УДК 576.871.155.557

СЕЛЕКЦІЯ ГЕНЕТИЧНО МАРКОВАНИХ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ЗА СИМБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Н.А. ВОРОБЕЙ

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

У результаті селекції мутантів *Bradyrhizobium japonicum*, отриманих з використанням вектора pSUP5051::Tn5mob, за показниками «азотфіксація», «вірулентність», «ефективність симбіозу» відібрано генетично марковані ризобії В-2, В-16, В-18, В-20, В-21 із поліпшеними властивостями. Tn5-мутанти В-20 і В-21 активніше асимілювали N_2 в симбіозі з соєю сортів Аннушка і Васильківська, а мутанти В-18 і В-2 — із сортами сої Мар'яна і Колбі. Зроблено висновок про доцільність подальшого вивчення цих мутантів як можливих ефективних мікросимбіонтів із підвищеною комплементарністю до різних сортів сої.

Ключові слова: Bradyrhizobium japonicum, Tn5-мутанти, транспозоновий мутагенез, соя, азотфіксація, ефективність, симбіоз.

Сьогодні у багатьох країнах світу проводяться інтенсивні дослідження біологічної фіксації атмосферного азоту. Вивчаються можливості підвищення ефективності цього процесу, який відіграє важливу роль у кругообігу азоту в біосфері, та створення нових азотфіксувальних симбіотичних асоціацій окрім існуючих між бобовими рослинами і бактеріями роду *Rhizobium* [10, 11, 17]. Тому на сучасному етапі провідні лабораторії світу працюють над проблемою генно-інженерного конструювання штамів ризобій із підвищеною симбіотичною активністю [9, 17, 21]. Для вирішення питання окреслено кілька підходів, зокрема збільшення числа копій структурних або регуляторних nif-генів, зростання потоків енергії до нітрогенази внаслідок підвищення активності dct-генів, поєднання в одному штамі генів, які визначають специфічність до різних рослин-хазяїв [14]. Перспективним напрямом є активування генів конкурентоздатності, необхідних інтродукованим азотфіксувальним штамам для конкуренції в польових умовах за утворення бульбочок із ґрунтовою мікрофлорою. Актуальний також прямий добір мутантів ризобій із підвищеною симбіотичною активністю [17, 18].

Перші кроки на шляху спрямованого конструювання господарсько-цінних штамів бульбочкових бактерій зроблено введенням транспозонів у гени, що контролюють симбіотичну активність [18]. Механізм впливу транспозону поки що остаточно не досліджений. Ймовірно, його інсерція інактивує гени, функцією яких є негативна регуляція симбіотичної азотфіксації. Конструювання штамів бульбочкових бактерій із господарсько-цінними властивостями буде результативним лише

© Н.А. ВОРОБЕЙ, 2013

в разі, якщо проводитиметься паралельно зі створенням нових сортів бобових рослин [17, 18], які раціонально витрачатимуть продукти фотосинтезу на енергозатратну реакцію відновлення молекулярного азоту до іонів амонію і максимально використовуватимуть симбіотрофний азот для розвитку і формування високого врожаю. В останні роки селекція ризобій спрямована на добір як штамів, найефективніших щодо певного виду і сорту рослин [4], так і штамів із розширеним спектром комплементарності (ефективних у симбіозі з різними сортами рослини-хазяїна).

Нині у відділі симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України у селекції бульбочкових бактерій успішно застосовують транспозоновий мутагенез [1]. Унаслідок інсерції Tn5 до геному бульбочкових бактерій отримано генетично марковані штами, особливістю яких є здатність (набута внаслідок мутагенезу) рости на мінеральних поживних середовищах із сульфатом канаміцину (200 мкг/мл) та змінені культуральні й симбіотичні властивості, які відрізняють їх від вихідного (батьківського) штаму [1, 5, 6].

Метою нашої роботи була селекція Tn5-мутантів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* за симбіотичними властивостями з використанням різних сортів сої.

