

УДК 576.871.155.557

## ОЦІНЮВАННЯ СИМБІОТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АЗОТОСТІЙКИХ ШТАМІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ЗА ДІЇ МІНЕРАЛЬНОГО АЗОТУ

Н.А. ВОРОБЕЙ<sup>1</sup>, С.Я. КОЦЬ<sup>1</sup>, Л.А. КУДРЯВЧЕНКО<sup>1</sup>, О.В. КАРАУШУ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: n-vorobey@ukr.net

<sup>2</sup>Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
01601 Київ, вул. Володимирська, 64

У вегетаційних дослідках вивчено ефективність інокуляції сої азотостійкими бульбочковими бактеріями *B. japonicum* за оптимального й підвищеного забезпечення рослин мінеральним азотом. Встановлено, що бактеризація насіння селекціонованим азотостійким штамом В20 *B. japonicum* найефективніше забезпечує формування азотфіксувальних бульбочок на коренях рослин, сприяє повноцінному живленню мінеральним і симбіотрофним азотом, інтенсифікує вегетативний ріст, підвищує врожайність зерна, поліпшує його якість при вирощуванні сої на 1 нормі мінерального азоту за Гельригелем.

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

Продуктивність бобово-ризобіального симбіозу — актуальна проблема сучасної біології, об'єкт інтенсивних досліджень різних спеціалістів протягом багатьох десятиліть. Вирішення її важливе як із наукового, так і практичного погляду і пов'язане з необхідністю підвищення ефективності симбіотичного засвоєння атмосферного азоту [18]. Ефективність симбіотичної азотфіксації визначається комплексом чинників, серед яких найбільше значення мають біологічні особливості культур, генотипи рослин і азотфіксувальних мікроорганізмів, відповідність екологічних умов потребам конкретних макро- й мікросимбіонтів [15, 20, 21]. Оптимізація і раціональне поєднання цих чинників дає змогу істотно підвищити азотфіксацію [3, 19]. Багаторічними дослідками доведено, що інокуляція бобових рослин високоефективними штамми бульбочкових бактерій збільшує збір протеїну й підвищує врожай бобових у середньому на 10—25 % [13]. Крім того, бобові культури значно поліпшують фізико-хімічні властивості ґрунту та його фітосанітарний стан [19].

Важливу роль у формуванні та функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу відіграють зовнішні чинники, які можуть заважати його встановленню. До їх числа належить мінеральний азот, високі концентрації якого в ґрунті при внесенні азотних добрив інгібують формування бульбочок, знижують ефективність або призводять до повного пригнічення симбіотичних взаємовідносин.

© Н.А. ВОРОБЕЙ, С.Я. КОЦЬ, Л.А. КУДРЯВЧЕНКО, О.В. КАРАУШУ, 2015

Літературні дані щодо значення мінерального й симбіотичного азоту в житті бобових рослин суперечливі. Одні дослідники вважають, що вносити мінеральний азот під зернобобові — «агрономічна недоцільність» [4], інші рекомендують вносити невеликі, так звані стартові дози (до 20—30 кг/га), які необхідні на перших етапах розвитку бобової рослини і позитивно впливають на ріст коренів, формування на них бульбочок [17]. Деякі автори вважають, що максимальний урожай бобових можна отримати тільки в разі внесення високих доз азотних добрив [6]. Висловлена також думка, що бобові необхідно забезпечувати не тільки біологічним, а й мінеральним азотом [20]. Відмінності висновків можна пояснити різними умовами проведення дослідів, властивостями ґрунтів, різними вимогами бобових культур до умов вирощування, ефективністю бульбочкових бактерій, застосованими дозами азотних добрив.

