

УДК 633.34:631.847.211:575:577.21

## ФОРМУВАННЯ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМ СОЇ І ВИГНИ ЗІ ШТАМАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* РІЗНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ГРУП

Д.В. КРУТИЛО, О.В. НАДКЕРНИЧНА

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва  
Національної академії аграрних наук України  
14027 Чернігів, вул. Шевченка, 97  
e-mail: krutylov@gmail.com

Вивчено особливості взаємодії рослин сої і вигни з повільно- та інтенсивнорослими штамми *Bradyrhizobium japonicum* різних генетичних груп. Показано, що рослини сої здатні вступати в ефективні симбіотичні взаємовідносини з дослідженими штамми ризобій незалежно від швидкості їх росту та генетичної належності. Рослини вигни виявляють вибірковість щодо штамів бульбочкових бактерій сої. При взаємодії з інтенсивнорослими штамми *B. japonicum* групи USDA 123 вони утворюють неефективний симбіоз із низьким рівнем фіксації азоту, тоді як із повільнорослими штамми генетичних груп USDA 4, USDA 6, USDA 110 формують повноцінні азотфіксувальні системи. Встановлено, що ризобії сої з різною швидкістю росту мають ідентичні RFLP-профілі *nifH* гена. Формування активних (фенотип Nod<sup>+</sup>Fix<sup>+</sup>) і неактивних (фенотип Nod<sup>+</sup>Fix<sup>-</sup>) симбіотичних систем вигни з ризобіями не пов'язано зі структурою цього гена, а, ймовірно, визначається специфічністю взаємодії генотипів партнерів на ранніх етапах розвитку симбіозу.

**Ключові слова:** *Bradyrhizobium japonicum*, соя, вигна, симбіотична система, специфічність, RFLP-аналіз, *nifH* ген.

Останнім часом дедалі більшу увагу приділяють дослідженням мутуалістичних симбіозів бобових рослин (родина Fabaceae) із бульбочковими бактеріями (родина Rhizobiaceae). Необхідною умовою для створення надорганізованих систем є специфічність взаємодії макро- та мікросимбіонтів. Механізми, що лежать в основі специфічності, мають свої особливості, характерні для кожного виду бобових рослин. Причиною виникнення цих особливостей є необхідність взаємної адаптації партнерів симбіозу один до одного на тлі високої варіабельності генетичного матеріалу бульбочкових бактерій [5, 7].

На сьогодні відомо, що у симбіотичні взаємовідносини з культурною соєю (*Glycine max* (L.) Merr.) можуть вступати ризобії різних родів: *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) та *Mesorhizobium*. Вони представлені видами бактерій з різними швидкостями росту: повільнорослі *B. japonicum* [14], *B. elkanii* [16], *B. liaoningense* [21], *B. yuanmingense* [22] та інтенсивнорослі *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *fredii*, *S. xinjiangensis* [19], *M. tianshanense* [12]. Типовими мікросимбіонтами сої в ґрунтах України є повільнорослі бульбочкові бактерії виду *B. japonicum* [8].

Серед мікросимбіонтів вигни китайської (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ідентифіковані ризобії більш як 20 видів (*Bradyrhizobium* sp., *B. japonicum*,

*B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. pachyrhizi*, *B. yuanmingense*, *Ensifer fredii* sv. *aegeanense*, *Rhizobium tropici*, *R. pusense*, *Mesorhizobium* sp. та ін.) [10, 20]. На відміну від більшості бобових корені вигни можуть одночасно інфікувати бульбочкові бактерії кількох родів, зокрема *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* [18, 20], тобто взаємовідносини між рослинами вигни і ризобіями не вкладаються у схему їх поділу за здатністю інфікувати ті чи інші бобові рослини. Це особливо цікаво з погляду дослідження специфічності взаємодії партнерів по симбіозу. Потенційними мікросимбіонтами вигни у ґрунтах України можуть бути ризобії різних родів, у тому числі бульбочкові бактерії сої.

У попередні роки з ґрунтів України ми вилучили штами бульбочкових бактерій сої, які різняться за швидкістю росту, фізіологічними та генетичними властивостями. У результаті проведених генетичних досліджень встановлено, що повільнорослі штами ризобій сої належать до кількох генетичних груп: USDA 4, USDA 6, USDA 110. Усі інтенсивнорослі штами *B. japonicum* споріднені зі штамми групи USDA 123, які належать до відомої, за літературними даними, серогрупи 123 [15].

Зважаючи на те що повільно- та інтенсивнорослі штами бульбочкових бактерій сої різняться за багатьма фенотипними й генотипними ознаками, метою нашої роботи було дослідження особливостей їхніх симбіотичних взаємовідносин із бобовими рослинами соєю та вигною.

## Методика

Об'єктами досліджень були рослини сої культурної (*Glycine max* (L.) Merr.) та вигни китайської (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), штами *B. japonicum* різних генетичних груп із повільним (*B. japonicum* 46, CH2 (група USDA 6), *B. japonicum* KC2 (група USDA 4)) та інтенсивним (*B. japonicum* KB1, KB1-1, KB11, KC1-9, KC20, KC91, CK7 (група USDA 123)) ростом, вилучені з ґрунтів різних регіонів України, а також типовий штам *B. japonicum* VKM B-1967 (група USDA 6) і стандартний штам *B. japonicum* 6346 (група USDA 110).