Методика

Досліди проводили із соєю *Glycine max* (L.) Merr. сортів Аннушка селекції ЧП НССФ «Соєвий вік», Мар'яна та Васильківська — спільної селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, Селекційно-генетичного інституту НААН України та Інституту землеробства НААН України, а також Колбі — канадської селекції Хайленд Сидс Томпсон ЛТД.

Насіння сої інокулювали бульбочковими бактеріями *B. japonicum* із колекції азотфіксувальних мікроорганізмів ІФРГ НАН України — штамами 634б, 646 та Tn5-мутантами (В-1 — В-21) штаму 646. Мутанти отримані методом транспозонового мутагенезу з використанням вектора pSUP5011::Tn5mob, здатного переносити транспозон Tn5 до ризобіальної клітини [20]. Генетично марковані бульбочкові бактерії відібрані за здатністю до репродукції на середовищі ТУ [7], збагаченому антибіотиками канаміцином (Km) і стрептоміцином (Str) відповідно 200 і 500 мкг/мл. Для приготування інокуляційних суспензій ризобії вирощували на манітно-дріжджовому агарі (МДА) [19] за 28 °С протягом 7—8 діб. Біомасу бактерій із поверхні агару змивали водою, суспендували. Бактеріальний титр суспензій дорівнював 10^9 клітин/мл.

Для зернобобових культур, до яких належить соя, методика Федорова, що полягає у визначенні азотфіксувальної активності (АФА) бульбочок в умовах стерильного лабораторного досліду на ранньому етапі розвитку симбіозу, не зовсім придатна [13], оскільки через великий запас азоту в насінні сої рослини успішно долають перші стадії вегетативного розвитку без включення нітрогеназного комплексу бульбочок. Тому первинний добір Tn5-мутантів *B. japonicum* за симбіотичними властивостями й Eff^{++}-фенотипом рослин ми проводили в умовах вегетаційного досліду. Рослини вирощували у пластикових посудинах, простерилізованих 20 %-м розчином H_2O_2, на промитому річковому піску (4 кг) за 60 %-ї вологості субстрату. Джерелом мінерального живлення слугувала суміш Гельригеля [2] з 0,25 норми азоту. Насіння сої сорту Мар'яна стерилізу-

вали протягом 15 хв 70 %-м етанолом, промивали проточною водою й інокулювали 1 год суспензіями бульбочкових бактерій. Повторність варіантів дослідів семиразова.

Симбіотичний фенотип перспективних за господарсько-цінними властивостями Tn5-мутантів вивчали також в умовах дрібноділянкового польового досліду на сої сортів Аннушка, Васильківська, Мар'яна, Колбі. Досліди проводили на ділянці ІФРГ НАН України (ґрунт сірий супіщаний, pH 5,9—6,0, вміст гумусу — 1,2—1,5 %, азоту — 10,4—12,6, фосфору — 8,8—10,1, калію — 9,4—10,2 мг/100 г ґрунту). Контроль на наявність у ґрунті ризобій сої — негативний. У рядки завдовжки 1 м висівали по 50 насінин сої, бактеризованих *B. japonicum*. Повторність варіантів досліду чотириразова, розміщення — рендомізоване.

Контрольними у дослідах були варіанти з інокуляцією насіння сої штамами *B. japonicum* 646 (вихідний) і 634б (виробничий).

Для аналізу рослини відбирали у фази бутонізації (30-та доба після появи сходів) і бутонізації—початку цвітіння (42-га доба). Ефективність формування і функціонування симбіозу сої з Tn5-мутантами *B. japonicum* оцінювали за кількістю та масою кореневих бульбочок, їх азотфіксувальною активністю, показниками надземної маси рослин. Азотфіксувальну активність визначали за рівнем ацетиленвідновлювальної активності кореневих бульбочок методом Харді та співавт. [15], загальну АФА виражали в мкмоль C_2H_4/(рослину · год), питому — в мкмоль C_2H_4/(г бульбочок · год). Газову суміш аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6855 Network GC System (США), визначення проводили у п'ятиразовій повторності.