Беззаперечно доведено інгібувальний вплив високих доз мінерального азоту як на початкових етапах формування бобово-ризобіального симбіозу, так і в подальшому його функціонуванні [11, 12, 22]. Встановлено, що високі дози мінерального азоту стимулюють метаболічні процеси, які підвищують стійкість до інфекції, сприяють запуску захисних механізмів у рослин [1]. Наявність зв'язаного азоту у вигляді  $\text{NH}_4^+$  або  $\text{NO}_3^-$  репресує активність нітрогенази — ферменту, який каталізує процес зв'язування молекулярного азоту в бульбочках [14]. Для пояснення інгібування нітрогеназної активності висувалися різні гіпотези. Наприклад, за наявності ендогенного нітрату рослинна нітратредуктаза і нітрогеназа конкурують за джерела енергії. Інша гіпотеза пов'язана з пригніченням активності синтезу леггемоглобіну в бульбочках [9]. Дослідники розглядають два шляхи подолання інгібування: 1) селекція стійких до нітрату рослин [24, 28]; 2) отримання спеціальних штамів ризобій (мутантів бульбочкових бактерій) з підвищеною стійкістю в симбіозі до дії мінерального азоту [9, 17, 26] й різко підвищеним рівнем нітрогеназної активності. На думку Сингх, отримані мутанти можуть виявляти підвищену ефективність симбіозу, особливо в разі вирощування рослин на багатих на нітрати ґрунтах [27, 28].

У результаті проведених досліджень бульбочкових бактерій *B. japonicum* за ознаками «азотфіксація», «вірулентність», «ефективність симбіозу» ми відібрали Tn5-мутанти T21-2 (pSUP2021::Tn5) і B16, B20 (pSUP5011::Tn5 тов) із поліпшеними господарсько-корисними властивостями, які забезпечували інтенсивнішу асиміляцію  $\text{N}_2$  у бульбочках сої, поліпшували азотне живлення рослин, що стимулювало їх вегетативний ріст більшою мірою порівняно зі штамми 646 (вихідний) і 6346 (виробничий) *B. japonicum* [2].

Наступним нашим завданням було оцінювання й добір азотостійких форм Tn5-мутантів *B. japonicum* в умовах чистої культури та ефективних у симбіозі з соєю за впливу високих доз мінерального азоту.

## Методика

Досліджували сою (*Glycine max* L. (Merill)) сорту Васильківська (середньостиглий) спільної селекції Інституту фізіології рослин і генетики (ІФРГ) НАН України, Селекційно-генетичного інституту та Інституту землеробства Національної академії аграрних наук України. Насіння інокулювали виробничим штамом бульбочкових бактерій сої — *B. japo-*

*nicum* 6346, Tn5-мутантами штаму 646, отриманими методом транспозонового мутагенезу з використанням *Escherichia coli* S17-1 із різними плазмідами-векторами T21-2 (pSUP2021::Tn5) і B16, B20 (pSUP5011::Tn5 mob) з колекції ІФРГ НАН України [2]. Повільнорослі бульбочкові бактерії *B. japonicum* вирощували на манітно-дріжджовому агарі (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, рН 6,8—7,0 за 28 °С протягом 7 діб. Для приготування інокуляційних бактеріальних суспензій біомасу бактерій з поверхні агару змивали водою, суспендували. Водні суспензії бульбочкових бактерій вирівнювали між собою в межах досліду за стандартом каламутності. Інфекційне навантаження становило  $10^8$ — $10^9$  клітин/мл.

Вегетаційні досліди проводили в умовах модельних експериментів на вегетаційному майданчику ІФРГ НАН України за вологості субстрату 60 % ПВ і природного освітлення. В посудинах місткістю 10 кг піщаного субстрату, попередньо простерилізованих 20 %-м розчином  $H_2O_2$ , вирощували по 8 рослин. Річковий пісок збагачували поживною сумішшю Гельригеля [5] з різною кількістю азоту (0,25 та 1,0 норми, норма відповідає  $708 \text{ мг } Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  на 1 кг піску).

Перед висівом насіння сої стерилізували упродовж 15 хв 70 %-м розчином етанолу, промивали під проточною водою та протягом 1 год інокулювали суспензією бульбочкових бактерій. Повторність дослідів п'ятиразова. Контролем слугували рослини, інокульовані виробничим штамом 6346 *B. japonicum*.

Ефективність симбіозу сої з Tn5-мутантами *B. japonicum* оцінювали за кількістю, масою кореневих бульбочок, їх азотфіксувальною активністю, надземною масою, масою коренів, урожайністю, вмістом протеїну в зерні. Рослини для аналізу відбирали у фази трьох справжніх листків та бутонізації—початку цвітіння. Нітрогеназну активність (азотфіксацію) визначали за рівнем ацетиленвідновлювальної активності кореневих бульбочок ацетиленовим методом Харді [25] і виражали в мікромолях етилену, який утворювали бульбочки однієї рослини за 1 год. Газову суміш аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6855 Network GC System, визначення проводили у п'ятиразовій повторності. Вміст протеїну в зерні визначали за методом Лоурі [26].