Веgetаційні досліді проводили в посудинах місткістю 2,5 л. Рослини сої сорту Устя та вигни китайської (насіння надали відповідно ННЦ «Інститут землеробства» та Національний центр генетичних ресурсів рослин України) вирощували у вегетаційному будиночку на безазотистому субстраті (вермикуліт), зволоженому 0,2 %-м розчином  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Перед посівом насіння обробляли культуральною рідиною повільно- та інтенсивнорослих штамів бульбочкових бактерій сої (титр  $2 \cdot 10^9$  кл/мл). Інокуляційне навантаження становило 200—300 тис. клітин на 1 насінину. Повторність дослідів — шестиразова.

Активність та ефективність бобово-ризобіального симбіозу оцінювали у фазу цвітіння за такими показниками: маса сухої речовини надземної частини рослин, кількість і маса бульбочок, активність симбіотичної азотфіксації. Вміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин визначали спектрофотометричним методом [3].

У фазу цвітіння з коренів сої та вигни відбирали бульбочки, відмивали їх від решток вермикуліту. Анатоомо-морфологічну будову бульбочок вивчали на їхніх поздовжніх зрізах під світловим мікроскопом МБС-9 за збільшення  $\times 64$ . Ультраструктуру бульбочок досліджували за допомогою електронної мікроскопії ультратонких зрізів із їх контрастуванням цитратом свинцю за Рейнольдсом [2, 9]. Бульбочки нарізали шарами завтовшки не більш як 1 мм і фіксували їх 5 %-м розчином

глутаральдегіду, який виготовляли на фосфатному буфері (рН 7,4), та OsO<sub>4</sub>. Зневоднювали фіксований матеріал 20, 40, 50, 70, 80, 96 і 100 %-ми розчинами етанолу, ацетоном і ураніацетатом. Зразки бульбочок заливали сумішшю смол Епон-812, DDSA, MNA, ДМР-30. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікротомі LKB, препарати переглядали за допомогою електронного мікроскопа BS-540 «Tesla» (Чехія) за інструментального збільшення ×2000 та ×5000.

Активність симбіотичної азотфіксації вимірювали ацетиленовим методом [13] на газовому хроматографі «Chrom-4».

При вивченні гена нітрогенази (*nifH*) штамів ризобій сої ДНК виділяли із семидобових культур за допомогою набору «ДНК-сорб Б». Для ампліфікації *nifH* гена застосовували універсальні праймери *nifHF*: 5'-TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-3' та *nifHI*: 5'-AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA-3' [17]. RFLP-аналіз (restriction fragments length polymorphism) ПЛР-продуктів проводили з використанням ендонуклеаз рестрикції *MspI*, *HaeIII* та *NdeII* («Fermentas», Латвія) згідно з інструкцією виробника. Оброблену рестриктазами ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в 2,5 %-му агарозному гелі. Розмір отриманих фрагментів ДНК визначали за комп'ютерною програмою Total Lab. v. 2.01.

Отримані дані оброблено статистично за загальноприйнятими методами [4] із застосуванням комп'ютерної програми Statistica 7.0.

### Результати та обговорення

За умов вегетаційних дослідів вивчали особливості формування та функціонування симбіозу сої культурної (*Glycine max* (L.) Merr.) та вигни китайської (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) з повільно- та інтенсивнорослими штамми бульбочкових бактерій сої різних генетичних груп.

Оскільки досліди проводили на стерильному субстраті — вермикуліті, на коренях неінокульованих рослин обох культур бульбочки не утворювались (табл. 1, 2). Досліджувані штами ризобій активно інфікували рослини сої і вигни й утворювали значну кількість бульбочок: на 1 рослині сої — 48—63, на 1 рослині вигни — 78—98.

ТАБЛИЦЯ 1. Ефективність симбіозу сої (*Glycine max* (L.) Merr.) зі штамми *V. japonicum* із різними швидкостями росту (вегетаційний дослід)

Варіант досліді	Кількість бульбочок, шт/рослину	Маса бульбочок, г/рослину	Активність симбіотичної азотфіксації, мкг N/рослину за 1 год	Маса сухої речовини надземної частини рослин, г/рослину
Без інокуляції (контроль)	0	0	0	0,99
Інокуляція <i>V. japonicum</i> 6346*	47,50	0,36	15,89	1,25
Інокуляція <i>V. japonicum</i> 46*	56,92	0,41	30,46	1,34
Інокуляція <i>V. japonicum</i> KB1-1	55,00	0,36	20,31	1,29
Інокуляція <i>V. japonicum</i> KC1-9	62,50	0,40	16,11	1,26
НІР <sub>05</sub>	4,11	0,02	2,99	0,06

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: \* — повільнорослі штами бульбочкових бактерій сої.