Статистичну обробку експериментальних даних виконано за Доспєховим [3] із використанням програми Microsoft Excel 2010. У таблицях і на рисунках наведено середньоарифметичні значення та їх стандартні похибки.

Результати та обговорення

До первинного скринінгу за ознаками «азотфіксація», «вірулентність», «ефективність симбіозу» залучили Tn5-мутанти *B. japonicum*, які внаслідок інсерційного мутагенезу набули резистентності до канаміцину і зберігають цю властивість, що підтверджується інтенсивним ростом культур на селективному середовищі МДА + 200 мкг/мл Km.

У результаті досліджень з'ясовано, що рослини сої сорту Мар'яна, інокульовані Tn5-мутантами, відрізнялися від контрольних за кількістю симбіотичних утворень (табл. 1, вегетаційний дослід) та їх розміщенням на кореневій системі. Окремі Tn5-мутанти за вірулентністю, швидкістю формування бульбочок, нітрогеназною активністю й ефективністю симбіозу перевершували штами 646 і 634б *B. japonicum*. Проте відібрані ризобії з підвищеною азотфіксувальною активністю чи здатністю викликати утворення більшого числа бульбочок не завжди характеризувалися симбіотичним Eff^{++}-фенотипом, тобто симбіоз рослин сої з цими мутантами не завжди супроводжувався збільшенням надземної маси. Наприклад, інтенсивність асиміляції N_2 кореневими бульбочками сої, утвореними Tn5-мутантом В-2, дорівнювала 8,66 мкмоль C_2H_4/(рослину · год), а бульбочками, ініційованими штамом 646 *B. japonicum* — 6,21 мкмоль C_2H_4/(рослину · год), проте це не приводило до адекватного збільшення надземної маси рослин сої відповідного варіанта досліду. І навпаки, у

ТАБЛИЦЯ 1. Властивості Tn5-мутантів бульбочкових бактерій B. japonicum у симбіозі із соєю сорту Мар'яна

Варіант	Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_4 за 1 год		Кількість бульбочок, шт/рослину	Маса бульбочок, г/рослину	Надземна маса, г
	на рослину	на 1 г бульбочок			
634б	11,81±0,76	49,25±2,97	40,0±2,6	0,30±0,001	4,83±0,30
646	6,21±0,47	23,50±0,6	36,0±3,0	0,26±0,02	4,63±0,25
B-1	4,95±1,66	14,50±2,15	53,0±5,5	0,33±0,08	4,51±0,17
B-2	8,66±0,63	27,59±0,52	37,0±5,0	0,31±0,02	5,00±0,20
B-3	3,49±0,56	10,57±0,69	61,7±5,0	0,32±0,03	4,51±0,50
B-4	6,53±0,78	28,75±3,71	23,0±2,5	0,24±0,05	4,56±0,32
B-5	6,55±0,26	17,25±0,79	39,3±3,5	0,38±0,03	5,34±0,30
B-6	4,39±1,63	16,50±5,86	32,7±3,2	0,26±0,01	4,90±0,28
B-7	3,81±1,07	19,08±6,07	47,7±3,0	0,20±0,02	4,15±0,34
B-8	4,80±0,47	13,70±1,50	58,7±4,0	0,32±0,03	4,42±0,29
B-9	1,81±0,16	13,76±1,01	13,0±1,0	0,13±0,01	4,50±0,37
B-10	5,51±0,75	21,79±1,16	35,3±3,5	0,25±0,20	4,73±0,35
B-11	6,28±0,35	22,72±2,42	34,3±2,2	0,27±0,03	5,18±0,20
B-12	5,44±0,11	25,80±3,35	15,0±3,0	0,17±0,01	5,65±0,25
B-13	4,77±0,09	20,16±0,40	30,7±3,0	0,27±0,03	4,76±0,34
B-14	6,51±0,20	22,06±2,15	37,3±4,0	0,30±0,02	5,20±0,24
B-15	4,97±0,13	28,19±3,36	20,0±3,2	0,18±0,02	5,58±0,28
B-16	10,55±0,35	26,72±0,86	53,7±2,4	0,39±0,01	5,17±0,20
B-17	7,25±1,30	20,02±2,02	30,7±1,0	0,36±0,03	5,17±0,22
B-18	9,00±1,38	22,10±1,57	65,7±2,0	0,40±0,03	4,80±0,26
B-19	6,88±0,37	21,78±3,18	27,7±5,0	0,33±0,04	4,53±0,16
B-20	8,97±0,18	28,40±2,75	45,3±2,0	0,31±0,05	5,44±0,40
B-21	7,12±0,83	21,21±0,98	57,0±6,0	0,28±0,06	5,85±0,23