Експериментальні дані оброблено статистично за Доспеховим [7] і з використанням програми Microsoft Excel 2010. У таблицях наведено середньоарифметичні значення та їх стандартні похибки.

## Результати та обговорення

В умовах чистої культури відібрано азотостійкі штами бульбочкових бактерій *B. japonicum*. За культивування ризобій на МДА +  $KNO_3$  50 мМ бактеріальний ріст виявлено у штамів 6346, 646 та Tn5-мутантів T21-2, B16, B20 (табл. 1). Особливістю росту ризобій сої на мінеральному середовищі з підвищеним вмістом  $KNO_3$  (> 50 мМ) було істотне зниження продукції екзополісахаридів, яка характерна за нормального розвитку колоній. Бульбочкові бактерії сої — *B. japonicum* B16, B20 та T21-2, які виявились найстійкішими до мінерального азоту в формі  $KNO_3$ , залучали як мікосимбіонти при вирощуванні сої за 1,0 норми мінерального азоту за Гельригелем у формі  $Ca(NO_3)_2$ .

ОЦЕНКА СИМБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЗОТОУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ

ТАБЛИЦЯ 1. Кількість колонієутворювальних одиниць ( $KUO \cdot 10^9$ ) при культивуванні бульбочкових бактерій *V. jarrowii* на агаризованому середовищі за дії мінерального азоту

Штам	Концентрація $KNO_3$ , мМ					
	0	15	30	50	75	100
6346	15,6±0,5	13,5±1,0	13,0±0,7	6,5±0,3	0	0
646	12,4±1,0	12,3±1,7	11,4±1,0	3,5±0,2	0	0
T21-2	17,8±1,3	14,2±0,6	13,4±1,2	10,4±0,9	6,4±0,4	0
17-2	14,5±0,8	10,5±0,8	0	0	0	0
B16	20,4±1,5	18,2±1,2	16,0±1,5	9,5±0,7	0	0
B20	23,0±1,6	21,0±2,0	19,6±0,8	12,4±0,5	0	0
B21	19,6±1,5	17,2±1,0	13,0±0,7	0	0	0

У результаті проведених досліджень в умовах вегетаційного дослідів встановлено, що формування симбіотичного апарату на коренях рослин сої великою мірою залежить від внесеної норми азоту в субстрат вирощування рослин та штамів бульбочкових бактерій, використаних для передпосівної інокуляції насіння. Виявлено різницю в кількості кореневих бульбочок залежно від генотипу мікросимбіонта та фази розвитку рослини-хазіяна за однакових умов вирощування. У процесі вегетативного росту кількість бульбочок на коренях усіх інокульованих рослин збільшувалася як за зниженого, так і підвищеного їх забезпечення мінеральним азотом (табл. 2). В найактивнішу фазу перебігу асиміляційних процесів (фаза бутонізації—початку цвітіння) найбільшу кількість симбіотичних органів було виявлено на коренях рослин, інокульованих мутантом B20, як за 0,25, так і за 1,0 норми азоту. Проте слід зазначити істотне зменшення кількості бульбочок на коренях рослин за 1,0 норми внесеного азоту в субстрат вирощування. Попри депресуючий вплив 1,0 норми  $Ca(NO_3)_2$  мутант B20 виявився найбільш вірулентним в умовах симбіозу серед досліджуваних ризобій, а кількість кореневих бульбочок, утворених за його участю, стабільно перевищувала нодуляційну здатність інших мікросимбіонтів у 1,9—3,8 та 1,3—2,1 раза відповідно в I і II

ТАБЛИЦЯ 2. Кількість бульбочок на коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями *V. jarrowii*, залежно від фази розвитку рослин і норми мінерального азоту

