

## СИМБІОТИЧНІ ВЗАЄМОВІДНОСИНИ МІЖ ШТАМАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* РІЗНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ГРУП І РОСЛИНАМИ СОЇ

Д.В. Крутило

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва  
НААН,  
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна

**Мета.** Дослідити взаємовідносини між штамами бульбочкових бактерій сої, які різняться за швидкістю росту і належать до різних генетичних груп, та рослиною-господарем. **Методи.** Мікробіологічні, серологічні, вегетаційних та польових дослідів, статистичні. **Результати.** Встановлено, що при взаємодії із соєю двох повільнорослих штамів *B. japonicum* 46 (група USDA 6) та *B. japonicum* M8 (група USDA 4) формування бульбочок одним із них призводило до повного блокування бульбочкоутворення іншим штамом, який контактував із коренем на 6 діб пізніше. Проте за роз'єднаної у часі інокуляції сої повільно- (*B. japonicum* 46) та інтенсивнорослим (*B. japonicum* KB11, група USDA 123) штамми бульбочки утворювались як за участі штаму, який першим інфікував рослини, так і за участі другого штаму. За спільного застосування *B. japonicum* 46 + *B. japonicum* M8 більші конкурентоспроможним виявився штам *B. japonicum* 46, який формував 63,3–73,3% бульбочок. При поєднанні штамів *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* KB11 спостерігалась незначна перевага інтенсивнорослого штаму (51,7–55,0% бульбочок до 48,3–45,0%). У польовому досліді відмічено домінування в бульбочках сої сортів Устя та Хейхе 6 інтенсивнорослих бульбочкових бактерій серогрупи KB11 (71,6% та 56,3% відповідно). Повільнорослі ризобії серогруп 46 та M8 виявлені у незначній кількості бульбочок (2,9–7,4%). На фоні численної гетерогенної популяції ризобій інтродукція штаму *B. japonicum* 46 сприяла збільшенню його частки у бульбочках до 28,6%. **Висновки.** Існуючі відмінності між штамми *B. japonicum* KB11, *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* M8 в організації геному та фенотипових властивостях проявляються і у їх взаємодії з рослиною-господарем. Найбільш пристосованим до колонізації коренів та до формування симбіозу із соєю є інтенсивнорослий штам *B. japonicum* KB11. Підтверджена визначальна роль макросимбіонта у регулюванні числа бульбочок та у вибірковій взаємодії з представниками гетерогенної популяції ризобій сої.

**Ключові слова:** *Bradyrhizobium japonicum*, відстрокована інокуляція, конкурентоспроможність, посудини Леонарда, системна відповідь, соя.

Відомо, що розвиток бобово-ризобіального симбіозу – це результат молекулярної і біохімічної взаємодії між бобовими рослинами та бульбочковими бактеріями [1, 2]. Рослина-господар у цій взаємодії виступає домінуючим партнером. Вона здатна відбирати з мікробного угруповання найбільш вигідні для себе штами ризобій, а також регулювати число бульбочок та активність азотфіксації [3, 4]. Тобто при симбіотичній взаємодії бобових рослин з бульбочковими бактеріями має місце системний контроль з боку макросимбіонта, який проявляється в авторегуляції бульбочкоутворення [5, 6].

Формування симбіозу також залежить від здатності бульбочкових бак-

терій колонізувати корінь, адсорбуватись на його поверхні, конкурувати з іншими ризобіями за сайти зв'язування та утворення бульбочок [7, 8]. Загалом зазначені властивості є складовими важливої ознаки бульбочкових бактерій – їх конкурентоспроможності.

Конкурентоспроможність бульбочкових бактерій визначається як здатність одного чи більше штамів утворювати бульбочки на коренях рослин за умов змішаної інокуляції або за наявності у ґрунті місцевої популяції ризобій [1]. Вона залежить від властивостей бактерій, а саме: їх поверхневих структур, синтезу біологічно активних речовин, рухливості. Незважаючи на значний об'єм проведених досліджень, механізм конкурентних взаємовідносин між бульбочковими бактеріями залишається до кінця нез'ясованим.

Слід зазначити, що нодуляційна конкурентоспроможність ризобій має велике значення при відборі високоефективних штамів, здатних активно колонізувати корені бобових рослин та протистояти представникам ґрунтових популяцій мікросимбіонтів [1, 9].

У попередні роки з ґрунтів України нами вилучено штами бульбочкових бактерій сої, які різняться за швидкістю росту, фізіологічними та генетичними властивостями [10]. У результаті проведених генетичних досліджень встановлено, що повільнорослі штами ризобій сої належать до декількох генетичних груп: USDA 110, USDA 4 та USDA 6. Усі інтенсивнорослі бульбочкові бактерії подібні до штамів групи USDA 123, які відносяться до відомої за літературними даними серогрупи 123 [11, 12]. Особливістю штамів з інтенсивним ростом є підвищена сапрофітна компетентність, тобто здатність виживати у ґрунті без рослини-господаря [13].

