

ПРИЖИВАНІСТЬ ШТАМІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* У ҐРУНТІ ЗА ЇХ ІНТРОДУКЦІЇ В АГРОЦЕНОЗ СОЇ

Д.В. Крутило

Інститут сільськогосподарської мікробіології
та агропромислового виробництва НААН,
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна
e-mail: krutylov@gmail.com

Мета. Оцінити здатність штамів *Bradyrhizobium japonicum* з повільним та інтенсивним ростом приживатись у ґрунті та тривалий час зберігати симбіотичну активність. **Методи.** Приживаність штамів-інокулянтів у ґрунті вивчали у польових дослідках із соєю (*Glycine max* (L.) Merr.). Як рослини-пастки для ризобій сої використовували вигну китайську (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), маш (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) та квасолю аדзукі (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi). Наявність досліджуваних штамів у бульбочках визначали у реакції аглютинації із застосуванням специфічних антисироваток. Морфолого-культуральні властивості ізолятів бульбочкових бактерій вивчали згідно загальноприйнятих методик. Секвенування 16S-23S рДНК ризобій здійснювали на автоматичному ДНК-секвенаторі ABI 3130 Genetic Analyser. **Результати.** Штами *B. japonicum* з різною швидкістю росту були інтродуковані в агроценоз сої у перший рік експерименту. За вирощування сої в монокультурі спостерігалось поступове витіснення штамом з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11 повільнорослих ризобій (*B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* 634б) із бульбочкових популяцій. На четвертий рік досліджень зазначені штами були відсутні у бульбочках сої, однак зберігались у ґрунті як сапрофітні мікроорганізми. Їх присутність виявлена за використання рослин-пасток, які вступали з інтродукованими мікроорганізмами у симбіотичні взаємовідносини. Частка штамів із повільним ростом у бульбочках різних видів вигни коливалась у межах від 2,1 до 58,3%. Наявність повільнорослих штамів у бульбочкових популяціях вигни китайської, машу та квасолі аדзукі доведена мікробіологічними, серологічними (належність до серогруп 46, M8, 634б) та молекулярно-генетичними методами. За результатами секвенсу послідовностей ITS-регіону ризобій з бульбочок машу показали 99,4–99,8% ідентичності зі штамом *B. japonicum*, депонованими у GenBank. Найвищий рівень гомології (99,9–100,0%) відмічено із штамом *B. japonicum* KC23, який є типовим представником серологічної групи M8. **Висновки.** Інтродуковані у агроценоз сої штами *B. japonicum* з повільним та інтенсивним ростом зберігаються у ґрунті тривалий час. Вони займають свою екологічну нішу в місцевому ризобіальному угрупованні, але мають різні стратегії існування *ex planta* та *in planta*. Впродовж п'яти років співвідношення досліджуваних штамів у бульбочкових популяціях сої суттєво змінюється: від наявності всіх штамів у бульбочках до повного домінування штаму з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11 та переходу повільнорослих ризобій до сапрофітного існування.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, ізоляти, рослина-пастка, 16S-23S рДНК, соя, вигна, маш, квасоля аדзукі.

Відомо, що однією з ефективних систем біологічної азотфіксації, яка має важливе екологічне і практичне значення, є симбіоз бобових рослин із бульбочковими бактеріями [1]. Завдяки здатності до формування азотфік-

сувальних бульбочок ризобії розглядають як важливий генетичний ресурс для біотехнології сільського господарства [2].

Застосування біопрепаратів на основі високоефективних штамів бульбочкових бактерій у технологіях вирощування бобових культур забезпечує підвищення їхньої урожайності, а також сприяє формуванню у ґрунті місцевих популяцій специфічних ризобій [1, 3]. За регулярної циркуляції мікросимбіонтів між екологічними нішами (ґрунт → бульбочки → ґрунт) у ґрунтових популяціях бульбочкових бактерій відбуваються глибокі та закономірні перетворення їх просторових та генетичних структур [4]. У результаті таких змін у агроценозах можуть з'являтися ризобії з низькою азотфіксувальною активністю, деякі штами можуть втрачати здатність до інфікування рослин-господарів і тривалий час існувати у ґрунті як сапрофіти [5, 6].