Штам	Норма азоту	Фаза розвитку			
		I дослід, 2013 р.		II дослід, 2014 р.	
		3 справжні листки	бутонізація—початок цвітіння	3 справжні листки	бутонізація—початок цвітіння
6346	0,25	71,8±3,8	75,0±5,8	5,3±0,5	19,5±2,0
B16		63,0±3,1	60,0±1,8	22,5±2,4	21,5±3,0
B20		59,5±4,9	69,7±5,1	21,0±2,3	38,8±3,2
T21-2		81,5±2,7	45,0±1,6	24,8±2,2	27,3±3,0
6346	1,0	20,4±1,6	16,0±2,6	13,5±1,0	14,8±1,8
B16		16,5±2,2	47,5±2,5	16,3±1,8	22,8±2,5
B20		38,0±3,6	61,7±4,7	18,3±0,5	30,8±2,3
T21-2		27,25±2,3	32,0±3,6	12,3±0,8	27,0±3,0

ТАБЛИЦЯ 3. Маса бульбочок (г/рослину) на коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями *B. japonicum*, за різних доз мінерального азоту

Штам	Норма азоту	Фаза розвитку			
		I дослід, 2013 р.		II дослід, 2014 р.	
		3 справжні листки	бутонізація—початок цвітіння	3 справжні листки	бутонізація—початок цвітіння
6346	0,25	0,40±0,03	0,79±0,09	0,023±0,002	0,195±0,001
B16		0,38±0,03	0,71±0,04	0,107±0,02	0,146±0,02
B20		0,40±0,06	0,73±0,02	0,036±0,005	0,305±0,012
T21-2		0,43±0,05	0,50±0,05	0,069±0,002	0,202±0,013
6346	1,0	0,02±0,002	0,21±0,03	0,023±0,001	0,044±0,001
B16		0,02±0,00	0,14±0,02	0,006±0,00	0,064±0,001
B20		0,10±0,06	0,24±0,02	0,052±0,001	0,078±0,002
T21-2		0,03±0,001	0,08±0,00	0,028±0,001	0,070±0,002

дослідах (2013—2014 рр.). Зокрема, у вегетаційному досліді 2014 р. бактеризація сої Tn5-мутантом B20 забезпечувала збільшення кількості бульбочок у 2,0 та 2,08 рази порівняно з аналогічним показником рослин, інокульованих штамом 6346 *B. japonicum* відповідно за оптимальної (0,25) та надмірної (1,0) норми мінерального азоту.

Аналогічна закономірність зберігалася щодо наростання маси бульбочок. У фази бутонізації—початку цвітіння маса бульбочок на коренях однієї рослини за бактеризації насіння сої мутантом B20 збільшилася в 1,5 та 1,7 рази відповідно за 0,25 і 1,0 норми азоту порівняно з цим показником рослин, інокульованих штамом 6346 (табл. 3). Як видно з даних табл. 2 і 3, надмірна норма азоту пригнічувала утворення симбіотичних органів, особливо відчутно це позначилось на наростанні їх маси.

На ранніх етапах онтогенезу сої, зокрема у фазу 3 справжніх листків, азотфіксувальну активність виявлено в кореневих бульбочках, утворених за участю Tn5-мутанта B16, на фоні 0,25 норми азоту, проте вона була відсутня за 1,0 норми азоту (табл. 4). Водночас інтенсивність азотфіксації бульбочок, утворених мутантами B20 і T21-2, коливалася на рівні штаму 6346 за 0,25 норми азоту й істотно перевищувала його за цим показником за 1,0 норми азоту, що свідчить про високий адаптивний потенціал штамів *B. japonicum* B20 і T21-2 до підвищеного вмісту мінерального азоту за умов симбіозу (див. табл. 4, дослід II).

У фази бутонізації—початку цвітіння у сої формується потужний симбіотичний апарат, як наслідок, у цей період збільшується інтенсивність азотфіксації. За 0,25 та 1,0 норми мінерального азоту всі 3 досліджувані культури *B. japonicum* виявилися ліпшими за штам-стандарт 6346 за цим показником (див. табл. 4, II дослід).

В основному закономірності зберігаються протягом досліджуваних періодів залежно від залученого мікосимбіонта та фази розвитку сої. Однак інтенсивність азотфіксації корневих бульбочок сої в досліді 2014 р. дещо менша, що зумовлено зниженим рівнем бульбочкоутворення через чутливість зазначених симбіотичних систем до впливу несприятливих кліматичних умов вегетаційного періоду 2014 р.