рослин, інокульованих Tn5-мутантом B-12, надземна маса була більшою на 22 %, а АФА — меншою на 12,4 % порівняно з рослинами, бактеризованими штамом 646. Отримані нами результати узгоджуються зі спостереженнями інших дослідників за симбіотичною азотфіксацією люцерни [11].

Результати вивчення формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу сої з Tn5-мутантами *B. japonicum* наведено в табл. 1. На їх основі побудовано гістограми розподілу транспозонових мутантів за симбіотичними показниками. Згідно з аналізом гістограм, число мутантів *B. japonicum* з високою ефективністю (приріст надземної маси понад 20 %) становить 14,3 % загальної кількості досліджених мутантів (3 мутанти), із середньою (приріст 10—20 %) — 28,6 % (6 мутантів), із низькою (надземна маса рослин на рівні контрольних значень) або перевищує їх у межах 10 % — 23,8 % (5 мутантів), неефективних (показник, нижчий від рівня штаму 646) — 33,3 % (7 мутантів) порівняно із застосуванням вихідного штаму 646 (рис. 1). Отже, інокуляція сої новими

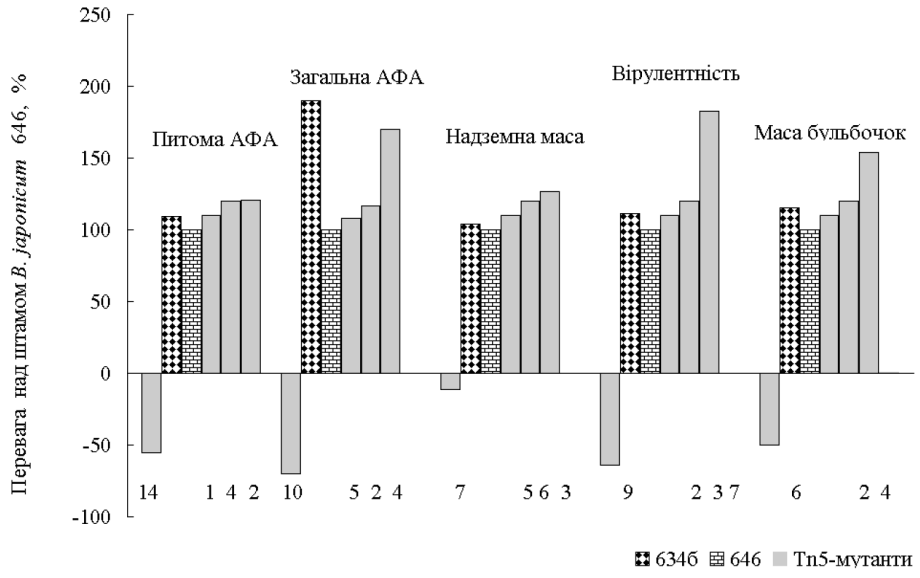

Рис. 1. Гістограма розподілу Tn5-мутантів *B. japonicum* за рівнем симбіотичних показників із сої сорту Мар'яна (досліджено 21 мутант)

Tn5-мутантами *B. japonicum* істотно збільшувала надземну масу не всіх дослідних рослин, що, вірогідно, обумовлено жорсткішим контролем цього показника генотипом рослини-хазяїна. Лише за умови високоефективного партнерства макро- і мікросимбіонтів та внаслідок посилення низки фізіолого-біохімічних процесів вегетативний ріст бобових рослин активізувався. У сої, інокульованої Tn5-мутантами, надземна маса рослин змінювалась від —10,4 до +26,3 %, а загальна АФА симбіотичних систем — у ширшому інтервалі — від —70,9 до +70,0 %.