Враховуючи те, що в ґрунтових популяціях ризобій сої повільно- та інтенсивнорослі штами займають одні й ті ж екологічні ніші, між ними та рослиною-господарем виникають складні взаємовідносини, які можуть впливати на ефективність симбіотичних систем. Метою нашої роботи було дослідити взаємовідносини між штамми бульбочкових бактерій сої, які різняться за швидкістю росту і належать до різних генетичних груп, та рослиною-господарем.

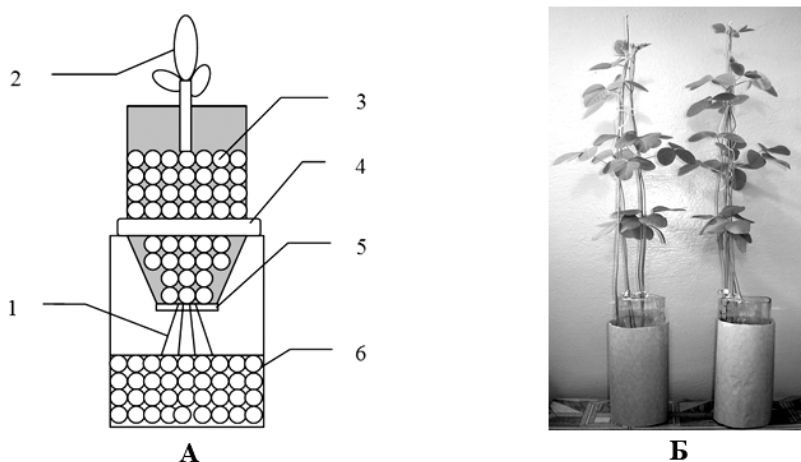
**Матеріали і методи.** Об'єктами досліджень були активні штами бульбочкових бактерій сої з повільним (*B. japonicum* 46 і *B. japonicum* M8) та інтенсивним (*B. japonicum* KB11) ростом, які відносяться до генетичних груп – USDA 6, USDA 4 та USDA 123 відповідно, а також соя сортів Устя та Хейхе 6 (надані ННЦ «Інститут землеробства» НААН і Інститутом кормів та сільського господарства Поділля НААН).

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл на качалці (220 об/хв) за температури 26-28°C на рідкому бобовому середовищі [14]. Як посівний матеріал використовували культури *B. japonicum* у експоненційній фазі росту (92-96 год), вирощені на цьому ж середовищі. Кількість посівного матеріалу становила 10% об'єму середовища.

Конкурентоспроможність штамів бульбочкових бактерій сої та реакцію рослин на інфікування ризобіями вивчали у модельних вегетаційних дослідях. Рослини сої сорту Устя вирощували за напівстерильних умов у модифікованих посудинах Леонарда [15], які складаються із двох ємнос-

тей (верхньої та нижньої), герметично з'єднаних між собою (рис. 1). Як субстрат в обох ємностях використовували стерильний вермикуліт. Культуральну рідину досліджуваних штамів ризобій сої з титром  $2 \cdot 10^9$  кл/мл у кількості 1 мл вносили одночасно у субстрат верхньої та нижньої ємностей. При вивченні конкурентних взаємовідносин між штамми бульбочкових бактерій сої їх застосовували у співвідношенні 1:1. Насіння сої висівали у верхні ємності, рослини вирощували у люміностаті протягом 40 діб. Полив здійснювали через кожні 5 діб шляхом внесення у верхню та нижню ємності 20 мл водогіпної води. Контакт коренів сої з ризобіями у нижній ємності відбувався через 6 діб після посіву, коли вони з верхньої ємності проходили повітряну зону і занурювались у субстрат нижньої ємності. Повторність дослідів – 6-кратна.

Оцінювали кількість бульбочок на коренях рослин. Найявність дослі-



**Рис. 1. Схематичне зображення модифікованих вегетативних посудин Леонарда (А) та рослини сої, вирощені у посудинах Леонарда (Б):**

1 – повітряні корені рослин; 2 – верхня частина рослини; 3 – верхня ємність, заповнена вермикулітом; 4 – фіксатор для щільності з'єднання посудин; 5 – капронова сітка; 6 – нижня ємність, заповнена вермикулітом.

### Схема вегетативних дослідів:

Варіанти дослідів	Внесення штаму:	
	верхня ємність	нижня ємність
<b>дослід № 1</b>		
1	Без інокуляції (контроль)	
2	<i>B. japonicum</i> KB11	<i>B. japonicum</i> 46
3	<i>B. japonicum</i> 46	<i>B. japonicum</i> KB11
4	<i>B. japonicum</i> 46	<i>B. japonicum</i> M8
5	<i>B. japonicum</i> M8	<i>B. japonicum</i> 46
<b>дослід № 2</b>		
1	Без інокуляції (контроль)	
2	<i>B. japonicum</i> KB11 + <i>B. japonicum</i> 46	Без інокуляції
3	Без інокуляції	<i>B. japonicum</i> KB11 + <i>B. japonicum</i> 46
4	<i>B. japonicum</i> 46 + <i>B. japonicum</i> M8	Без інокуляції
5	Без інокуляції	<i>B. japonicum</i> 46 + <i>B. japonicum</i> M8

джуваних штамів ризобій сої в бульбочках визначали у реакції аглютинації із застосуванням специфічних антисироваток [16].