ОЦЕНКА СИМБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЗОТУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ

ТАБЛИЦА 4. Азотфиксирующая активность (мкмоль  $C_2H_4$ /(растину · год)) клубочков сои, utworенных *B. japonicum*, за різних доз мінерального азоту

Штам	Норма азоту	Фаза розвитку			
		I дослід, 2013 р.		II дослід, 2014 р.	
		3 справжні листки	бутонізація—початок цвітіння	3 справжні листки	бутонізація—початок цвітіння
6346	0,25	1,61±0,05	2,66±0,13	0,02±0,00	0,14±0,01
B16		0,74±0,15	1,53±0,18	0,03±0,00	0,34±0,01
B20		0,96±0,03	1,47±0,28	0,02±0,00	0,43±0,03
T21-2		0,88±0,04	1,14±0,04	0,02±0,00	0,33±0,02
6346	1,0	0	0,10±0,02	0,02±0,00	0,07±0,01
B16		0	0,10±0,03	0	0,13±0,01
B20		0,15±0,01	0,37±0,06	0,31±0,01	0,34±0,01
T21-2		0,02±0,00	0,30±0,01	0,25±0,01	0,40±0,01

Отримані результати свідчать про негативний вплив мінерального азоту, що призводить до пригнічення симбіотрофного живлення рослин на початкових етапах функціонування симбіотичної системи (фаза трьох справжніх листків). У міру використання рослинами мінерального азоту його концентрація в субстраті знижується, що сприяє інтенсифікації нодуляційного процесу й активуванню живлення рослин біологічно зв'язаним азотом. Тп5-мутанти *B. japonicum*, стійкіші до мінерального азоту, зокрема B20 і T21-2, здатні формувати активніші азотфіксувальні бульбочки порівняно з виробничим штамом (див. табл. 4).

Із літературних джерел відомо, що маса корневих бульбочок у бобових рослин здебільшого корелює з інтенсивністю фіксації ними молекулярного азоту. В наших експериментах найбільші масу бульбочок та загальну азотфіксувальну активність виявлено у варіанті із застосуванням Тп5-мутанта B20 на фоні як оптимальної (0,25), так і підвищеної (1,0) норм мінерального азоту.

У фази трьох справжніх листків і бутонізації—цвітіння надземна маса рослин сої, інокульованої бульбочковими бактеріями B20 *B. japonicum*, істотно переважала показники рослин інших дослідних варіантів за 0,25 і 1,0 норми азоту, а отже, й за ефективністю функціонування симбіотичної системи. Аналогічна тенденція спостерігалась щодо накопичення сухої речовини (табл. 5).

У разі вирощування за оптимальних умов за показником «маса кореня» домінували рослини, інокульовані ризобіями штамів 6346 і B16. За 1,0 норми азоту в субстраті розвиток кореневої системи рослин дещо гальмувався (див. табл. 5).

Інтегральним показником функціонування симбіотичної системи сої за участю бульбочкових бактерій є урожай зерна. В результаті проведених досліджень виявлено збільшення продуктивності сої за інокуляції мутантами B20, T21-2 в усіх варіантах досліді. Кількість бобів у рослин, бактеризованих виробничим штамом, була найбільшою за інокуляції штамом 6346 на фоні 0,25 норми азоту, проте через наявність невиконаних зерном бобів показник зернової продуктивності у цьому варіанті досліді знижувався. За 1,0 норми азоту у варіантах досліді з використанням мутантів *B. japonicum* T21-2 і B20 рослини мали виповнені боби й

ТАБЛИЦЯ 5. Вегетативна маса рослин за інкувації сої бульбочковими бактеріями В. іаропісит на фоні різних доз мінерального азоту (вегетативний дослід 2014 р.)