ТАБЛИЦЯ 2. Ефективність симбіозу вигни (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) зі штамми *V. jaronicum* із різними швидкостями росту (вегетаційні досліді)

Варіант досліді	Кількість бульбочок, од/рослину	Маса бульбочок, г/рослину	Активність симбіотичної азотфіксації, мкг N/рослину за 1 год	Маса сухої речовини надземної частини рослин, г/рослину
I дослід				
Без інокуляції (контроль)	0	0	0	0,49
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> 6346*	86,25	0,91	12,79	1,26
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> 46*	98,08	0,94	21,85	1,44
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> KB1-1	78,17	0,87	3,85	0,97
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> KC1-9	85,17	0,82	4,17	0,74
НІР <sub>05</sub>	5,32	0,04	2,20	0,05
II дослід				
Без інокуляції (контроль)	0	0	0	0,56
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> 46*	87,00	0,84	15,53	1,32
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> CH2*	78,50	0,82	12,96	1,18
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> KC2*	90,33	0,89	16,73	1,27
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> KB1	66,22	0,76	3,35	0,58
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> KB1-1	74,00	0,77	3,19	0,61
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> KB11	70,06	0,75	3,59	0,66
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> KC20	65,72	0,73	3,13	0,65
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> KC91	71,78	0,78	2,73	0,65
Інокуляція <i>V. jaronicum</i> СК7	72,06	0,76	3,44	0,69
НІР <sub>05</sub>	4,94	0,04	1,26	0,07

Ми не виявили істотних відмінностей у реакції рослин сої на інфікування повільно- (*V. jaronicum* 6346, 46) та інтенсивнорослими штамми (*V. jaronicum* KB1-1, KC1-9). Активність симбіотичної азотфіксації змінювалась від 15,89 до 30,46 мкг N/рослину за 1 год і залежала від індивідуальних особливостей штамів, а не від належності до різних груп за швидкістю росту.

На відміну від сої рослини вигни по-різному реагували на інфікування повільно- й інтенсивнорослими штамми *V. jaronicum*. Так, у двох вегетаційних дослідіх інтенсивнорослі ризобії групи USDA 123 (*V. jaronicum* KB1, KB1-1, KB11, KC1-9, KC20, KC91, СК7) формували на коренях вигни численні бульбочки (66—74 шт/рослину), проте їх кількість була вірогідно меншою, ніж за використання повільнорослих штамів

різних генетичних груп: USDA 4, USDA 6, USDA 110 (*B. japonicum* КС2, 46, СН2, 6346) (див. табл. 2). Меншою була також маса кореневих бульбочок: на 4,4—12,8 % (I дослід) та на 5,1—21,9 % (II дослід) порівняно з повільнорослими штамми.

Найістотніші відмінності спостерігали за показником нітрогеназної активності бульбочок. У варіантах з інокуляцією насіння вигни інтенсивнорослими штамми, незважаючи на формування значної кількості бульбочок, активність симбіотичної азотфіксації була у 3,1—6,1 раза нижчою (I і II дослід), ніж у варіантах з інокуляцією повільнорослими бульбочковими бактеріями. На нашу думку, утворення інтенсивнорослими штамми неактивних бульбочок на коренях вигни може свідчити про низький ступінь комплементарності макро- та мікросимбіонтів, що негативно позначається на азотфіксувальному потенціалі симбіотичних систем.

Добре відомо, що між фіксацією молекулярного азоту та фотосинтезом існує тісний зв'язок, а зміни в пігментному комплексі (вміст пігментів та їх співвідношення) є одним із важливих показників фізіологічного стану рослин [1]. Результат взаємодії вигни китайської зі штамми *B. japonicum* було видно неозброєним оком: рослини, інфіковані інтенсивнорослими бульбочковими бактеріями, мали світло-жовтий колір, а за інокуляції повільнорослими ризобіями — темно-зелений (рис. 1).

Про розвиток активного симбіозу вигни з повільнорослими штамми *B. japonicum* 6346, 46, СН2, КС2 свідчить підвищений вміст хлорофілів *a* і *b* у листках рослин порівняно з варіантом без інокуляції (рис. 2). Водночас сума хлорофілів у листках вигни за обробки інтенсивнорослими штамми *B. japonicum* КВ1, КВ1-1, КВ11, КС1-9, КС20, КС91, СК7 хоча й була дещо вищою, ніж у контролі, проте у 2,2—5,4 раза нижчою порівняно з інокуляцією повільнорослими штамми.

Як інтегральний показник активності симбіозу досліджуваних бобових культур із ризобіями визначали масу сухої речовини надземної частини рослин. Ліпшими за цим показником виявились повільнорослі штамми *B. japonicum*, які забезпечували приріст надземної маси порівняно з контролем у 1,3—1,4 раза — у сої (див. табл. 1) та у 2,1—2,9 раза — у вигни (див. табл. 2). Інтенсивнорослі штамми *B. japonicum* сприяли збільшенню надземної маси рослин сої на рівні повільнорослих бульбоч-



Рис. 1. Вплив інокуляції інтенсивнорослим штамом *B. japonicum* KB1-1 (а) та повільнорослим *B. japonicum* 46 (б) на забарвлення листків рослин вигни

