

**ФІЗІОЛОГІЧНА ВЗАЄМОДІЯ СОЇ З НОВИМИ
Tn5-МУТАНТАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

Даценко В.К., Мельник В.М., Коць С.Я., Омельчук С.В.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська, 31/17, м. Київ, 03022, Україна
E-mail: azot@ifrg.kiev.ua

*Вивчали вплив інокуляції сої новими Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* із полярними симбіотичними властивостями на ефективність симбіозу, інтенсивність фотосинтезу й активність ферментів антиоксидантної дії в корневих бульбочках рослини-хазяїна. Більшість досліджуваних мутантів були високо вірулентними, проте ця властивість не завжди прямо залежала від рівня інших параметрів. Встановлено прямий зв'язок між азотфіксувальною активністю корневих бульбочок та інтенсивністю фотосинтезу рослини-хазяїна. Виявлено два типи динаміки цих процесів із максимумами їх інтенсивності відповідно в фазу бутонізації або цвітіння сої.*

Ключові слова: *Tn5-мутант, ризобії, вірулентність, азотфіксація, фотосинтез, каталаза.*

Одним із підходів при дослідженні фізіолого-біохімічних процесів, які відбуваються в симбіозі бобових рослин із бульбочковими бактеріями, є створення і вивчення різних за ефективністю симбіотичних систем з метою з'ясування впливу окремих факторів на формування і подальший перебіг даного процесу. Відомо, що основними критеріями ефективності бобово-ризобіального симбіозу є вірулентність, конкурентоспроможність і активність мікросимбіонта, а також загальна ефективність симбіозу [1, 5, 6]. Кількість біологічно фіксованого азоту може безпосередньо впливати на перебіг інших фізіологічних процесів у рослинах і визначати урожайність останніх.

Отже, створення різних за ефективністю азотфіксувальних систем бобові рослини – ризобії як моделей для вивчення фізіолого-біохімічних особливостей функціонування симбіотичних взаємовідносин цих біологічних особин має велике теоретичне значення і, без сумніву, практичну цінність.

Для вирішення цього питання необхідно мати у своєму

розпорядженні широкий спектр штамів бульбочкових бактерій з контрастними симбіотичними властивостями, що дозволило б створювати різні за ефективністю симбіотичні бобово-ризобіальні системи.

Завданням досліджень було вивчення впливу раніше одержаних нами Tn5-мутантів штаму *Bradyrhizobium japonicum* 646 [2, 3] із полярними симбіотичними властивостями на формування і функціонування їх симбіозу з соєю, динаміки інтенсивності газообміну CO₂ у даної рослини і зв'язку цього процесу з азотфіксувальною активністю окремих Tn5-мутантів, а також, з'ясування рівня активності ферментів антиоксидантної дії у рослинах залежно від інокуляції різними за активністю транспозоновими мутантами.

Матеріали і методи. Інтенсивність фотосинтезу визначали за допомогою оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ПІАМ-5М (Росія), включеного за диференціальною схемою. Середню частину повністю сформованого листка сої без видимих ознак старіння розміщували у термостатованій камері з робочою площею 20 см². Густина потоку ФАР у камері становила 400 Вт/м², температуру підтримували на рівні 25 °С. Через камеру продували повітря із природною концентрацією CO₂ зі швидкістю 1 л/хв. Інтенсивність поглинання CO₂ на світлі вимірювали через 30-40 хв після розміщення листка у камері, при досягненні стаціонарного рівня. Інтенсивність фотосинтезу розраховували на одиницю біомаси надземної частини [4].

Активність ферменту антиоксидантної дії каталази визначали за методом Починка [7] в модифікаціях Зальцведеля і Даззо [14] та Френсіса й Александра [11]. Величину азотфіксувальної активності бульбочок сої вимірювали, застосовуючи ацетиленовий метод, запропонований Харді зі співавт. [12].

Результати та їх обговорення. Відомо, що формування активного бобово-ризобіального симбіозу – це результат складної взаємодії рослинного і бактеріального геномів [9]. Для створення різних за ефективністю симбіотичних систем ми використовували сою сорту Мар'яна і одержані нами раніше Tn5-мутанти *Bradyrhizobium japonicum* 646. Рослини вирощували в умовах вегетаційного дослідю.