Штам	Норма азоту	Зелена надземна маса, г			Суша надземна маса, г			Маса сірої речовини коренів, г		
		Фаза розвитку								
		3 справжні листки	бутонізація— початок цвітіння	3 справжні листки	бутонізація— початок цвітіння	3 справжні листки	бутонізація— початок цвітіння			
6346	0,25	3,33±0,16	5,55±0,59	0,69±0,05	1,40±0,10	1,83±0,14	3,68±0,20			
B16		3,04±0,28	6,15±0,70	0,71±0,06	1,45±0,10	1,66±0,09	3,61±0,27			
B20		3,86±0,33	6,37±0,65	0,83±0,04	1,52±0,08	2,11±0,18	3,48±0,40			
T21-2		3,64±0,29	4,89±0,39	0,74±0,07	1,24±0,04	1,82±0,13	3,44±0,30			
6346	1,0	3,04±0,33	5,51±0,44	0,81±0,09	1,31±0,09	1,72±0,17	3,37±0,41			
B16		2,60±0,30	5,97±0,33	0,79±0,04	1,34±0,08	1,48±0,09	3,42±0,09			
B20		3,31±0,88	6,67±0,37	0,89±0,05	1,66±0,09	1,56±0,11	3,47±0,38			
T21-2		3,50±0,47	5,43±0,54	0,85±0,07	1,38±0,10	1,41±0,13	3,44±0,16			

ТАБЛИЦЯ 6. Продуктивність і вміст білка в зерні сої за інкувації бульбочковими бактеріями В. іаропісит на фоні різних доз мінерального азоту

Штам	Норма азоту	Кількість бобів на одній рослині		Маса зерна з однієї рослини		Маса зерна з рослини однієї посудини		Вміст білка в зерні	
		шт.	% до штаму 6346	г	% до штаму 6346	г	% до штаму 6346	%	% до штаму 6346
6346	0,25	6,50±0,15	100	1,48±0,16	100	11,91±1,31	100	33,79±1,70	100
B16		5,40±0,37	83,1	1,52±0,19	102,7	12,16±1,14	102,1	32,13±2,14	95,1
B20		5,50±0,29	84,6	1,61±0,11	108,8	13,22±1,51	110,9	34,30±3,02	101,5
T21-2		6,45±0,51	99,2	1,58±0,15	106,7	12,84±1,47	107,8	34,72±1,92	102,7
6346	1,0	4,37±0,25	100	1,52±0,13	100	12,21±1,53	100	33,62±0,27	100
B16		4,71±0,30	107,8	1,67±0,18	109,9	13,42±1,51	109,9	32,90±0,13	98,7
B20		5,12±0,71	117,2	1,79±0,20	117,7	14,32±1,45	117,3	34,66±0,27	103,1
T21-2		5,45±0,63	124,7	1,73±0,29	113,8	14,64±1,32	119,9	34,20±0,30	101,7

більшу масу зерна з рослини. Отже, приріст зернової продуктивності сої, бактеризованої мутантами В20 і Т21-2, за 0,25 норми азоту становив 10,9 і 7,8 %, за 1,0 норми азоту — відповідно 17,3 і 19,9 % порівняно з рослинами, інокульованими виробничим штамом 634 (табл. 6).

Фізіологічна роль симбіотрофного азоту в бобових рослин полягає не лише в підвищенні урожаю, а й у збільшенні вмісту білка в зерні та зеленій масі рослин. Визначення біологічної цінності зерна сої, зокрема вмісту в ньому протеїну, показали, що інокуляція рослин бульбочковими бактеріями не завжди забезпечувала його приріст у зерні. Так, за вирощування сої на піщаному субстраті з різними нормами (0,25 та 1,0) мінерального азоту додаткове накопичення протеїну спостерігали лише в зерні рослин, бактеризованих мутантами Т21-2 і В20 порівняно з рослинами, інокульованими штамом 634б. Наприклад, за 0,25 норми азоту вміст білка в зерні рослин, інокульованих мутантом Т21-2, був найвищим серед досліджуваних ризобій (приріст до штаму контролю становив 2,75 %), водночас за 1,0 норми азоту за згаданим показником домінував азотостійкий мутант В20 (приріст до штаму контролю за цих умов дорівнював 3,1 %). Отже, за інокуляції досліджуваними культурами бульбочкових бактерій В20 і Т21-2 вміст білка в зерні сої сорту Васильківська мав тенденцію до збільшення порівняно з рослинами, бактеризованими штамом 634б, як за оптимального, так і надмірного їх забезпечення мінеральним азотом у формі  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (див. табл. 6). Залежності між підвищенням урожаю зерна та вмістом у ньому білка в рослин, інокульованих азотостійкими бульбочковими бактеріями, за цих умов не зафіксовано.