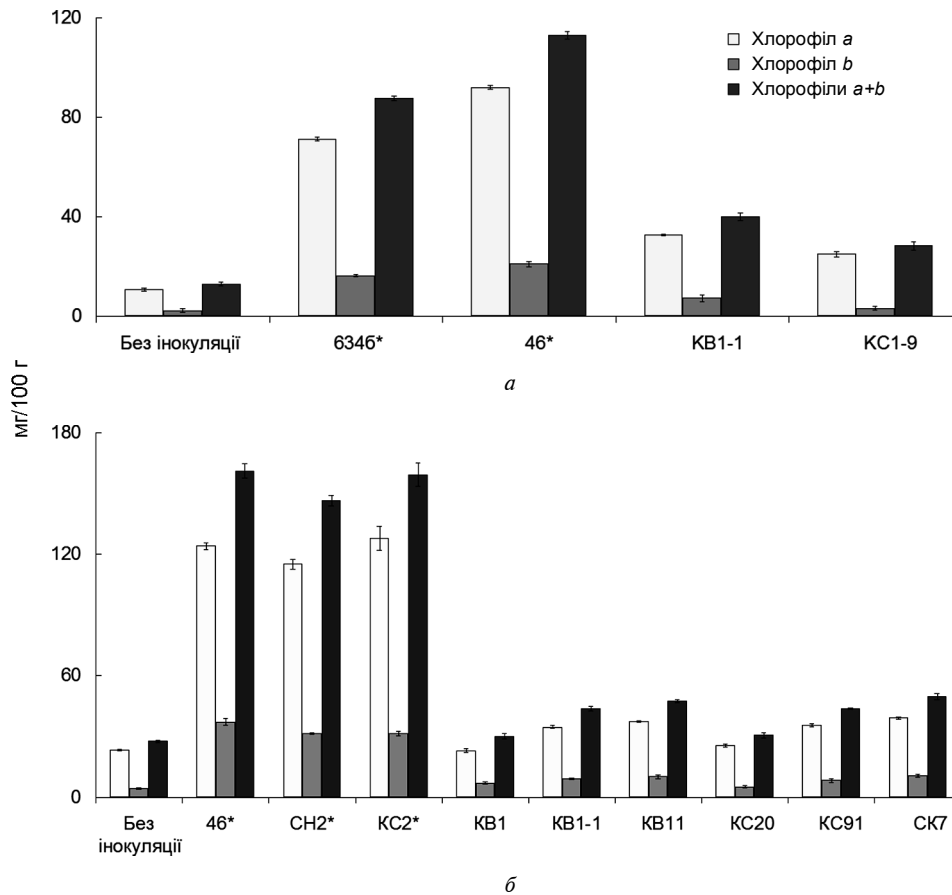


Рис. 2. Вплив інокуляції бульбочковими бактеріями сої на вміст хлорофілів у листках вигни у I (а) та II (б) вегетаційних досліджах (\* — повільнорослі штами бульбочкових бактерій сої)

кових бактерій. Проте симбіоз вигни з цими штамми виявився не-ефективним — маса сухої речовини надземної частини рослин була у 1,3—2,3 раза нижчою, ніж за використання повільнорослих штамів. Отримані дані можуть свідчити про низьку специфічність інтенсивнорослих бульбочкових бактерій групи USDA 123 до рослин вигни.

З урахуванням відмінностей у формуванні симбіозу між рослинами сої та вигни і ризобіями різних генетичних груп важливо порівняти анатомо-морфологічну будову бульбочок цих культур. Згідно з результатами досліджень, кореневі бульбочки сої та вигни мають подібну сферичну форму і належать до детермінованого типу. В таких бульбочках меристема функціонує протягом обмеженого часу, а після її зникнення ріст бульбочок та оновлення азотфіксувальної тканини припиняються [11].

За допомогою світлового мікроскопа на поздовжніх зрізах активних червоних бульбочок сої виявлено чіткі зони диференціації тканин на три шари: бульбочкова кора, яка виконує захисну функцію і містить неінфіковані паренхімні клітини; бульбочкова меристема, яка також є зоною незаражених клітин, що інтенсивно діляться; бактероїдна зона, яка складається з клітин, інфікованих бактеріями (рис. 3). Результати електронно-мікроскопічних досліджень бульбочок сої, утворених як повільно-,

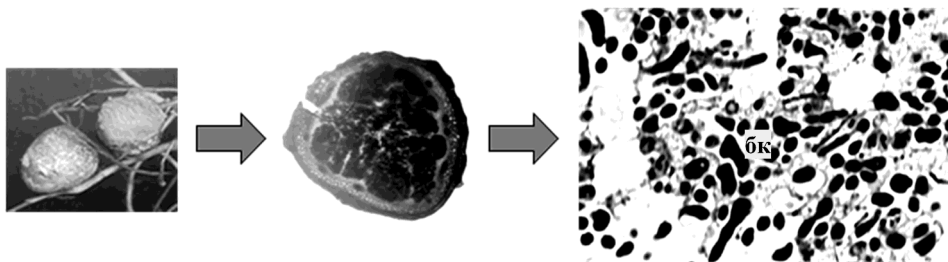


Рис. 3. Кореневі бульбочки сої, утворені штамом *B. japonicum* 46. Інструментальне збільшення при електронно-мікроскопічних дослідженнях  $\times 5000$  (бк — бактероїди)

так і інтенсивнорослими штамми, підтвердили, що їх азотфіксувальна тканина містить добре розвинені бактероїди *B. japonicum*.

На коренях рослин вигни виявлено три види бульбочок, які різнилися за кольором на зрізі: червоні бульбочки, в яких наявний леггемоглобін; білі бульбочки (основна кількість), в яких цей хромопротеїд практично відсутній; зелені бульбочки, в яких, ймовірно, леггемоглобін переходив у неактивну форму — холеглобін.

Анатомо-морфологічна будова червоних бульбочок вигни, утворених повільнорослими штамми *B. japonicum*, типова для бульбочок детермінованого типу з центральним розміщенням добре розвинутої азотфіксувальної тканини (рис. 4, А). На отриманих мікрофотографіях бактероїди довгі, тонкі, нерозгалужені.