Одним із критеріїв відбору нових штамів ризобій є їх вірулентність. Результати наших досліджень показали (рис. 1),

що кількість корневих бульбочок сої у всіх варіантах досліді послідовно зростала протягом усього періоду спостереження. Динаміка утворення бульбочок упродовж вегетаційного періоду сої, інокульованої окремими транспозоновими мутантами, була неоднаковою. Так, у фазу формування 3-х справжніх листків найвірулентнішим виявився Tn5-мутант 21-2, за інокуляції яким утворилося на 25 % більше бульбочок, ніж у випадку інокуляції вихідним штамом 646. У цей же час особливо низьку вірулентність виявив Tn5-мутант 118-8, який формував на кореневій системі на 40 % менше бульбочок, ніж вихідний штам.

Після настання фази бутонізації сої зростання кількості бульбочок відзначали у рослин, інокульованих мутантами 107 і 113. Зазначена тенденція зберігалася до закінчення спостережень: під час цвітіння сої різниця в кількості сформованих бульбочок за умови інокуляції цими мутантами і вихідним штамом 646 складала відповідно 62 і 112 %. Нодуляційна активність інших досліджуваних Tn5-мутантів була на рівні активності вихідного штаму або навіть нижчою.

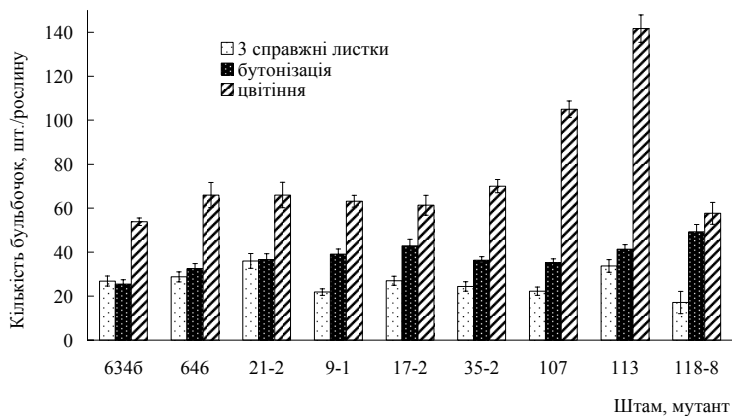


Рис. 1. Утворення бульбочок на корнях сої під впливом інокуляції Tn5-мутантами *V. japonicum* 646

Одним із найважливіших показників ефективності функціонування симбіозу бобових рослин із ризобіями є азотфіксувальна активність бульбочок. Установлено (табл. 1), що інокуляція сої окремими Tn5-мутантами по-різному впливала на інтенсивність цього процесу. Зокрема, обробка посівного

матеріалу сої мутантами 21-2, 9-1 і 17-2 стимулювала зростання азотфіксувальної активності протягом усього періоду спостереження у порівнянні з вихідним штамом 646 і виробничим штамом 6346. При цьому найвище значення показника при інокуляції сої спостерігали у різні фази розвитку рослини-хазяїна: у мутанта 21-2 пік азотфіксації припадав на фазу бутонізації рослин, а у мутантів 9-1 і 17-2 – на фазу цвітіння.

Відомо, що між нодуляційною здатністю бульбочкових бактерій і азотфіксувальною активністю бульбочок не завжди існує прямий зв'язок. Підтвердженням цьому є наведені на рис. 1 і в табл. 1 дані про те, що високовірулентні мутанти 107 і 113 характеризуються низькою азотфіксувальною активністю, тоді як мутант 21-2, не дивлячись на найменшу кількість утворених бульбочок до фази бутонізації рослин, забезпечував у цей час високий рівень азотфіксації.

Таблиця 1. Динаміка загальної азотфіксувальної активності корневих бульбочок сої, інокульованої Tn5-мутантами V. жорнісит 646

Варіанти досліджу	Фаза розвитку рослин		
	3 справжні листки	бутонізація	цвітіння
Штами			
6346	8,34 ± 0,49	37,77 ± 2,86	44,75 ± 4,39
646	6,38 ± 0,52	40,11 ± 3,74	38,84 ± 2,35
Tn5-мутанти			
21-2	9,64 ± 0,58	49,05 ± 3,63	46,72 ± 3,06
9-1	8,69 ± 0,44	34,59 ± 3,14	62,86 ± 5,56
17-2	12,33 ± 0,72	42,59 ± 3,81	48,20 ± 4,77
35-2	1,52 ± 0, 14	15,32 ± 1,12	32,88 ± 2,94
107	0,67 ± 0,06	4,99 ± 0,43	9,37 ± 0,84
113	0,19 ± 0,02	1,06 ± 0,11	7,18 ± 0,70
118-8	0,04 ± 0, 01	0,30 ± 0,03	4,12 ± 0,33