Раніше нами було показано, що популяції бульбочкових бактерій сої в ґрунтах України представлені двома групами штамів: із повільним та інтенсивним ростом, які суттєво розрізняються за фенотиповими та генотиповими властивостями [7, 8]. Методом аналітичної селекції отримано нові високоефективні штами ризобій сої з повільним та інтенсивним ростом, які використовуються як біоагенти препаратів для сої.

Для раціонального використання можливостей бобово-ризобіально-го симбіозу необхідно звертати увагу не лише на ефективність нових штамів, але і знати, за яких умов штами-інокулянти виживають у ґрунті, успішно колонізують кореневу систему рослин та тривалий час зберігають симбіотичну активність. Незважаючи на досить глибоке вивчення рослинно-мікробних взаємодій, на сьогодні відсутні детальні відомості щодо приживаності ризобій сої в агроценозах України.

Враховуючи сказане вище, метою нашої роботи було оцінити здатність штамів *Bradyrhizobium japonicum* з повільним та інтенсивним ростом приживатись у ґрунті та зберігати симбіотичну активність.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були виробничі штами бульбочкових бактерій сої з повільним (*Bradyrhizobium japonicum* 46, *B. japonicum* M8, *B. japonicum* 6346) та інтенсивним (*B. japonicum* KB11) ростом, ризобії, ізольовані з бульбочок вигни, машу та квасолі адзукі, а також рослини сої (*Glycine max* (L.) Merr.), вигни китайської (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), машу (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) та квасолі адзукі (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi). Досліджувані штами зберігаються в колекції бульбочкових бактерій сої лабораторії рослинно-мікробних взаємодій та в Колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Вивчення приживаності у ґрунті штамів *B. japonicum* – біоагентів мікробних препаратів – проводили у зоні Полісся України на дослідному полі Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (ІСМАВ НААН), м. Чернігів. Тип ґрунту – чорнозем вилугуваний. Польовий дослід закладали на ділянці, де соя раніше не вирощувалась і місцеві специфічні ризобії були відсутні. У перший рік досліджень насіння сої сорту Устя інокулювали штамами ризобій сої з інтенсивним (*B. japonicum* KB11) та повільним (*B. japonicum* 46, *B. japonicum*

M8, *B. japonicum* 6346) ростом. Інокуляційне навантаження у варіантах становило 200–300 тис. клітин на 1 насінину (польовий дослід 2008 р.). Розміщення ділянок рендомізоване, облікова площа – 6 м², повторність досліді – чотирикратна.

У фазі цвітіння підраховували кількість бульбочок на коренях рослин. Активність симбіотичної азотфіксації визначали ацетилен-етиленовим методом [9] на газовому хроматографі «Chrom-4» з полум'яно-іонізаційним детектором (колонка з β-β' оксидіпропіонітрилом).

Восени після відмирання бульбочок та навесні поле переорювали, забезпечуючи рівномірний розподіл досліджуваних штамів ризобій у ґрунті. У наступні після інтродукції ризобій роки (2009–2011 рр.) на даному полі вирощували неінокульовану сою у монокультурі. У 2012 р. на ділянці, окрім сої, рендомізовано висівали три види вигни: вигну китайську, маш та квасолю адзукі, які були використані як рослини-пастки (trap-hosts) [10] для бульбочкових бактерій *B. japonicum*.

Протягом п'яти років на дослідних ділянках відбирали по 20 рослин та формували середню пробу кореневих бульбочок (48 одиниць). Наявність досліджуваних штамів *B. japonicum* у бульбочках сої, вигни, машу та квасолі адзукі визначали у реакції аглютинації із застосуванням гомогенатів бульбочок і специфічних антисироваток: KB11, 46, M8, 6346 [11, 12].

Із бульбочок вигни, машу та квасолі адзукі отримували ізоляти бульбочкових бактерій, вивчали їх основні морфолого-культуральні властивості [13, 14] та здатність до симбіозу із соєю. Вегетаційний дослід проводили на безазотовому субстраті (вермикуліт), зволоженому 0,2% розчином КН₂РО₄, згідно із загальноіснуючими правилами. У досліді використовували сою сорту Устя. Інокуляційне навантаження становило 200-300 тис. клітин на 1 насінину. Повторність досліді – 4 - кратна.