За інокуляції вигни інтенсивнорослими штамми *B. japonicum* групи USDA 123 на коренях рослин утворювались переважно білі бульбочки (див. рис. 4, Б). За допомогою світлового мікроскопа виявлено, що в таких бульбочках практично відсутня зона азотфіксації. Під електронним

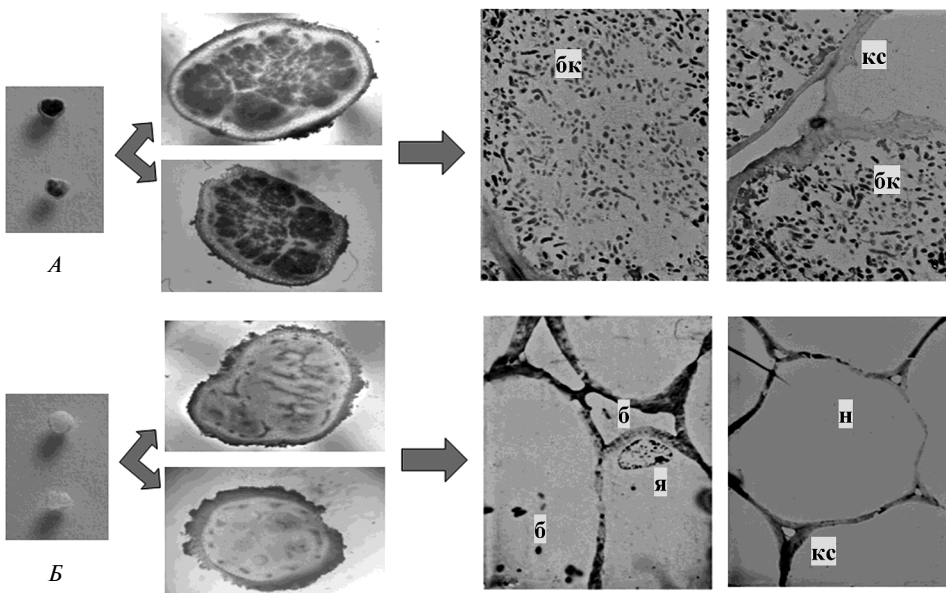


Рис. 4. Кореневі бульбочки вигни, утворені повільнорослим штамом *B. japonicum* 46 (А) та інтенсивнорослим штамом *B. japonicum* KB11 (Б). Інструментальне збільшення при електронно-мікроскопічних дослідженнях  $\times 2000$  (бк — бактероїди; б — бульбочкові бактерії; н — зона незаражених клітин; кс — клітинна стінка; я — ядро)

мікроскопом спостерігали великі рослинні клітини без мікроорганізмів або з поодинокими недиференційованими у бактероїди клітинами бульбочкових бактерій. Ризобії виявлено також у міжклітинному просторі.

На нашу думку, низька ефективність симбіозу вигни з інтенсивнорослими бульбочковими бактеріями сої групи USDA 123 зумовлена формуванням на коренях рослин білих неактивних бульбочок, які є результатом неспецифічної взаємодії макро- та мікросимбіонтів. З літератури відомо, що за неефективного симбіозу з боку рослини-хазяїна виявляються різні захисні реакції, які регулюють кількість бульбочок, їх морфогенез та функціонування [11]. За використання інтенсивнорослих штамів *B. japonicum* відбувалось активне інфікування коренів вигни й утворювалась значна кількість бульбочок, але на наступних стадіях онтогенезу, ймовірно внаслідок змін у програмі їх розвитку, диференціація тканин блокувалась і бульбочкові бактерії не перетворювались на бактероїди. У результаті мутуалістичні відносини між рослинами вигни та ризобіями сої ставали паразитичними.

Як відомо, процес формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу та його цілісність контролюються багатьма рослинними і бактеріальними генами. За утворення ефективного азотфіксуючого симбіозу відповідальними є симбіотичні гени бульбочкових бактерій, включаючи *nif* гени, які кодують синтез і регуляцію ферменту нітрогенази [6]. Врахувавши виявлені відмінності у симбіотичних взаємовідносинах між рослинами вигни та сої і бульбочковими бактеріями *B. japonicum*, ми дослідили структурний ген нітрогенази *nifH*, який кодує її малу субодиницю, у 5 інтенсивнорослих і 5 повільнорослих штамів, а також у типового штаму *B. japonicum* VKM В-1967 (USDA 6<sup>T</sup>).

Із застосуванням універсальних праймерів для гена нітрогенази отримано продукти ампліфікації розміром ~800 пн, які порізно розщеплювали рестриктазами *MspI*, *HaeIII* і *NdeII* (рис. 5).

У результаті незалежного розщеплення ампліфікатів *nifH* гена трьома рестриктазами (RFLP-аналіз) утворювалось 4–5 фрагментів ДНК. Порівнянням отриманих рестрикційних патернів встановлено, що за використання кожної рестриктази формувався свій унікальний набір фрагментів ДНК, однаковий для всіх досліджуваних штамів бульбочкових бактерій. За розщеплення гена *nifH* рестриктазою *MspI* отримано 4 фрагменти розміром 615, 280, 110 і 10 пн, за використання рестриктази *HaeIII* також формувалось 4 фрагменти — 340, 250, 100 і 25 пн. Найбільша кількість фрагментів невеликого розміру утворилась за рестрикції гена *nifH* рестриктазою *NdeII* — 235, 180, 115, 70 і 30 пн. Ідентичність наборів рестрикційних фрагментів гена *nifH* у штамів ризобій з різною швидкістю росту свідчить про їхню подібність за цим генетичним маркером.

