., Kiriziy, D.A., Mykhalkiv, L.M., Beregovenko, S.K. & Melnykova, N.M. (2011). Biological nitrogen fixation: legume-rhizobial symbiosis (Vol. 2). Kyiv: Logos [in Russian].
2. Petrychenko, V.F. & Kots, S.Ya. (2014). Symbiotic system in modern agricultural manufacture. Bull. NAS Ukraine, 3, pp. 57-66.
3. Ryabukha, S.S., Chernyshenko, P.V. & Serikova, L.G. (2012).The effectiveness of the use of chemical mutagens in the selection of soybeans. Selektsiya i nasinnytstvo, 102, pp. 60-62 [in Ukrainian].
4. Aranjuelo, I., Arrese-Igor, C. & Molero, G. (2014). Nodule performance within a changing environmental context. J. Plant Physiol., 171, No. 12, pp. 1076-1090.
5. Kots, S.Ya., Vorobey, N.A., Kyrychenko, O.V., Melnykova, N.N., Mykhalkiv, L.M. & Pukhtayevych, P.P. (2016). Microbiological preparations for agriculture. Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine. Kyiv: Logos, 48 p. [in Ukrainian].
6. Provorov, N.A. & Tikhonovich, I.A. (2014). Genetic and molecular basis of symbiotic adaptations. Biol. Bull. Reviews, **4**, No. 6, pp. 211-226.

7. Aghaei, K. & Komatsu, S. (2014). Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. Fron. Plant Sci, 4, No. 8, pp. 1-9.
8. Provorov, N.A., Onishchuk, O.P., Yurgel, S.N., Kurchak, O.N., Chizhevskaya, E.P., Vorobyov, N.I., Zatovskaya, T.V. & Simarov, B.V. (2014). Construction of high effective symbiotic bacteria: Evolutionary models and genetic approaches. Genetika, 50, No. 11, pp. 1273-1285. doi: 10.7868/S0016675814110113.
9. Spaink, G., Herman, P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P. (2002). The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Assosiated Bacteria. St. Peterburg [in Russian].
10. Rilfe, B.G., Greshoff, P.M. & Shine, J. (1980). Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. Plant Sci. Lett., 19, pp. 265-268.
11. Sirois, J.C. & Peterson, P.A. (1981). A rapid screening method for *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogenase activity. Can. J. Microbiol., 28, pp. 265-268.
12. Fedorov, S.N., Fokina, I.G. & Simarov, B.V. (1986). Evaluation of the symbiotic properties of alfalfa nodule bacteria in laboratory conditions. S.-Kh. Biology, No. 1, pp. 112-118 [in Russian].
13. Vorobey, N.A., Zaets, V.M. & Kots, S.Ya. (2012). Biotechnology of effective Tn5-mutants creation of clover nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*. Biotechnologia, 5, No. 3, pp. 53-61 [in Ukrainian].
14. Grodzinskiy, A.M. & Grodzinskiy, D.M. (1964). Quick reference guide for plant physiology. Kyiv: Naukova dumka, 1964 [in Russian].
15. Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N_2-fixation: Laboratory and field evaluation. Plant Physiol., 43, No. 8, pp. 1185-1207. doi: https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185
16. Krutylo, D.V. & Zotov, V.S. (2015). Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine. Russ. J. Genet.: Appl. Res., 5, No. 2, pp. 102-109. doi: https://doi.org/10.1134/S2079059715020057
17. Vorobey, N.A., Kots, S.Ya. & Mamenko, P.M. (2013). Realization of nitrogen fixation potential of Tn5-mutants *Bradyrhizobium japonicum* in symbiosis with soybean plants Biotechnologia Acta, 6, No. 5, p. 122-130 [in Ukrainian].
18. Provorov, N.A. & Vorobyov, N.I. (2014). Adaptive and progressive evolution of plant-microbial symbiosis. Russ. J. Genet.: Appl. Res., 4, No. 2, pp. 88-97.
19. Bonaldi, K., Gourion, B., Fardoux, J., Hannibal, L., Cartieaux, F., Boursot, M., Vallenet, D., Chaintreuil, C., Prin, Y., Nouwen N. & Giraud, E. (2010). Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic Bradyrhizobium sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for nod-independent symbiosis with Aeschynomene indica. Mol. Plant Microbe Interact., 23, pp. 760-770. doi: https://doi: 10.1094/MPMI-23-6-0760

Received 18.07.2018

СТРАТЕГИЯ ОТБОРА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ПО УЛУЧШЕННОМУ СИМБИОТИЧЕСКОМУ ФЕНОТИПУ

Н.А. Воробей, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

На основании анализа известных методов отбора активных штаммов ризобий представлена стратегия первичного скрининга по симбиотическим свойствам клубеньковых бактерий сои *Bradyrhizobium japonicum* в условиях модельных вегетационных опытов при естественных освещении и температуре. Сою сорта Лиссабон инокулировали мутантами *B. japonicum*, полученными методом транспозонового мутагенеза при использовании плазмидного вектора pSUP5011::Tn5. Приведены результаты селекции ризобий по хозяйственно-ценным свойствам (вирулентность, нодуляция, азотфиксирующая активность, стимуляция роста надземной массы растений сои). Обнаружены отличия между транспозоновыми мутантами *B. japonicum* по способности к образованию клубеньков на корнях растения-хозяина, динамике и интенсивности ассимиля-

ции атмосферного азота симбиотическими системами соя—ризобии. Отмечена целесообразность проведения селекции микросимбионтов не только в ранний период формирования симбиотических систем сои, а также и в фазу наибольшей активности их функционирования. Это обеспечивает возможность отбора штаммов с разными типами динамики азотфиксирующей активности, наиболее агрессивных и высоковирулентных штаммов в период становления симбиоза. Отобраны Tn5-мутанты с улучшенным симбиотическим фенотипом по сравнению со штаммом-контролем *Bradyrhizobium japonicum* 634б.

Ключевые слова: соя, симбиоз, азотфиксация, клубеньковые бактерии, *Bradyrhizobium japonicum*, азот, эффективность.

SELECTION STRATEGY FOR IMPROVED SYMBIOTIC PHENOTYPES OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

N.A. Vorobey, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine
e-mail: n-vorobey@ukr.net

On the basis of the analysis of known methods of selection of highly active rhizobia strains, a strategy of primary screening of soybean nitrogen-fixing bacteria *Bradyrhizobium japonicum* based on the symbiotic properties under conditions of model pot experiments at natural light and temperature is presented. Soybeans of the Lisbon variety were inoculated with *B. japonicum* mutants obtained by transposon mutagenesis using plasmid vector pSUP5011::Tn5. The results of selection of rhizobia for the economic-valuable features (virulence, nodulation, nitrogen fixation activity, stimulation of growth of aboveground biomass) are presented. The differences between *B. japonicum* transposon mutants in the ability to nodules formation on the roots of the host plant, the dynamics and intensity of the assimilation of atmospheric nitrogen by soybean-rhizobia symbiotic systems are revealed. The expediency of selection of micro-symbionts was pointed out not only at the early period of the formation of symbiotic systems, but also at stages of the most active their functioning. This provides the possibility to select strains with different types of dynamics of nitrogen fixation activity as well as the most aggressive and high-virulent strains in the period of formation of symbiosis. Tn5 mutants with an improved symbiotic phenotype as compared to control strain *Bradyrhizobium japonicum* 634b were selected.

Key words: soybean, symbiosis, nitrogen fixation, nodule bacteria, *Bradyrhizobium japonicum*, nitrogen, efficiency.