Для генетичної ідентифікації ізоляти з бульбочок машу вирощували на агаризованому середовищі ТУ [15]. Тотальну ДНК ризобій виділяли зі свіжих культур (експоненційна фаза росту) за допомогою набору «ДНК-сорб Б». Як молекулярний маркер була обрана ділянка між генами 16S рРНК та 23S рРНК (ITS-регіон). Для ампліфікації міжгенного регіону застосовували праймери: FGPS1490-72 5'-TGCGGCTGGATCCCCCTCCTT-3' та FGPL132-38 5'-CCGGGTTT-CCCCATT-3' [16, 17]. Секвенування здійснювали на автоматичному ДНК-секвенаторі ABI 3130 Genetic Analyser. Порівняльний аналіз отриманих послідовностей з послідовностями бази даних GenBank проводили за допомогою програми BLASTN (версія 2.2.22).

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

Результати. Здатність виробничих штамів бульбочкових бактерій сої приживатись у ґрунті вивчали в польових досліді із соєю. Як видно з даних табл. 1, на коренях рослин контрольного варіанту (без інокуляції) бульбочки не утворювались, що підтверджує відсутність місцевої популяції ризобій сої у ґрунті. Всі досліджувані штами-інокулянти *B. japonicum* формували повноцінний азотфіксувальний симбіоз із соєю. На коренях рослин вони утворювали значну кількість бульбочок (15–18 од. на рослину), нітрогеназна активність яких коливалась у межах від 15,3 до 33,3 мкг N/рослину

за год. Серологічний аналіз засвідчив, що у кожному із варіантів досліджу бульбочки формувались виключно штамми-інокулянтами (100,0%), які мають специфічну антигенну структуру і належать до різних серогруп: KB11, 46, M8 та 6346.

Таблиця 1

Симбіотична активність штамів *V. japonicum* з повільним та інтенсивним ростом та їх приживаність у ґрунті (польові досліді, ІСМАВ НААН, 2008-2011 рр.)

Рік досліджень	Варіанти досліджу	Кількість бульбочок, од./рослину	Активність азотфіксації, мкг N/рослину за год	Частка штамів у бульбочках сої, %			
				KB11	46	M8	6346
2008	Без інокуляції (контроль)	0	0	0	0	0	0
	Інокуляція <i>V. japonicum</i> 46	17,5±1,4	33,3±3,6	0	100,0	0	0
	Інокуляція <i>V. japonicum</i> M8	15,1±1,2	29,8±3,9	0	0	100,0	0
	Інокуляція <i>V. japonicum</i> KB11	15,7±0,9	30,2±3,5	100,0	0	0	0
	Інокуляція <i>V. japonicum</i> 6346	11,6±0,9	15,3±1,2	0	0	0	100,0
2009	Без інокуляції	27,8±1,8	30,0±1,5	71,7	20,0	3,3	5,0
2010	Без інокуляції	18,1±0,6	11,7±1,0	91,7	8,3	0	0
2011	Без інокуляції	38,0±0,8	22,7±1,5	100,0	0	0	0

Протягом наступних років (2009–2011 рр.) ми проводили моніторинг інтродукованих у ґрунт штамів *V. japonicum*. З цією метою на дослідному полі вирощували неінокульовану сою, оцінювали нодулюючу здатність і активність бульбочкових бактерій, які ставали частиною ризобіального ценозу.

На другий рік експерименту на коренях сої утворювалась значна кількість бульбочок (28 од. на рослину) із високою нітрогеназною активністю (30,0 мкг N/рослину за год), що свідчить про формування у ґрунті місцевої популяції ризобій. Серологічне вивчення бульбочок показало, що всі інтродуковані штами інфікували сою, проте вони істотно розрізнялись за нодуляційною здатністю. Домінуючим у бульбочковій популяції ризобій був штам з інтенсивним ростом *V. japonicum* KB11 – він утворював 71,7% бульбочок. Значно менша кількість бульбочок (20,0%) була утворена штамом із повільним ростом *V. japonicum* 46. Решта штамів (*V. japonicum* M8 та *V. japonicum* 6346) виявились менш конкурентоспроможними і вже на другий рік вирощування сої ініціювали утворення лише 3,3–5,0% бульбочок.

На третій рік у бульбочках сої спостерігалось подальше зростання частки штаму *V. japonicum* KB11 (91,7%) та зниження частки штаму *V. japonicum* 46 (до 8,3%). Штами *V. japonicum* M8 та *V. japonicum* 6346 взагалі не інфікували сою і не були виявлені у бульбочках.