Незважаючи на фенотипні й генотипні відмінності у штамів ризобій сої з різною швидкістю росту [15], за RFLP-профілями гена *nifH* вони виявились однорідними (табл. 3). Формування активних (фенотип  $\text{Nod}^+\text{Fix}^+$ ) і неактивних (фенотип  $\text{Nod}^+\text{Fix}^-$ ) симбіотичних систем вигни з ризобіями не пов'язане із структурою цього гена, а, ймовірно, визначається специфічністю взаємодії генотипів партнерів на ранніх етапах розвитку симбіозу.

Отже, в результаті аналізу взаємодії сої та вигни з бульбочковими бактеріями встановлено, що штам *B. japonicum* з різною швидкістю росту різняться за спектром специфічності до рослини-хазяїна. Ефективність досліджених бобово-ризобіальних систем визначається генотипами



ФОРМИРОВАНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОИ И ВИГНЫ

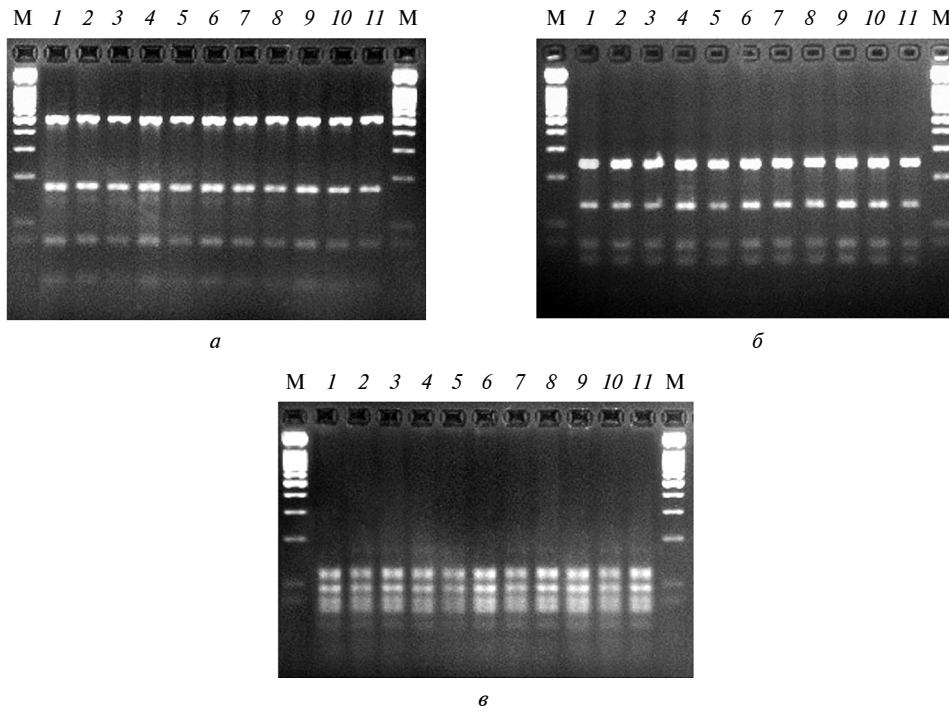


Рис. 5. Электрофоретичний розподіл фрагментів *nifH* гена штамів ризобій сої за обробки рестриктазами *MspI* (а), *HaeIII* (б), *NdeII* (в):

М — маркер молекулярної маси; 1–5 — інтенсивнорослі штамми ризобій сої; б — типовий штам *V. jaronicum* VKM В-1967 (USDA 6<sup>Т</sup>); 7–11 — повільнорослі штамми ризобій сої

обох партнерів симбіозу. Рослини сої здатні вступати в ефективні симбіотичні взаємовідносини як із повільнорослими, так і з інтенсивнорослими штамми ризобій сої. Рослини вигни виявляють вибірковість щодо штамів *V. jaronicum*. За взаємодії з інтенсивнорослими штамми групи

ТАБЛИЦЯ 3. Характеристика бульбочкових бактерій сої з різною швидкістю росту

Штам бульбочкових бактерій	Характер росту на бобовому середовищі	Рестрикційні <i>nifH</i> типи за використання рестриктаз			Симбіотичні фенотипи	
		<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>NdeII</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
<i>V. jaronicum</i> 634,*	Повільний	MI	HI	NI	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>
<i>V. jaronicum</i> 46*	“	MI	HI	NI	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>
<i>V. jaronicum</i> KC2*	“	MI	HI	NI	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>
<i>V. jaronicum</i> KB1-1	Інтенсивний	MI	HI	NI	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>-</sup>
<i>V. jaronicum</i> KC1-9	“	MI	HI	NI	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>-</sup>
<i>V. jaronicum</i> KC20	“	MI	HI	NI	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>-</sup>

П р и м і т к а. Nod<sup>+</sup>Fix<sup>+</sup> — утворення азотфіксувальних бульбочок; Nod<sup>+</sup>Fix<sup>-</sup> — утворення бульбочок, які не фіксують азот.

USDA 123 вони утворюють неефективний симбіоз із низьким рівнем фіксації азоту, тоді як із повільнорослими штамми генетичних груп USDA 4, USDA 6, USDA 110 формують повноцінні азотфіксувальні системи.