Наступне завдання роботи полягало у з'ясуванні питання, яким чином азотфіксувальна активність бульбочок сої, сформованих за участю різних Tn5-мутантів, пов'язана з продуктивністю рослини-хазяїна. З цією метою був закладений вегетаційний дослід, результати якого свідчать про пряму залежність між даними показниками (табл. 2). При цьому інокуляція активними мутанта-

ми 21-2 і 17-2 зумовила збільшення зернової продуктивності сої на 13–23 % у порівнянні з вихідним штамом *V. japonicum* 646. При обробці ж мало- і середньоактивними мутантами її урожайність зменшувалась на 17–47 %.

Таблиця 2. Ефективність симбіотичних систем сої, створених за участі Tn5-мутантів *V. japonicum* 646

Варіанти дослідів	Маса насіння, г/посудину	\pm до показника <i>V. japonicum</i> 634б, %	\pm до показника <i>V. japonicum</i> 646, %
Штам			
634б	21,71	–	+ 1,31
646	21,43	– 1,29	–
Tn5-мутант			
21-2	26,43	+ 21,74	+ 23,33
9-1	22,70	+ 4,56	+ 5,93
17-2	24,13	+ 11,15	+ 12,60
35-2	17,72	– 18,38	– 17,31
107	15,90	– 26,76	– 25,80
113	11,34	– 47,77	– 47,08
118-8	11,95	– 44,96	– 44,24
НІР _{0,05}	2,63		

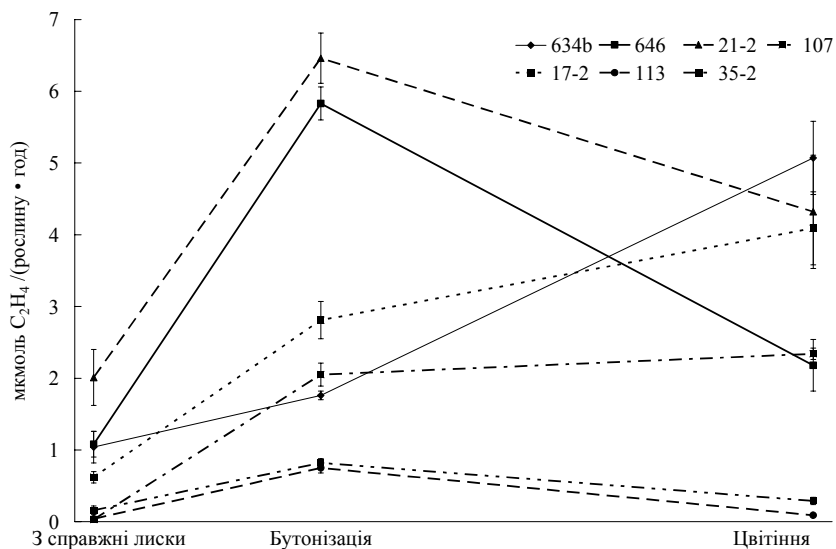
Неоднаковий ефект від інокуляції сої різними за активністю Tn5-мутантами ризобій спонукав до вивчення активності каталази, адже відомо [8, 10], що у процесі фіксації молекулярного азоту можуть утворюватися супероксидні та гідроксильні радикали, які нейтралізуються ферментами-антиоксидантами. Показано, що активність каталази у бульбочках рослин, інокульованих активними транспозоновими мутантами 21-2, 9-1 і 17-2 та вихідним штамом 646, вища у порівнянні з активністю фермента у бульбочках сої, бактеризованої малоактивними Tn5-мутантами 107 і 113 (табл. 3). Таким чином, встановлено зв'язок між активністю каталази у корневих бульбочках та азотфіксувальною активністю мікросимбіонта. Висока активність каталази у бульбочках є необхідною умовою активного функціонування симбіотичних систем сої як представника рослин з уреїдним типом обміну речовин.

Таблиця 3. Динаміка каталазної активності у бульбочках сої, інокульованої Tn5-мутантами *B. japonicum* 646 (мкмоль H_2O_2/g сирої речовини за хв.)