Польовий дослід із вивчення нодуляційної здатності штамів ризобій сої за умов спонтанного (контроль) та штучного інфікування проводили в умовах Полісся України (Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, м. Чернігів) на дерново-підзолистому ґрунті. Насіння сої сортів Устя (Україна) та Хейхе 6 (Китай) інокулювали культуральною рідиною штаму *B. japonicum* 46 з титром  $2 \cdot 10^9$  кл/мл. Інокуляційне навантаження становило 200–300 тис. клітин на 1 насінину. Повторність дослідів – чотирикратна. Площа облікової ділянки – 4 м<sup>2</sup>. Розміщення ділянок рендомізоване.

Для оцінки різноманіття ризобій сої у «бульбочкових» популяціях використовували індекс Шеннона, який розраховували за формулою [17]:

$$H = -\sum P_i \ln P_i,$$

$H$  – індекс різноманіття Шеннона;

$P_i$  – відносна рясність  $i$ -го штаму, розрахована як  $(ni/N)$ , де  $N$  – загальна кількість бульбочок, утворених різними штамми бульбочкових бактерій сої, та  $ni$  – число бульбочок, сформованих за участі штаму ризобій певної серогрупи.

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами [18] та застосовували комп'ютерну програму Statistica 7.0.

**Результати та їх обговорення.** На першому етапі роботи нами досліджено взаємовідносини рослин сої зі штамми бульбочкових бактерій, що належать до різних генетичних груп і характеризуються різною швидкістю росту. Повільнорослий штам *B. japonicum* 46 (група USDA 6) вивчали у комбінації з інтенсивнорослим штамом *B. japonicum* KB11 (група USDA 123), а також із штамом *B. japonicum* M8 (група USDA 4), який належить до повільнорослих ризобій. Вирощування сої у модифікованих посудинах Леонарда дозволило роз'єднати у часі контактування коренів зі штамми бульбочкових бактерій, які вносили у верхню та нижню ємності, аналогічно експериментам із «розщепленим коренем».

Встановлено, що за інтродукції у верхні ємності окремо штамів з інтенсивним (*B. japonicum* KB11) та повільним (*B. japonicum* 46) ростом на коренях сої у зоні кореневої шийки формувалась значна кількість бульбочок – 28,0 та 28,1 од./рослину відповідно (табл. 1). У нижній ємності контакт коренів з бульбочковими бактеріями відбувався лише через 6 діб після проростання насіння і проходження коренями повітряної зони між двома ємностями. За умов такої відстрокованої інокуляції на нижній частині коренів в обох варіантах дослідів – *B. japonicum* KB11 / 46 та *B. japonicum* 46 / KB11 – утворювались лише поодинокі бульбочки – 0,5 та 1,1 од./рослину відповідно.

Серологічний аналіз засвідчив, що формування бульбочок відбувалось за участі як повільно-, так і інтенсивнорослого штамів. Біля кореневої шийки вони були утворені лише штамом, інтродукованим у верхню ємність, на нижній частині кореня – відповідним штамом, внесеним у ниж-

ню ємність.

При взаємодії з рослинами сої двох повільнорослих штамів розміщення бульбочок на коренях було іншим. У варіантах *B. japonicum* 46 / М8 та *B. japonicum* М8 / 46 кількість бульбочок у зоні кореневої шийки становила 24,1 та 21,5 од./рослину відповідно. Серологічний аналіз підтвердив, що всі вони утворені саме штамми, внесеними у верхню ємність. За відстрокової інокуляції жоден із повільнорослих штамів у нижній ємності не був спроможним інфікувати сою.

Наведені дані свідчать про системну регуляцію рослиною-господарем процесу ініціації бульбочок та їх кількості. Незалежно від особливостей штамів-інокулянтів переважну кількість бульбочок утворював штам, який першим колонізував корені сої у верхній ємності. На нижній частині кореня формування бульбочок відбувалось лише у варіантах із внесенням повільно- та інтенсивнорослого штамів, тоді як за використання двох близьких повільнорослих штамів процес бульбочкоутворення повністю