Автори висловлюють подяку старшому науковому співробітнику лабораторії ґрунтової мікробіології ІСМАВ НААН України канд. с-г наук О.В. Пирогу та провідному інженеру лабораторії вірусології В.М. Стрекалову за допомогу в проведенні електронно-мікроскопічних досліджень.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Веселовська Л.І., Коць С.Я. Вплив різних способів застосування лектину на симбіотичні системи соя—*Bradyrhizobium japonicum*, сформовані в умовах оптимального та недостатнього водозабезпечення. *Физиология растений и генетика*. 2014. **46**, № 5. С. 437—448.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. 485 с.
3. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наук. думка, 1973. 567 с.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 352 с.
5. Жуков В.А., Рычагова Т.С., Штарк О.Ю., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями. *Экол. генетика*. 2008. **7**, № 4. С. 12—19.
6. Иванова Е.С., Баймиев Ан.Х., Ибрагимов Р.И., Баймиев Ал.Х. Симбиотические гены клубеньковых бактерий и влияние их горизонтального переноса на видовой состав микросимбионтов бобовых растений. *Вестн. Башкир. ун-та*. 2011. **16**, № 4. С. 1210—1213.
7. 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-ризобийный симбиоз. Киев: Логос, 2011. Т. 2. 523 с.
8. Патица В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В., Шерстобоева О.В., Мельничук Т.М., Калініченко А.В., Гриник І.В. Біологічний азот. К.: Світ, 2003. 424 с.
9. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с.
10. Фотев Ю.В., Сидорова К.К., Новикова Т.И., Белоусова В.П. Изучение нодуляции и азотфиксации у двух сортов вигны [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] при инокуляции разными штаммами ризобий (*Bradyrhizobium* sp.). *Вавиловский журн. генетики и селекции*. 2016. **20**, № 3. С. 348—354.
11. Цыганова А.В., Китаева А.Б., Бревин Н.Дж., Цыганов В.Е. Клеточные механизмы развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. *С.-х. биология*. 2011. № 3. С. 34—41.
12. Chen W.X., Wang E.T., Li Y.B., Chen X.Q., Li Y. Characterization of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. moderately and slowly growing nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995. **45**. P. 153—159.
13. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 1968. **43**, N 8. P. 1185—1207.
14. Jordan D. Notes: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982. **32**. P. 136—139.
15. Krutylo D.V., Zotov V.S. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine. *Russian J. Genetics: Applied Research*. 2015. **5**, N 2. P. 102—109.
16. Kuykendall L., Saxena B., Devine T., Udell S. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 1992. **38**. P. 501—505.
17. Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger, N. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*. 2001. **147**. P. 981—993.
18. Мпеперекі С., Wollum A.G., Makonese F. Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soil. *Plant Soil*. 1996. **186**. P. 167—171.
19. Peng G.X., Tan Z.Y., Wang E.T., Reinhold-Hurek B., Chen W.F., Chen, W.X. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang Region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. **52**. P. 457—462.
20. Tampakaki A.P., Fotiadis C.T., Ntatsi G., Savvas D. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. *Syst. Appl. Microbiol.* 2017. **40**, N 3. P. 179—189.

21. Xu L.M., Ge C., Cui Z., Li J., Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. Isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995. **45**. P. 706–711.
22. Yao Z.Y., Kan F.L., Wang E.T., Wei G.H., Chen W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmin-gense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. **52**. P. 2219–2230.

Отримано 12.01.2018

REFERENCES

1. Veselovska, L.I. & Kots, S.Ya. (2014). The influence of different ways of lectin application on the symbiotic systems soybean - *Bradyrhizobium japonicum*, formed under optimal and insufficient water supply conditions. *Fisiol. rast. genet.*, 46(5), pp. 437-448 [in Ukrainian].
2. Gaier, G. (1974). *Electronic histochemistry*. Moscow: Mir [in Russian].
3. Grodzinsky, A.M. & Grodzinsky, D.M. (1973). *Brief guide to plant physiology*. Kiev: Naukova Dumka [in Russian].
4. Dospikhov, B.A. (1985). *Field Experience Method*. Moscow: Agropromizdat [in Russian].
5. Zhukov, V.A., Rychagova, T.S., Shtark, O.Y., Borisov, A.Y. & Tikhonovich, I.A. (2008). The genetic control of specificity of interactions between legume plants and nodule bacteria. *Ecological genetics*, 7(4), pp. 12-19 [in Russian]. doi: <https://doi.org/10.17816/ecogen6412-19>
6. Ivanova, E.S., Baimiev, An.Kh., Ibragimov, R.I. & Baimiev, Al.Kh. (2011). Symbiotic genes of nodule bacteria and the effect of their horizontal transfer on the species composition of microsymbionts of leguminous plants. *Bashkir University Bulletin*, 16(4), pp. 1210-1213 [in Russian].
7. Kots, S.Ya., Morgun, V.V., Patyka, V.F., Malichenko, S.M., Mamenko, P.M., Kiriziy, D.A., Mykhalkiv, L.M., Beregoenko, S.K. & Melnykova, N.M. (2011). *Biological nitrogen fixation: legume-rhizobial symbiosis*. (Vol. 2). Kyiv: Logos [in Russian].
8. Patyka, V.F., Kots, S.Ya., Volkohon, V.V., Shestobayeva, O.V., Mel'nychuk, T.M., Kalinichenko, A.V. & Hrynyk, I.V. (2003). *Biological nitrogen*. Kyiv: Svit [in Ukrainian].
9. Weekly, B. (1975). *Electron microscopy for beginners*. Moscow: Mir [in Russian].
10. Fotev, Yu.V., Sidorova, K.K., Novikova, T.I. & Belousova, V.P. (2016). Study of nodulation and nitrogen fixation in two cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivars inoculated with different strains of *Bradyrhizobium* sp. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 20(3), pp. 348-354 [in Russian]. doi: <https://doi.org/10.18699/VJ16.099>
11. Tsyganova, A.V., Kitaeva, A.B., Brewin, N.J. & Tsyganov, V.E. (2011). Cellular mechanisms of nodule development in legume plants. *Agricultural Biology*, 3, pp. 34-41 [in Russian].
12. Chen, W.X., Wang, E.T., Li, Y.B., Chen, X.Q. & Li, Y. (1995). Characterization of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. moderately and slowly growing nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, pp. 153-159. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-153>
13. Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43(8), pp. 1185-1207. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
14. Jordan, D. (1982). Notes: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32, pp. 136-139. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-32-1-136>
15. Krutylo, D.V. & Zotov, V.S. (2015). Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 5(2), pp. 102-109. doi: <https://doi.org/10.1134/S2079059715020057>
16. Kuykendall, L., Saxena, B., Devine, T. & Udell, S. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, pp. 501-505. doi: <https://doi.org/10.1139/m92-082>
17. Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147, pp. 981-993. doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>
18. Мпепереки, С., Wollum, A.G. & Makonese, F. (1996). Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soil. *Plant Soil*, 186, pp. 167-171. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00035071>
19. Peng, G.X., Tan, Z.Y., Wang, E.T., Reinhold-Hurek, B., Chen, W.F. & Chen, W.X. (2002). Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang Region as *Sinorhizobium xinjian-*