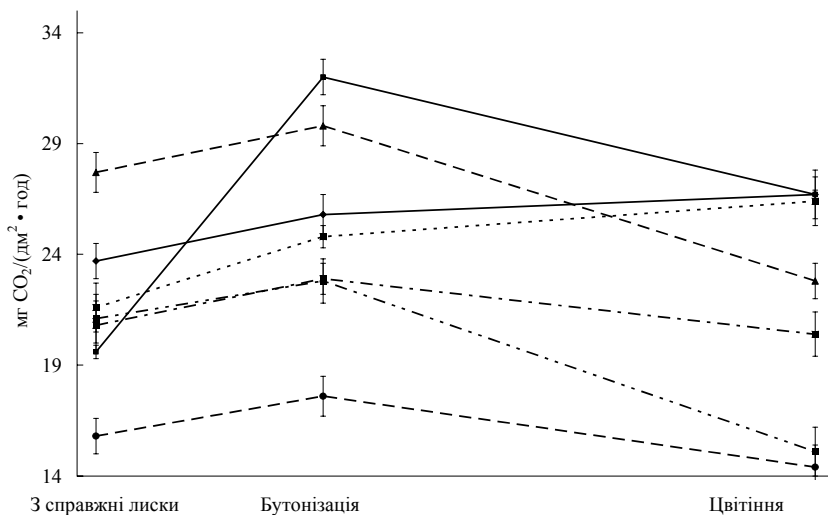
Варіанти дослідів	Фаза розвитку рослин		
	3 справжні листки	бутонізація	цвітіння
Штами			
646	124 ± 3	256 ± 7	128 ± 4
Tn5-мутанти			
21-2	124 ± 4	232 ± 8	110 ± 4
9-1	110 ± 4	212 ± 9	110 ± 4
17-2	94 ± 3	304 ± 10	120 ± 5
107	64 ± 3	120 ± 7	92 ± 3
113	76 ± 3	172 ± 9	66 ± 3

Адаптивне значення більшості рослинно-мікробних симбіозів полягає у використанні обома партнерами цього процесу нових джерел живлення і енергії. У бобово-ризобіальних системах це досягається шляхом поєднання рослинного фотосинтезу і бактеріальної азотфіксації. Симбіотично фіксований азот експортується з бульбочок бобових у коріння й надземну частину рослини. У свою чергу, фотоасиміляти слугують енергетичним матеріалом, акцепторами симбіотично фіксованого азоту і джерелом вуглецю для росту кореневих бульбочок [13].

Враховуючи, що дані, які стосуються взаємозв'язку динаміки інтенсивності фотосинтезу з азотфіксувальною активністю кореневих бульбочок, сформованих ризобіальними штамми різної активності, відносно небагато, ми намагались з'ясувати це питання на прикладі досліджуваних нами Tn5-мутантів *B. japonicum* 646. У результаті підтверджено, що між азотфіксувальною активністю та інтенсивністю фотосинтезу сої на різних етапах її онтогенезу існує прямий зв'язок. У рослин, інокульованих високовірulentними малоактивними транспозоновими мутантами 107 і 113 відмічали зниження цих показників у всі фази спостереження, тоді як у рослин, бактеризованих високоактивними транспозоновими мутантами 21-2, 17-2 і 9-1, інтенсивність фотосинтезу листків перевищувала або була на рівні показників вихідного штаму (рис. 2).



A



B

*Рис. 2. Динаміка азотфіксувальної активності (А) й інтенсивності фотосинтезу листків (Б) рослин сої, інокульованої різними штамами і Tn5-мутантами *V. jarrowii* 646*

Виявлено два типи динаміки азотфіксувальної активності та інтенсивності фотосинтезу. Перший – з максимумами цих показників у фазу бутонізації і зниженням під час цвітіння рослин (Tn5-мутанти 21-2, 35-2 і 113 та вихідний штам 646). Другий тип характеризувався зростанням азотфіксувальної активності та інтенсивності фотосинтезу протягом усього періоду спостереження із найбільшими значеннями у фазу цвітіння сої (мутант 17-2, і штам 6346). Транспозоновий мутант 107 займав проміжне положення. За типом асиміляційної активності рослини, інокульовані штамми 646 і 6346, відносились до різних груп – першої і другої, відповідно. Рослини, інокульовані Tn5-мутантами 21-2 і 17-2, формували урожай насіння, вищий, ніж у контролі, але належали до різних типів виявленої нами динаміки асиміляційної активності (див. табл. 2). Очевидно, підвищення продуктивності симбіотичних систем сої можна досягнути шляхом добору різних генотипів мікро- і макросимбіонтів із метою поєднання особливостей обох типів динаміки з підтримкою високих показників азотфіксувальної активності й інтенсивності фотосинтезу в генеративну фазу розвитку. Необхідною умовою такого поєднання є висока потенційна активність фотосинтетичного апарату рослин та гальмування старіння листків після цвітіння.