Таблиця 1

**Інфікування коренів сої штамми *Bradyrhizobium japonicum* з повільним та інтенсивним ростом (вегетаційний дослід)**

Варіанти дослідів	Розташування бульбочок на корені	Кількість бульбочок,		Частка штамів бульбочкових бактерій сої у бульбочках, %		
		од./рослину	%	46	КВ11	М8
Без інокуляції (контроль)	Весь корінь	0	0	–	–	–
Інокуляція <i>B. japonicum</i> КВ11 46	Верхня частина	28,00±0,80	98,35	0	100,00	–
	Нижня частина	0,47±0,06	1,65	100,00	0	–
	Весь корінь	28,47±0,75	100,00	1,65	98,35	–
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46 КВ11	Верхня частина	28,13±0,95	96,14	100,00	0	–
	Нижня частина	1,13±0,15	3,86	0	100,00	–
	Весь корінь	29,26±0,90	100,00	96,14	3,86	–
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46 М8	Верхня частина	24,06±0,47	100,00	100,00	–	0
	Нижня частина	0	0	0	–	0
	Весь корінь	24,06±0,47	100,00	100,00	–	0
Інокуляція <i>B. japonicum</i> М8 46	Верхня частина	21,47±0,40	100,00	0	–	100,00
	Нижня частина	0	0	0	–	0
	Весь корінь	21,47±0,40	100,00	0	–	100,00

Примітка. «–» – не визначали.

блокувався макросимбіонтом. Схожі результати отримано Kosslak R. із співавтором при вивченні авторегуляції бульбочкоутворення у сої в експериментах із штучно «розщепленим коренем» [6].

Отже, можна припустити, що при взаємодії сої з різними представниками виду *B. japonicum* контроль рослинами процесу інфікування може проявлятися як у частковій, так і повній забороні утворення бульбочок. Механізми, які контролюють вибіркову реакцію рослин на штами бульбочкових бактерій та їх здатність ініціювати формування бульбочок, залишаються до кінця не з'ясованими. Одним із факторів, що впливають на регуляцію симбіотичних взаємовідносин, можуть бути притаманні штаму бактерій властивості, які дозволяють йому долати захисні системи рослини-господаря та конкурувати з іншими ризобіями того ж виду.

Наступним етапом нашої роботи було дослідити взаємовідносини сої зі штамми *B. japonicum* за одночасного використання їх у бінарних композиціях.

Встановлено, що за інтродукції у верхню або нижню ємності спільно двох штамів *B. japonicum* KB11 та *B. japonicum* 46 кількість бульбочок на коренях рослин була значно більшою – 35,4 та 38,3 од./рослину відповідно (табл. 2), ніж при застосуванні кожного із штамів окремо (табл. 1). За внесення штамів у верхню ємність всі бульбочки утворювались в зоні кореневої шийки (рис. 2 А). Серологічний аналіз показав, що співвідношення штамів *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* KB11 у бульбочках становило 48,3 % до 51,7 %.

Привертає увагу те, що за спільної інтродукції двох штамів у нижню ємність бульбочки формувались у двох зонах кореня – на нижній (89,5 % бульбочок) та середній (10,5 % бульбочок) його частинах (рис. 2 Б). На нижній частині кореня співвідношення повільно- та інтенсивнорослого штамів у бульбочках становило: *B. japonicum* 46 – 45,0 % та *B. japonicum* KB11 – 55,0 %. На середній частині кореня (на межі виходу корінців із верхньої ємності в зону повітряних коренів) у бульбочках було ідентифіковано лише штам *B. japonicum* 46. В обох варіантах дослідження перевага

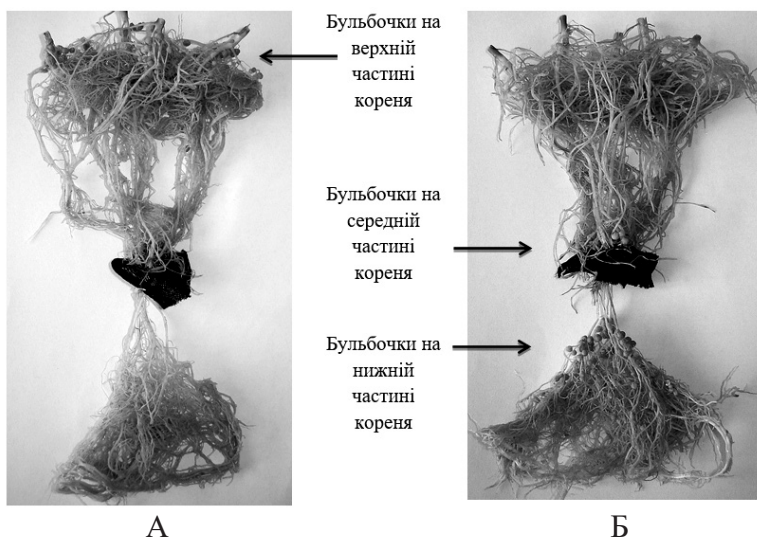


Рис. 2. Бульбочки на коренях сої за інтродукції штамів *B. japonicum* KB11 + *B. japonicum* 46 у верхню (А) та нижню (Б) ємності посудин Леонарда.

штаму *B. japonicum* KB11 була незначною.