- gense and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, pp. 457-462. doi: [https://doi: 10.1099/ijs.0.01921-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.01921-0)
20. Tampakaki, A.P., Fotiadis, C.T., Ntatsi, G. & Savvas, D. (2017). Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(3), pp. 179-189. doi: [https://doi: 10.1016/j.syapm.2017.01.001](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.01.001)
21. Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J. & Fan, H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, pp. 706-711. doi: [https://doi: 10.1099/00207713-45-4-706](https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-706)
22. Yao, Z.Y., Kan, F.L., Wang, E.T., Wei, G.H. & Chen, W.X. (2002). Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, pp. 2219-2230. doi: [https://doi: 10.1099/ijs.0.01408-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.01408-0)

Received 12.01.2018

ФОРМИРОВАНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОИ И ВИГНЫ СО  
ШТАММАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* РАЗНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ГРУПП

Д.В. Крутило, Е.В. Надкерничная

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства Национальной академии аграрных наук Украины, Чернигов

Изучены особенности взаимодействия растений сои и вигны с медленно- и интенсивно-растущими штаммами *Bradyrhizobium japonicum* различных генетических групп. Показано, что растения сои способны вступать в эффективные симбиотические взаимоотношения со всеми исследованными штаммами ризобий независимо от скорости их роста и генетической принадлежности. Растения вигны проявляют избирательность в отношении штаммов клубеньковых бактерий сои. При взаимодействии с интенсивнорастущими штаммами *B. japonicum* группы USDA 123 они образуют неэффективный симбиоз с низким уровнем фиксации азота, тогда как с медленно-растущими штаммами генетических групп USDA 4, USDA 6, USDA 110 формируют полноценные азотфиксирующие системы. Установлено, что ризобии сои с разной скоростью роста имеют идентичные RFLP-профили *nifH* гена. Формирование активных (фенотип  $\text{Nod}^+\text{Fix}^+$ ) и неактивных (фенотип  $\text{Nod}^+\text{Fix}^-$ ) симбиотических систем вигны с ризобиями не связано со структурой этого гена, а, вероятно, определяется специфичностью взаимодействия генотипов партнеров на ранних этапах развития симбиоза.

SOYBEAN AND COWPEA SYMBIOTIC SYSTEMS FORMATION WITH  
*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS OF DIFFERENT GENETIC GROUPS

D.V. Krutylo, O.V. Nadkernychna

Institute of Agricultural Microbiology and Agro-industrial Manufacture, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
97 Shevchenko St., Chernihiv, 14027, Ukraine

The peculiarities of soybean and cowpea plants interaction with slow and intensively growing strains of *Bradyrhizobium japonicum* of different genetic groups have been studied. Soybean plants are able to enter into effective symbiotic relationships with all the investigated rhizobia strains independently of their growth rate and genetic affiliation. Cowpea plants are selective according to soybean nodule bacteria strains. Interacting with intensively growing USDA 123 *B. japonicum* strains they form ineffective symbiosis with low level of  $\text{N}_2$  fixation. Otherwise they form full value  $\text{N}_2$ -fixing systems with slow growing strains of USDA 4, USDA 6 and USDA 110 genetic groups. Rhizobia with different growth rate have identical RFLP-profiles of *nifH* genes. The formation of active ( $\text{Nod}^+\text{Fix}^+$  phenotype) and inactive ( $\text{Nod}^+\text{Fix}^-$  phenotype) symbiotic systems of cowpea with rhizobia is not associated with the structure of mentioned gene. Likely it can be determined by partners' specificity of genotype interaction on early stages of symbiosis development.

**Key words:** *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, cowpea, symbiotic system, specificity, RFLP-analysis, *nifH* gene.