Загальна азотфіксувальна активність може слугувати інтегральним показником, який характеризує функціонування симбіотичної системи, оскільки висока нітрогеназна активність спостерігається за наявності специфічного штаму ризобій, збалансованості C- і N-метаболізму в бульбочках і потреби рослини в азоті [18, 21]. Число мутантів *B. japonicum*, які забезпечили бульбочкам, утвореним за їх участю, високий рівень асиміляції N_2, становить 19,0 % загальної кількості досліджених мутантів (4 мутанти), середній — 9,5 % (2 мутанти), низький (на рівні контрольних) — 23,8 % (5 мутантів) і нижчий порівняно зі штамом 646 — 47,6 % (10 мутантів) (див. рис. 1). Отже, внаслідок транспозонового мутагенезу отримано мутанти штаму 646 *B. japonicum* із розширеним спектром варіювання інтенсивності азотфіксації. Здатність до асиміляції N_2 кореневими бульбочками сої змінювалась залежно від взятого для інокуляції насіння рослин Tn5-мутанта *B. japonicum*. На гістограмі (див. рис. 1) представлено також розподіл мутантів за показниками питома АФА, вірулентність, маса бульбочок.

У результаті скринінгу відібрано Tn5-мутанти В-2, В-16, В-18, В-20, В-21, які переважали вихідний штам 646 одночасно за кількома симбіотичними показниками більш як на 20 % (табл. 2). Селекціоновані Tn5-мутанти викликали активне утворення бульбочок на коренях сої, забезпечували інтенсивнішу асиміляцію N_2 бульбочками, поліпшували азотне живлення рослин, що сприяло стимуляції їх вегетативного росту

ТАБЛИЦЯ 2. Перспективні Tn5-мутанти штаму B. japonicum 646, відібрані у результаті первинного скринінгу за симбіотичними показниками на сої сорту Мар'яна

Варіант	Перевищення вихідного штаму *B. japonicum* 646 за показником, %				
	Азотфіксація	Нодуляція		Ефективність	
		кількість бульбочок, шт/рослину	маса бульбочок, г/рослину	надземна маса, г	маса кореня, г
B-2	39,5	10,27	19,2	8,0	21,2
B-16	70,0	49,2	50,0	11,7	6,5
B-18	44,9	82,5	54,0	3,5	19,5
B-20	44,4	25,8	19,2	17,5	6,8
B-21	14,7	58,3	26,9	26,4	16,6

більшою мірою, ніж застосування вихідного 646 і виробничого 634б штамів *B. japonicum* (див. табл. 2). Відібрано також Tn5-мутанти з істотно зниженими симбіотичними показниками порівняно з батьківським штамом 646 (АФА бульбочок, утворених мутантом B-9, була нижчою на 70 %, мутантами B-3, B-7 — на 40 %, див. табл. 1). Ці мутанти можна використовувати для вивчення особливостей формування й функціонування малоефективних симбіозів соя *Glycine max* (L.) — *B. japonicum*.