За сумісного використання у верхній ємності двох повільнорослих штамів *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* M8 вони утворювали 35,1 бульбочок на 1 рослину, які зосереджувались у зоні кореневої шийки. Штам *B. japonicum* 46 домінував на коренях і утворював 73,3% бульбочок, тоді як штам *B. japonicum* M8 – лише 26,7% бульбочок.

За умов, коли два повільнорослі штами вносили одночасно у нижню ємність, основна частина бульбочок (35,9 од./рослину) розміщувалась на нижній ділянці кореня, 63,3% з них представлено штамом *B. japonicum* 46, а 36,7% – штамом *B. japonicum* M8. На середній частині всі бульбочки (5,0 од./рослину) сформувались за участі штаму *B. japonicum* M8.

Отже, за спільної інтродукції двох штамів *B. japonicum* у нижню єм-

**Таблиця 2**

**Нодуляційна здатність та конкурентоспроможність бульбочкових бактерій сої з повільним та інтенсивним ростом при їх сумісному застосуванні (вегетаційний дослід)**

Варіанти дослідів	Розташування бульбочок на корені	Кількість бульбочок,		Частка штамів <i>B. japonicum</i> у бульбочках, %		
		од./рослину	%	46	KB11	M8
Без інокуляції (контроль)	Весь корінь	0	0	–	–	–
Інокуляція <i>B. japonicum</i> KB11+46	Верхня частина	35,40±0,50	100,00	48,33	51,67	–
	Середня частина	0	0	0	0	–
	Нижня частина	0	0	0	0	–
	Весь корінь	35,40±0,50	100,00			
Інокуляція <i>B. japonicum</i> KB11+46	Верхня частина	0	0	0	0	–
	Середня частина	4,00±0,26	10,45	100,00	0	–
	Нижня частина	34,27±0,60	89,55	45,00	55,00	–
	Весь корінь	38,27±0,78	100,00			
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46+M8	Верхня частина	35,13±0,80	100,00	73,33	–	26,67
	Середня частина	0	0	0	–	0
	Нижня частина	0	0	0	–	0
	Весь корінь	35,13±0,80	100,00			
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46+M8	Верхня частина	0	0	0	–	0
	Середня частина	5,00±0,17	12,22	0	–	100,00
	Нижня частина	35,93±1,36	87,78	63,33	–	36,67
	Весь корінь	40,93±1,53	100,00			

Примітка. «–» – не визначали.

ність посудин Леонарда бульбочки утворювались на нижній та середній ділянках кореня. На нашу думку, це може бути пов'язано із конкуренцією між досліджуваними мікроорганізмами за екологічну нішу та елементи живлення. У результаті такої боротьби менш конкурентоспроможний штам переміщувався по кореню у висхідному напрямку для пошуку вільних сайтів зв'язування та інфікував рослину-господаря.

Результати, отримані у вегетаційних дослідах за контрольованих умов освітлення, температури та вологості, свідчать, що у формуванні симбіотичних взаємовідносин важливу роль відіграють як рослина-господар, так і бульбочкові бактерії. У природному середовищі за дії різних абіотичних та біотичних факторів процес становлення симбіозу може зазнавати значних змін.

Метою наших подальших досліджень було вивчити нодуляційну здатність та колонізацію штамми *B. japonicum* коренів двох сортів сої – Устя та Хейхе 6. Рослини вирощували на фоні численної гетерогенної популяції бульбочкових бактерій сої, яка була сформована за участі інтродукованих у попередні роки інтенсивно- (*B. japonicum* KB11) та повільнорослих (*B. japonicum* 46 і *B. japonicum* M8) штамів [19].

У фазі цвітіння загальна кількість бульбочок на коренях сої сорту Устя складала 61,8 од./рослину, сорту Хейхе 6 – 84,0 од./рослину. Встановлено, що вони сформувались за участі бульбочкових бактерій сої, які належать до серологічних груп: KB11 (інтенсивнорослі штами), 46 (повільнорослі штами), M8 (повільнорослі штами, виявлені лише у бульбочках сорту Хейхе 6), а також до невизначених серогруп (табл. 3). Отримані дані свідчать про те, що нодуляційна здатність бульбочкових бактерій цих серогруп та реакція рослин на них істотно різнилися. Так, на сої сорту Устя найбільше бульбочок (62,0-86,2%) формували інтенсивнорослі ризобії серогрупи KB11, повільнорослі штами серогрупи 46 утворювали від 3,7% до 8,0% бульбочок, решту – представники невизначених серогруп (13,8-30,0% бульбочок).

Заслуговеє на особливу увагу поширення бульбочкових бактерій вздовж кореня: ризобії серогрупи KB11 повністю домінували у бульбочках на всіх частинах кореня, тоді як повільнорослі штами серогрупи 46 виявлені лише у зоні кореневої шийки та середній частині.