На підставі проведених досліджень можна дійти висновку, що підвищена доза мінерального азоту негативно впливала на формування й функціонування симбіотичного апарату сої, що виявлялося у пригніченні бульбочкоутворення, ослабленні азотфіксувальної активності та зміщенні цих процесів на пізніші терміни. Найвищу азотфіксувальну активність мали рослини, бактеризовані мутантом В20, що зумовлено масою утворених корневих бульбочок за даних умов (1,0 норми азоту) порівняно з іншими мікросимбіонтами.

Нові відібрані в чистій культурі за стійкістю до мінерального азоту Тn5-мутанти *V. japonicum* виявилися стійкішими і здатними до активнішої азотфіксації порівняно зі штамом-стандартом за 1,0 норми внесеного мінерального азоту. Для забезпечення формування ефективних бобово-ризобіальних симбіозів сої за підвищеного рівня мінерального азоту рекомендовано застосовувати передпосівну інокуляцію насіння азотостійким штамом В20 *V. japonicum*, здатним формувати азотфіксувальні бульбочки, що сприяє повноцінному живленню рослин як мінеральним, так і симбіотрофним азотом, інтенсифікує вегетативний ріст, забезпечує формування більшого урожаю зерна з підвищеним вмістом протеїну.

1. Аветисов Л.А., Майстренко Г.Г. Влияние инфицирования и минерального азота на полимеры клеточных стенок корней бобовых // Изв. СО АН СССР. Сер. Биология. — 1989. — Вып. 2. — С. 67—70.
2. Воробей Н.А., Коць С.Я., Маменко П.М. Реалізація азотфіксувального потенціалу Тn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* у симбіозі з рослинами сої // Biotechnol. Acta. — 2013. — 6, N 5. — С. 122—130.
3. Воронкова Н.А. Значение азотфиксации и бактериальных удобрений в регулировании азотного питания растений // Биологические источники элементов минерального пи-