Звертає на себе увагу той факт, що на четвертий рік досліджень лише штам з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11 був здатний колонізувати корені сої, повністю витісняючи повільнорослі штами *B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* 6346 із бульбочок. Тобто, за вирощування сої у монокультурі відбувалось перетворення поліштамової бульбочкової популяції ризобій у моноштамову. Водночас фіксація молекулярного азоту у сформованих симбіотичних системах залишалась на досить високому рівні (11,7–30,0 мкг N/рослину за год), хоч і варіювала за роками досліджень. На нашу думку, така активність штаму з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11 пов'язана з його сапрофітними та симбіотичними властивостями. Це дозволяє зазначеному штаму підтримувати протягом тривалого часу екологічно значущу щільність популяції та успішно конкурувати з іншими представниками даного виду мікроорганізмів.

Зважаючи на отримані дані щодо елімінації повільнорослих штамів *B. japonicum* із бульбочок, важливо було оцінити стан місцевої популяції ризобій сої, яка сформувалась у ґрунті через п'ять років після внесення штамів-інокулянтів. Як рослини-пастки ми використовували три види вигни: вигну китайську, маш та квасолю адзукі, які здатні утворювати симбіоз із багатьма видами бульбочкових бактерій, включаючи *B. japonicum* [10, 19].

На коренях усіх досліджуваних рослин утворювалась значна кількість бульбочок, серологічний аналіз яких засвідчив, що сформована ґрунтова популяція мікосимбіонтів сої є різномірною. Окрім ризобій з інтенсивним ростом серогрупи KB11, вона включає не виявлені у симбіозі із соєю бульбочкові бактерії серогруп M8, 46 та 6346, що відповідає переліку внесених штамів-інтродуцентів (табл. 2).

Таблиця 2

Здатність представників ґрунтової популяції бульбочкових бактерій сої колонізувати корені різних бобових рослин (польовий дослід, ІСМАВ НААН, 2012 р.)

Рослина-пастка	Частка штамів бульбочкових бактерій у бульбочках, %				
	KB11	46	M8	6346	Інші*
Со́я (<i>Glycine max</i>)	100,0	0	0	0	0
Вигна (<i>Vigna unguiculata</i>)	12,5	12,5	58,3	2,1	14,6
Маш (<i>Vigna radiata</i>)	22,9	0	39,6	0	37,5
Квасо́ля адзукі (<i>Vigna angularis</i>)	41,7	3,1	4,2	0	51,1

Примітка. * – бульбочкові бактерії сої не віднесені до досліджуваних серогруп.

Найбільш чутливою до інфікування ризобіями виявилась вигна китайська. У бульбочках на її коренях ідентифіковано всі досліджувані штами, домінуючим серед них був штам *B. japonicum* M8, який утворював 58,3% бульбочок. Рослини машу утворювали симбіоз із наявними у ґрунті штамми *B. japonicum* KB11 (22,9%) та *B. japonicum* M8 (39,6%). У бульбочках, утворених на коренях квасолі адзукі, у мінорних кількостях (3,1% і 4,2%) виявлено повільнорослі штами *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* M8. Крім того, усі рослини формували симбіоз зі штамом з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11 (12,5–41,7% бульбочок), а також із ризобіями, які не віднесені до досліджуваних серологічних груп (14,6–51,1% бульбочок). На нашу думку, неідентифіковані

мікросимбіонти можуть бути представниками інших видів бульбочкових бактерій, які здатні вступати у симбіотичні взаємовідносини з рослинами роду *Vigna*.

Отже, вирощування на дослідному полі різних видів вигни дозволило виявити у ґрунті сапрофітні повільнорослі штами *B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* 6346, інтродуковані в агроценоз у перший рік експерименту.

Для більш детальної характеристики бульбочкових бактерій, які вступали у симбіотичні взаємовідносини з рослинами вигни, машу та квасолі адзукі, із бульбочок цих культур отримано 32 ізоляти. За морфолого-культуральними властивостями (формою клітин, розміром колоній та швидкістю росту на агаризованому бобовому середовищі з манітом, ростом на МПА та молоці з лакмусом) виділені бульбочкові бактерії віднесені до роду *Bradyrhizobium*.