1. Коць С.Я. Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом / [С.Я. Коць, С.М. Маліченко, О.Д. Кругова та ін.]. – К.: Логос, 2001. – 271 с.

2. Маліченко С.М. Ефективність симбіотичних систем, утворених за участю сої і транспозантів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 646 / С.М. Маліченко, В.К. Даценко, В.М. Василюк // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту: Сер. Біологія. – 2006. – Вип. 18. – С. 144-148.

3. Маліченко С.М. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* / С.М. Маліченко, В.К. Даценко, В.М. Василюк, С.Я. Коць // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – Т. 39, № 5. – С. 409-418.

4. Мокронос А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза / А.Т. Мокронос. – М.: Наука, 1981. – 196 с.

5. Біологічний азот / [В.П. Патики, С.Я. Коць, В.В. Волкогон та ін.]. – К.: Світ, 2003. – 424 с.

6. Мікроорганізми і альтернативне землеробство / [В.П. Патики, І.А. Тихонович, І.Д. Філіп'єв та ін.]. – К.: Урожай, 1993. – 175 с.

7. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа / Х.Н. Починок. – К.: Наукова думка, 1976. – 334 с.

8. Скулачев В.П. О биохимических механизмах эволюции и роли кислорода /В.П. Скулачев //Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 11. – С. 1570-1579.

9. Тихонович И.А. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции /И.А. Тихонович, Н.А. Проворов. – СПб.: Наука, 1998. – 194 с.

10. Шаповал Г.С. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода /Г.С. Шаповал, В.Ф. Громовая // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75, № 2. – С. 5-13.

11. Fransis A.J. Catalase activity and nitrogen fixation in legume root nodules /A.J. Fransis, M. Alexander //Can. J. Microbiol. – 1972. – Vol. 18, № 9. – P. 861-868.

12. Hardy R.W.F. The acetylene-ethylene assay for N_2 -fixation: laboratory and field evaluation /R.W.F. Hardy, R.D. Holsten, E.K. Jackson, R.C. Burns //Plant Physiol. – 1968. – Vol. 43, N 8. – P. 1185-1207.

13. Hunt S. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity /S. Hunt, D.B. Layzell //Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1993. – Vol. 44. – P. 483-511.

14. Salzwedel J.L. pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants /J.L. Salzwedel, F.B. Dazzo //Mol. Plant – Microbe Interactions. – 1993. – Vol. 6, № 1. – P. 127-134.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СОИ С НОВЫМИ TN5-МУТАНТАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Даценко В.К., Мельник В.Н., Коць С.Я., Омельчук С.В.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

*Изучали влияние инокуляции сои новыми Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*, обладающими полярными симбиотическими свойствами, на эффективность симбиоза, интенсивность фотосинтеза и активность ферментов антиоксидантного действия в корневых клубеньках растения-хозяина. Большинство исследуемых мутантов были высоковирулентными, однако это свойство не всегда прямо зависело от уровня других параметров. Установлена прямая связь между азотфиксирующей активностью корневых клубеньков и интенсивностью фотосинтеза растения-хозяина. Выявлено два типа динамики этих процессов с максимумами их интенсивности, соответственно, в фазу бутонизации или цветения сои.*

Ключевые слова: *Tn5-мутанты, ризобии, вирулентность, азотфиксация, фотосинтез, каталаза.*

PHYSIOLOGICAL INTERACTION OF SOYBEAN PLANTS AND NEW TN-5 MUTANTS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Datsenko V.K., Mel'nyk V.M., Kots S.Ya., Omel'chuk S.V.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

*The influence of soybean seeds inoculation with Tn-5 mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with polar symbiotic properties on symbiosis efficiency, photosynthetic intensity and activity of antioxidant enzymes in root nodules of host plant was studied. Most of the selected mutants were highly virulent, but as was shown there were no considerable correlation between studied parameters. The direct relationship of nitrogen fixation activity of roots nodules and photosynthesis intensity of host plant was established. The two types of dynamics of these processes were determined with their maximum values in blooming and flowering stages, respectively.*

Key words: *Tn-5 mutant, rhizobia, virulence, nitrogen fixation, photosynthesis, catalase.*