Відомо, що утворення бобово-ризобіального симбіозу є специфічною взаємодією мікро- й макросимбіонтів, яка визначається великим числом полігенів обох партнерів і тому потребує певної відповідності генотипів рослин і штамів бактерій [8]. У зв'язку з цим ми продовжили вивчення нодуляційної й азотфіксувальної активностей відібраних Tn5-мутантів B-2, B-16, B-18, B-20, B-21 *B. japonicum* у симбіозі з соєю сортів Аннушка, Васильківська, Мар'яна, Колбі в умовах дрібноділянкового польового досліду. Встановлено, що кількість симбіотичних бульбочок, які утворюються на коренях сої, істотно залежить від сорту рослини-хазяїна (рис. 2). Найбільшу вірулентність транспозонові мутанти виявили за бактеризації сої сорту Мар'яна, проте за масою ініційованих кореневих бульбочок (г/рослину) переважали мутанти B-16, B-20, B-21 на сої сорту Аннушка, B-20, B-21 — сорту Васильківська, B-2, B-16 — сорту Мар'яна, B-2, B-18 — сорту Колбі (див. рис. 2), а в процесі функціонування симбіотичної системи вони забезпечували відповідно й більшу інтенсивність фіксації N_2.

У результаті дослідження з'ясовано, що показник азотфіксації бульбочок коливався залежно від фази розвитку рослини-хазяїна і штаму-інокулянта навіть для одного й того самого сорту сої, тому ми обрали показник сумарної азотфіксувальної активності бульбочок у найактивніші фази перебігу асиміляційних процесів у сої: фази бутонізації та бутонізації—початку цвітіння. За цим показником у симбіозі з соєю сорту Аннушка всі 5 транспозонових мутантів перевищували вихідний штам 646 на 12,2—138,7 %, із соєю сорту Васильківська — 2 мутанти на 40,5—72,8, із соєю сорту Мар'яна — 3 мутанти на 121,6—124,7, із соєю сорту Колбі — 4 мутанти на 161,8—214,1 % (табл. 3). Tn5-мутанти B-20, B-21 виявились активнішими у симбіозі з соєю сортів Аннушка, Васильківська, мутанти B-18, B-2 — із сортами сої Мар'яна, Колбі, що підтверджено збільшенням АФА (сумарної за два відбори) бульбочок відповідно на 140,5—238,7 і 121,6—214,1 % порівняно з функціонуван-

ТАБЛИЦЯ 3. Сумарна азотфіксувальна активність (мкмоль C_2H_4/(рослину · год)) сої різних сортів у фази бутонізація, бутонізація–початок цвітіння за інокуляції Tn5-мутантами B. japonicum (дрібноділянковий польовий дослід)

Варіант	Сорт сої											
	Анушка			Васильківська			Мар'яна			Колбі		
	АФА	% до штаму		АФА	% до штаму		АФА	% до штаму		АФА	% до штаму	
		6346	646		6345	646		6346	646		6345	646
646	2,79	88,1	100	4,71	136,9	100	10,31	90,2	100	4,53	35,7	100
6346	3,13	100	112,2	3,44	100	74,0	11,43	100	110,9	12,68	100	279,9
B-2	5,19	165,8	186,0	3,43	99,7	72,8	12,86	112,5	124,7	7,73	60,9	170,6
B-16	3,55	113,4	127,2	3,50	101,7	74,3	9,77	84,4	94,7	7,33	57,8	161,8
B-18	6,80	217,2	143,7	3,24	94,1	68,8	12,54	109,7	121,6	9,70	76,4	214,1
B-20	5,90	188,5	211,5	8,14	236,6	172,8	6,23	54,5	60,4	7,60	59,9	167,7
B-21	6,66	212,8	238,7	6,62	192,4	140,5	7,10	61,1	68,8	1,51	11,9	33,3