Сорт сої Хейхе 6 здатний взаємодіяти з більш широким колом специфічних бульбочкових бактерій, про що свідчить присутність у бульбочках представників серогрупи M8 та більша частка неідентифікованих ризобій. Уздовж всього кореня виявлено бульбочкові бактерії серогрупи KB11 (48,2-63,2% бульбочок), M8 (5,3-9,3%) та неідентифіковані ризобії (31,6-37,0%). Порівняно із сортом Устя відмічено зниження у бульбочках частки інтенсивнорослих штамів. Представники серогрупи 46 формували лише 3,0-5,6% бульбочок у верхній частині кореня.

В обох сортів сої на верхній та середній ділянках кореня відмічено найбільше різноманіття бульбочкових бактерій у бульбочках, що підтверджують максимальні значення індексу різноманіття Шеннона (*H*).

Інокуляція сої штамом *B. japonicum* 46 істотно змінювала розподіл ризобій у «бульбочкових» популяціях досліджуваних сортів. Так, у бульбочках сої сорту Устя частка штаму *B. japonicum* 46 зростала до 8,0-28,6%, у сорту Хейхе 6 – до 11,9-28,6% і він був виявлений по всій довжині кореня.



Кількість бульбочок, утворених інтенсивнорослими штамми, зменшувалась, проте вони залишалися домінуючою групою мікосимбіонтів. Загалом соя сорту Хейхе 6 підтримувала більше різноманіття бульбочкових бактерій порівняно із сортом Устя ( $H=0,96-1,03$  проти  $H=0,67-0,88$ ), що є доказом важливої ролі рослини у становленні та регулюванні симбіотичних взаємовідносин із ризобіями.

Таким чином, дані проведених вегетаційних дослідів із штамми бульбочкових бактерій сої, які різняться за генетичними та фізіологічними властивостями, свідчать про індивідуальні особливості поведінки кожного із них при взаємодії з рослиною-господарем та іншими представниками ризобіальної мікробіоти.

Загалом інтенсивнорослий штам *B. japonicum* KB11 (група USDA 123) більш пристосований до конкурентної боротьби за можливість інфікувати рослину-господаря. Про це свідчить відсутність повного блокування рослиною утворення бульбочок за відстрокованої інокуляції двома штамми у першому досліді, відносно рівномірний розподіл штамів *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* KB11 у бульбочках за спільної інокуляції у другому досліді, активна колонізація представниками серогрупи KB11 кореня та домінування їх у бульбочках обох сортів сої за польових умов. Аналогічні результати отримані Нам G. із колегами, які показали, що в бульбочках сої з різних полів штату Айова переважали (від 52% до 97%) представники групи USDA 123. При вивченні популяцій ризобій сої в ґрунтах Бразилії та Польщі також встановлено домінування бактерій серогрупи 123 [12, 20, 21].

**Таблиця 3**

**Колонізація коренів сої різними штамми бульбочкових бактерій (польовий дослід)**

Сорт сої	Розташування бульбочок на корені	Розподіл штамів ризобій сої у бульбочках, %									
		Без інокуляції (контроль)					Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46				
		46	M8	KB11	Інші*	Н	46	M8	KB11	Інші*	Н
Устя	Верхня частина	3,70	0	66,67	29,63	0,75	13,04	0	65,22	21,74	0,88
	Середня частина	8,00	0	62,00	30,00	0,86	28,57	0	57,14	14,29	0,96
	Нижня частина	0	0	86,21	13,79	0,40	8,00	0	68,00	24,00	0,81
	Весь корінь (середнє)	3,90	0	71,63	24,47	0,67	16,54	0	63,45	20,01	0,88
Хейхе 6	Верхня частина	5,56	9,26	48,15	37,04	1,10	14,29	4,08	67,35	14,29	0,95
	Середня частина	3,03	7,58	57,58	31,82	0,98	28,57	10,71	50,00	10,71	1,18
	Нижня частина	0	5,26	63,16	31,58	0,81	11,90	2,38	64,29	21,43	0,96
	Весь корінь (середнє)	2,85	7,37	56,30	33,48	0,96	18,25	5,72	60,55	15,48	1,03

Примітка. \* – бульбочкові бактерії сої не віднесені до відомих серогруп.

Повільнорослий штам *B. japonicum* 46 (група USDA 6) також здатний конкурувати з іншими бульбочковими бактеріями (зокрема зі штамом *B. japonicum* M8) за їх спільного використання. Як свідчать дані польового дослідження, він виживає в ґрунті впродовж тривалого часу (популяція створена 8-10 років тому [19]), однак не займає домінуючого положення серед місцевої ризобіальної мікробіоти. За інокуляції насіння штам *B. japonicum* 46 здатний протистояти представникам ґрунтової популяції ризобій сої, про що свідчить збільшення його частки в бульбочках (до 28,6%) уздовж кореня.

Слід також підкреслити визначальну роль макросимбіонта у регулюванні числа бульбочок та у вибірковій взаємодії з представниками гетерогенної популяції бульбочкових бактерій сої.