- тания растений: 3-и Сиб. агрохим. Прянишниковские чтения: Материалы Междунар. науч. конф. (Омск, 12—16 июля 2005) / Сиб. НИИ сел. хоз-ва. — Новосибирск, 2006. — С. 191—195.
4. *Глянько А.К., Митанова Н.Б.* Физиологические механизмы отрицательного влияния высоких доз минерального азота на бобово-ризобиальный симбиоз // Вестн. Харьков. аграр. ун-та. Сер. Биология. — 2008. — 2 (14). — С. 26—41.
  5. *Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М.* Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1964. — 388 с.
  6. *Гукова М.М.* Особенности питания бобовых растений свободным и связанным азотом: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1974.
  7. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 352 с.
  8. *Злотников К.М., Кадырова М.К., Кудрявцева А.И.* Устойчивые к аммонии и нитрату мутанты ризобий // Генетика. — 1995. — 31, № 6. — С. 773—777.
  9. *Коць С.Я., Маліченко С.М., Кругова О.Д. та ін.* Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом. — К.: Логос, 2001. — 271 с.
  10. *Коць С.Я., Михалків Л.М.* Фізіологія симбіозу та азотне живлення люцерни. — К.: Логос, 2005. — 300 с.
  11. *Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф. и др.* Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобиальный симбиоз. — Киев: Логос, 2010. — Т 1. — 506 с.
  12. *Кретович В.Л.* Биохимия усвоения азота воздуха растениями. — М.: Наука, 1994. — 168 с.
  13. *Куликов Н.Ф.* К вопросу об участии бобово-ризобиального симбиоза в повышении урожайности и качества зерна сои в Приморском крае // С.-х. биология. — 2006. — № 1. — С. 63—66.
  14. *Львов Н.П.* Нитрогеназа: структура и условия функционирования // Молекулярные механизмы усвоения азота растениями. — М.: Наука, 1983. — С. 34—52.
  15. *Магомедов Р.Д., Цехмейструк Н.Г., Шелякин В.А. и др.* Влияние различных штаммов *Rhizobium japonicum* на урожайность сои / Масличн. культуры. — 2011. — № 2. — С. 159—162, 186, 194—195.
  16. *Мандровская Н.М.* Симбиотические свойства клубеньковых бактерий гороха, образующих клубеньки на фоне повышенного содержания минерального азота // Физиология и биохимия культ. растений. — 1994. — 26, № 3. — С. 240—246.
  17. *Назарюк В.М., Якутина О.П., Кленова М.И.* Роль почвенных ресурсов, минерального питания и симбиотической азотфиксации в повышении продуктивности растений // С.-х. биология. — 2004. — 5. — С. 13—21.
  18. *Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін.* Біологічний азот. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
  19. *Посыпанов Г.С.* Азотфиксация бобовых культур в зависимости от почвенно-климатических условий // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. — М.: Наука, 1985. — С. 75—78.
  20. *Саданов А.К.* Роль микроорганизмов в повышении урожайности бобовых культур и улучшении качества кормов. — Алматы: Гылым, 2006. — 220 с.
  21. *Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М.* Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрохимические аспекты. — Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», ИЦиГ СО РАН, 2006. — 134 с.
  22. *Фомичев Е.Е., Козлова С.Э., Угай Т.Г.* Влияние ризоторфина, возрастающих доз азотных удобрений и их совместного действия на продуктивность бобовых растений // Вестн. Томск. пед. ун-та. — 2003. — Вып. № 4. — С. 109—112.
  23. *Gautam A.S.* Influence of nitrogen sources on nodulation and nitrogenase activity in common bean // Int. J. Agr. Sci. — 2006. — N 1. — P. 32—84.
  24. *Gibson A.H., Yarper J.E.* Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum* // Crop. Sci. — 1985. — 25, N 3. — P. 497—501.
  25. *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.
  26. *Lowry O.H., Rosenbrought N.Z., Farr A.L., Randall R.Z.* Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 153. — P. 265.
  27. *Sing Bhupinder, Usha Kalidindi.* Nodulation and symbiotic nitrogen fixation of cowpea genotypes as affected by fertilizer nitrogen // J. Plant Nutr. — 2003. — 26, N 2. — P. 463—473.
  28. *Singh R.K., Singh R.M.* Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium* defective in nitrate system // Acta Microbiol. Polonica. — 1983. — 32, N 1. — P. 31—35.

Отримано 30.09.2015

ОЦЕНКА СИМБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЗОТОУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ  
*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА

Н.А. Воробей<sup>1</sup>, С.Я. Коць<sup>1</sup>, Л.А. Кудрявченко<sup>1</sup>, Е.В. Караушу<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>2</sup>Учебно-научный центр «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко

В вегетационных опытах изучена эффективность инокуляции сои азотоустойчивыми клубеньковыми бактериями *B. japonicum* при оптимальном и повышенном обеспечении растений минеральным азотом. Установлено, что бактериализация семян селекционированным азотоустойчивым штаммом В20 *B. japonicum* наиболее эффективно обеспечивает формирование клубеньков на корнях растений, способствует полноценному питанию минеральным и симбиотрофным азотом, интенсифицирует вегетативный рост, повышает урожайность зерна, улучшает его качество при выращивании сои на 1 норме минерального азота по Гельригелю.

EVALUATION OF SYMBIOTIC PROPERTIES OF NITROGEN-RESISTANT STRAINS  
*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* UNDER THE INFLUENCE OF MINERAL NITROGEN

N.A. Vorobey<sup>1</sup>, S.Ya. Kots<sup>1</sup>, L.A. Kudryavchenko<sup>1</sup>, O.V. Karaushu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

<sup>2</sup>«Institute of Biology» Taras Shevchenko Kiev National University

64 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine

The effectiveness of soybean inoculation by nitrogen-resistant nodule bacteria *B. japonicum* under optimal and excessive supply of plant by mineral nitrogen in pot experiments was studied. It is shown that the inoculation of seeds by selected nitrogen-resistant strain В20 *B. japonicum* most effectively ensures the formation of nitrogen fixation nodules on the roots of plants, provide full supply with mineral and symbiotrophic nitrogen, intensifying vegetative growth, increases productivity and improves grain quality under cultivation of soybean is sand culture at one norm of mineral nitrogen of Gelrigel.

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