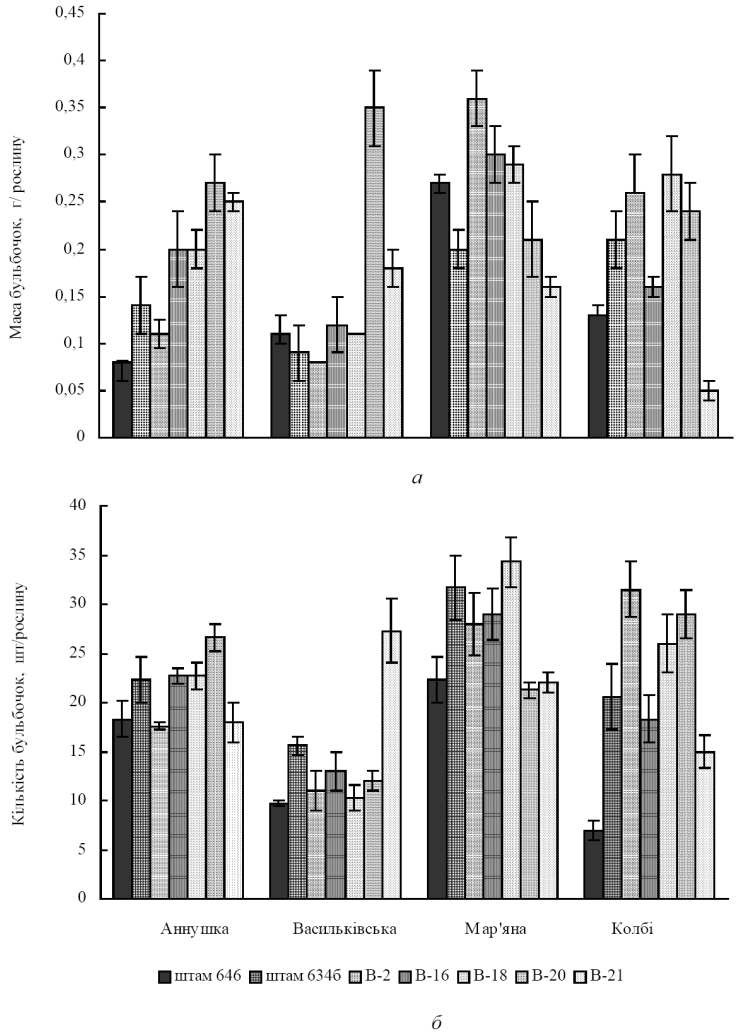

Рис. 2. Формування симбіотичного апарату в різних сортів за інокуляції Tn5-мутантів бульбочкових бактерій *B. japonicum* (42-га доба після появи сходів):

а — маса бульбочок; *б* — кількість бульбочок

ням бульбочок, утворених вихідним штамом 646 на цих сортах (див. табл. 3).

На підставі отриманих результатів зроблено висновок про доцільність подальшого вивчення транспозонових мутантів В-2, В-16, В-18, В-20, В-21 *B. japonicum* як можливих мікросимбіонтів із підвищеною комплементарністю до різних сортів сої. Оскільки зазначені Tn5-мутанти *B. japonicum* є генетично маркованими азотфіксувальними бактеріями (несуть у геномі маркер стійкості до канаміцину), вивчення ефективності їх застосування в умовах біоценозів може бути контрольованим, що є однією з переваг при дослідженні мутантних штамів бульбочкових бактерій.

1. *Воробей Н.А., Коць С.Я., Маліченко С.М., Якимчук Р.А.* Дослідження симбіотичних систем сої, утворених за участю транспозантів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и