Таким чином, існуючі відмінності між штамми *B. japonicum* KB11, *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* M8 в організації геному та фенотипових властивостях проявляються і у їх взаємодії з рослиною-господарем. Найбільш пристосованим до колонізації коренів та до формування повноцінного симбіозу є штам *B. japonicum* KB11. У симбіотичній взаємодії досліджених штамів із соєю важлива роль належить рослині, яка регулює кількість бульбочок та склад бульбочкової популяції, віддаючи перевагу спорідненим штамам ризобій.

Подальші дослідження бульбочкових бактерій сої з різною швидкістю росту та їх взаємодії між собою і рослиною-господарем є перспективними з наукової та практичної точок зору. Вони дозволять глибше розкрити особливості формування та функціонування симбіотичних систем сої з ризобіями, а також розробити нові підходи до створення і застосування біопрепаратів для сої.

## СИМБИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ШТАММАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ГРУПП И РАСТЕНИЯМИ СОИ

*Д.В. Крутило*

*Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства  
НААН, ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина*

### Резюме

**Цель.** Исследовать взаимоотношения между штаммами клубеньковых бактерий сои, различающихся по скорости роста и принадлежащих к различным генетическим группам, и растением-хозяином. **Методы.** Микробиологические, серологические, вегетационных и полевых опытов, статистические. **Результаты.** Установлено, что при взаимодействии с соей двух медленно растущих штаммов *B. japonicum* 46 (группа USDA 6) и *B. japonicum* M8 (группа USDA 4) формирование клубеньков одним из них приводило к полному блокированию клубенькообразования другим штаммом, который контактировал с корнем на 6 суток позже. Однако при отсроченной инокуляции сои медленно- (*B. japonicum* 46) и интенсивнорастущим (*B. japonicum* KB11, группа USDA 123) штаммами клубеньки образовывались как при участии штамма, который первым инфицировал растения, так и при участии второго штамма. При совместном применении *B. japonicum* 46 + *B. japonicum* M8 более конкурентоспо-

собным оказался штамм *B. japonicum* 46, который формировал 63,3–73,3% клубеньков. При одновременном использовании штаммов *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* KB11 наблюдалось незначительное преобладание интенсивнорастущего штамма (51,7–55,0% клубеньков к 48,3–45,0%). В полевом опыте отмечено доминирование в клубеньках сои сортов Устя и Хэйхэ 6 интенсивнорастущих клубеньковых бактерий серогруппы KB11 (71,6% и 56,3% соответственно). Медленнорастущие ризобии серогрупп 46 и M8 обнаружены в незначительном количестве клубеньков (2,9–7,4%). На фоне многочисленной гетерогенной популяции ризобий интродукция штамма *B. japonicum* 46 способствовала увеличению его количества в клубеньках до 28,6%. **Выводы.** Существующие различия между штаммами *B. japonicum* KB11, *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* M8 в организации генома и фенотипических свойствах проявляются и в их взаимодействии с растением-хозяином. Наиболее приспособленным к колонизации корней и формированию симбиоза с соей оказался интенсивнорастущий штамм *B. japonicum* KB11. Подтверждена определяющая роль макросимбионта в регулировании числа клубеньков и в избирательном взаимодействии с представителями гетерогенной популяции ризобий сои.

*Ключевые слова:* *Bradyrhizobium japonicum*, отсроченная инокуляция, конкурентоспособность, сосуды Леонарда, системный ответ, соя.

## SYMBIOTIC RELATIONSHIP BETWEEN *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS OF DIFFERENT GENETIC GROUPS AND SOYBEAN PLANTS

*D.V. Krutylo*

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

### Summary

**Aim.** The aim of our work was to research the relationship between the host-plant and strains of soybean nodule bacteria, which differ in growth rates and belong to different genetic groups. **Methods.** Microbiological, serological, vegetation and field experiments, statistical. **Results.** It was found, when interacting with soybean of two slow growing strains *B. japonicum* 46 (group USDA 6) and *B. japonicum* M8 (group USDA 4), the formation of nodules by one of them led to complete blocking of nodule formation by another strain, that contacted the root to six days later. However, with the delayed inoculation of soybean by slow- (*B. japonicum* 46) and intensive-growing (*B. japonicum* KB11, group USDA 123) strains, nodules were formed with the participation of the strain that first infected the plants, and with the participation of the second strain. The *B. japonicum* strain 46 formed 63.3–73.3% nodules and it was more competitive than when strains of *B. japonicum* 46 and *B. japonicum* M8 was used together. With the simultaneous use of strains *B. japonicum* 46 and *B. japonicum* KB11, an insignificant predominance of the intensive-growing strain (51.7–55.0% nodules to 48.3–45.0% nodules) was observed. In the field experiment it was observed the domination in the nodules of soybean varieties of Ustyа and Heihe 6 of intensive-growing nodule bacteria of the serogroup KB11 (71.6% and 56.3% respectively). Slow-growing rhizobia of serogroups 46 and M8 were found in a small number of nodules (2.9–7.4%). The introduction of *B. japonicum* 46 strain increased its number in nodules to 28.6% against the background of large heterogeneous population of rhizobia. **Conclusions.**

Existing differences between *B. japonicum* KB11, *B. japonicum* 46 and *B. japonicum* M8 strains in the organization of the genome and phenotypic properties are also manifested in their interaction with the host-plant. The intensive-growing strain of *B. japonicum* KB11 was most adaptable to colonization of roots and the formation of symbiosis with soybean. The determining role of macrosymbiont in regulating the number of nodules and in selective interaction with representatives of the heterogeneous population of soybean rhizobia has been confirmed.