биохимия культ. растений. — 2006. — **38**, № 5. — С. 418—426.
2. *Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М.* Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1964. — 388 с.
3. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 352 с.
4. *Князєв О.В.* Підвищення азотфіксуючого потенціалу сої координованою селекцією макро- і мікросимбіонтів: Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. — Київ, 1995. — 20 с.
5. *Маліченко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М.* Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — **39**, № 5. — С. 409—418.
6. *Мандровська Н.М., Кругова О.Д., Коць С.Я.* Ефективність симбіозу рослин гороху із транспозантами *R. leguminosarum* bv. *viciae* 236б // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2007. — Вип. 1 (10). — С. 65—70.
7. *Миллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 395 с.
8. *Проворов Н.А., Симаров Б.В.* Генетический полиморфизм бобовых культур по способности к симбиозу с клубеньковыми бактериями // Генетика. — 1992. — **28**, № 6. — С. 5—14.
9. *Проворов Н.А., Симаров Б.В.* Направления конструирования штаммов клубеньковых бактерий с повышенной симбиотической эффективностью // Молекулярные механизмы генетических процессов. — М., 1991. — С. 190—194.
10. *Сассон А.* Биотехнология: свершения и надежды / Пер. с англ; под ред., с предисл. и дополн. В.Г. Дебабова. — М.: Мир, 1987. — 411 с.
11. *Симаров Б.В., Ароштам А.А., Новикова Н.И. и др.* Генетические основы селекции клубеньковых бактерий / Под ред. Б.В. Симарова. — Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние, 1990. — 192 с.
12. *Тихонович И.А., Проворов Н.А.* Принципы селекции растений на взаимодействие с симбиотическими микроорганизмами // Вестник ВОГиС. — 2005. — **9**, № 3. — С. 295—305.
13. *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.
14. *Bellato C., Krishnan H.P., Cubo T. et al.* The soybean cultivar specificity gene *nolX* is present, expressed in *nod D*-dependent manner and of a symbiotic significance in cultivar non-specific strains of *Rhizobium* (*Sinorhizobium fredii*) // Microbiology. — 1997. — **143**. — P. 1381—1388.
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. — **42**, N 8. — P. 1185—1207.
16. *Marrogui S., Zorreguieta A., Santamari C. et al.* Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants // J. Bacteriol. — 2001. — **183**, N 3. — P. 854—864.
17. *Rengel Z.* Breeding for better symbiosis // Plant Soil. — 2002. — **245**, N 1. — P. 147—162.
18. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнка, А. Кондороши, П. Хукаса; рус. перевод под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. — СПб., 2002. — 567 с.
19. *Sambrook J., Frisch E.F., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. — N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
20. *Simon R., O'Connel M., Labes M., Puhler A.* Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulations of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria // Methods in Enzymology. — 1986. — **118**. — P. 640—659.
21. *Zhang X., Zhou J., Zhang Z. et al.* Cloning and sequencing of a 3.7 kb enhacing factor from *Rhisobium fredii* B52 // Nitrogen fixation: Fundamentals and Applications. — Dordrecht, 1995. — P. 426.

Отримано 04.10.2012

СЕЛЕКЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МАРКИРОВАННЫХ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ПО СИМБИОТИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ

Н.А. Воробей

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

В результате селекции Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum*, полученных с использованием вектора pSUP5051::Tn5mob, по признакам «вирулентность», «азотфиксация», «эффек-

тивность симбиоза» отобраны генетически маркированные ризобии В-2, В-16, В-18, В-20, В-21 с улучшенными свойствами. Tn5-мутанты В-20 и В-21 активнее ассимилировали N_2 в симбиозе с соей сортов Аннушка и Васильковская, а мутанты В-18 и В-2 — с сортами сои Марьяна и Колби. Сделан вывод о целесообразности дальнейшего изучения этих мутантов как возможных эффективных микросимбионтов с повышенной комплементарностью к разным сортам сои.

SELECTION OF THE GENETICALLY MARKED NODULE BACTERIA *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ON THE SYMBIOTIC PROPERTIES

N.A. Vorobey

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

As a result of screening Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum*, which were obtained using vector pSUP5051::Tn5mob on the characteristics of «virulence», «nitrogen fixation», «efficiency of symbiosis», genetically marked rhizobia B-2, B-16, B-18, B-20, B-21 with improved properties were selected. Tn5-mutants B-20 and B-21 assimilated N_2 more actively in symbiosis with soybean cultivars Anna and Vasilkovskaya, mutants B-18 and B-2 — with soybeans cultivars Mariana and Colby. The perspectivity of further studuing of these mutants as possible complementary microsymbionts of soybean with increased complementarity to different cultivars was discussed.

Key words: Bradyrhizobium japonicum, Tn5-mutants, transposon mutagenesis, soybean, nitrogen fixation, efficiency, symbiosis.