*Keywords:* *Bradyrhizobium japonicum*, delayed inoculation, competitiveness, Leonard jars, system response, soybean.

1. Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P. The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria. Translated in rus. by I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov. St.-Petersburg: Biont, 2002. 568 p. Russian.
2. Schultze M., Kondorosi A. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 1998; 32: 33-57.
3. Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu., Glyanenko M.N., Mishchenko T.M., Maystrenko G.G. [Genetics of symbiosis and breeding of a macrosymbiont for intense nitrogen fixation by the example of pea]. *VOGiS Herald.* 2010; 14(2): 357–374. Russian.
4. Fobert P.R., Roy N., Nash J.H.E., Lyer V.N. Procedure for obtaining efficient root nodulation of a pea cultivar by a desired *Rhizobium* strain and preempting nodulation by other strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991; 57: 1590–1594.
5. Tikhonovich I.A. [Genetics of systemic control of plant-microbe interactions]. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2013; 17(3): 985-1002. Russian.
6. Kosslak R.M., Bohlool B.B. Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiol.* 1984; 75: 125–130.
7. Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Sharypova L.A., Provorov N.A., Simarov B.V. [Analysis of different types of competitive capacity in the alfalfa rhizobia (*Sinorhizobium meliloti*) Tn-5 mutants]. *Russian Journal of Genetics.* 2001; 37(11). 1507–1512. Russian.
8. Sessitsch A., Jjemba P.K., Hardarson G., Akkermans A.D.L., Wilson K.J. Measurement of the competitiveness index of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 derivatives marked with the *gusA* gene. *Soil Biol. Biochem.* 1997; 29: 1099–1110.
9. Vorobyov N.I., Provorov N.A. [The quorum sensing and the nodulation competitiveness of rhizobia during infection of leguminous plants]. *Agricultural Biology.* 2015; 50(3): 298–304. Russian.
10. Krutylo D.V., Nadkernychna O.V., Kovalevska T.M., Patyka V.P. [Biological diversity of soybean nodule bacteria in soils of Ukraine]. *Mikrobiol. Zh.* 2008; 70(6). 27–34. Ukrainian.
11. Krutylo D.V., Zotov V.S. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2015; 5(2): 102–109.
12. Madrzak C.J., Golinska B., Kroliczak J., et al. Diversity among Field Populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(4): 1194–1200.
13. Krutylo D.V., Ushakova M.A., Kolesnik S.I., Ivanyuk S.V., Kobak S.Y. [Strain of soybean

- nodule bacteria having high saprophytic competence as the basis of biopreparations]. Feeds and Feed Production. 2015; 80: 59-65. Ukrainian.
14. [Methods of cultivation and long-term storage of nodule bacteria in the collections. Methodical recommendations]. Ed. by T.M. Kovalevska, S.F. Kozar, D.V. Krutylo, V.P. Gorban et al.. Chernihiv: ICMAB NAAS; 2015. Ukrainian.
  15. V.V. Volkogon, O.V. Nadkernychna, L.M. Tokmakova et al. [Experimental soil microbiology: Monograph]. V.V. Volkogon, editor. Kyiv: Agrarna nauka, 2010. 464 p. Ukrainian.
  16. Krutylo D.V. [The competitiveness of soybean nodule bacteria strains with slow and intensive growth]. Agricultural microbiology. 2011; 14: 64–76. Ukrainian.
  17. Pielou E.C. Ecological diversity and its measurement. In An Introduction to Mathematical Ecology. New York: Wiley Interscience. John Wiley & Sons; 1969. p. 221–235.
  18. Dospikhov B.A. [Field Experience Method]. Moskow: Agropromizdat; 1985. Russian.
  19. Krutylo D.V., Volkova I.V. [Serological diversity of soybean nodule bacteria in Ukraine soils]. Agroecological journal. 2012; 4: 66–71. Ukrainian.
  20. Godoy L.P., Vasconcelos A.T.R., Chueire L.M.O. et al. Genomic panorama of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, a commercial inoculant strain largely established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123. Soil Biology and Biochemistry. 2008; 40(11): 2743–2753.
  21. Ham G.E., Frederick L.R., Anderson I.C. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules sampled in Iowa. Agronomy Journal. 1971; 63(1): 69-72.

Отримана 26.01.2017