Вивчення серологічних властивостей отриманих ізолятів показало, що більшість з них (26 од.) позитивно реагували зі специфічними антисироватками до штамів *B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* KB11, що засвідчує їх спорідненість з бульбочковими бактеріями сої (табл. 3). Загалом розподіл досліджуваних ізолятів ризобій на серогрупи відповідав розподілу штамів *B. japonicum* з повільним та інтенсивним ростом у бульбочках різних видів вигни.

Симбіотичні взаємовідносини ізолятів бульбочкових бактерій з рослинами сої ми вивчали за умов вегетаційного дослідження на стерильному вермикуліті. Як видно з даних табл. 3, усі серологічно подібні до ризобій сої ізоляти сприяли формуванню активних бульбочок на коренях рослин. Лише 6 досліджуваних мікросимбіонтів вигни не спроможні були інфікувати сою.

Таблиця 3

Характеристика ризобій, виділених із бульбочок вигни китайської, машу та квасолі адзукі (вегетаційний дослід, вермикуліт)

Рослина-господар	Кількість виділених ізолятів, од.	Належність ізолятів (од.) до серогрупи:					Симбіотичний фенотип у взаємодії з <i>G. max</i> (кількість ізолятів, од.)
		KB11	46	M8	6346	Інші*	
Вигна китайська (<i>Vigna radiata</i>)	12	1	2	7	0	2	Nod ⁺ Fix ⁺ (10)
Маш (<i>Vigna unguiculata</i>)	12	4	0	5	0	1	Nod ⁺ Fix ⁺ (11)
Квасоля адзукі (<i>Vigna angularis</i>)	8	3	1	1	0	3	Nod ⁺ Fix ⁺ (5)

Примітки: * – бульбочкові бактерії сої не віднесені до відомих серогруп;

Nod⁺Fix⁺ – утворення азотфіксувальних бульбочок.

Для ідентифікації бульбочкових бактерій, виділених із бульбочок машу, нами проведено філогенетичний аналіз на основі міжгенної ділянки 16S-23S рПНК (ITS-регіон), яка дозволяє розрізняти мікроорганізми на внутрішньовидовому рівні (табл. 4).

За результатами сиквенсу послідовностей ITS-регіону досліджувані ізоляти *Bradyrhizobium* sp. KM1, *Bradyrhizobium* sp. KM2 і *Bradyrhizobium* sp. KM3 показали високий рівень ідентичності (99,6–99,8%) зі

штамом *B. japonicum* USDA 4, депонованим у GenBank, а також з іншими штамми бульбочкових бактерій сої (99,4–99,7%): *B. japonicum* CCBAU 05185, *B. japonicum* MSDJ 5570 та *B. japonicum* SAY3-7. Найвищий рівень гомології ізолятів (99,9–100,0%) відмічено із селекціонованим нами штамом *B. japonicum* KC23, який належить до генетичної групи USDA 4, а також є представником серологічної групи M8.

Таблиця 4

Ідентичність нуклеотидних послідовностей міжгенного регіону 16S-23S рРНК ізолятів ризобій із бульбочок машу з ITS-послідовностями штамів *B. japonicum*

Номер ізоляту (рослина-господар)	Референс-штами <i>B. japonicum</i> (номер у нуклеотидній базі GenBank)	Ідентичність ITS послідовностей, %
<i>Bradyrhizobium</i> sp. KM1 (<i>Vigna radiata</i>)	<i>B. japonicum</i> USDA 4 (AF208515)	99,8
	<i>B. japonicum</i> CCBAU 05185 (EU418355)	99,4
	<i>B. japonicum</i> KC23	100,0
<i>Bradyrhizobium</i> sp. KM2 (<i>Vigna radiata</i>)	<i>B. japonicum</i> USDA 4 (AF208515)	99,8
	<i>B. japonicum</i> MSDJ 5570 (AF338840)	99,6
	<i>B. japonicum</i> SAY3-7 (LC037300)	99,7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. KM3 (<i>Vigna radiata</i>)	<i>B. japonicum</i> KC23	100,0
	<i>B. japonicum</i> USDA 4 (AF208515)	99,6
	<i>B. japonicum</i> MSDJ 5570 (AF338840)	99,6
	<i>B. japonicum</i> KC23	99,9

Виходячи із зазначеного вище, з високою долею ймовірності можна стверджувати, що отримані нами ізоляти походять від штаму-інокулянту *B. japonicum* M8, інтродукованого у ґрунт на початку експерименту.

Обговорення. Відомо, що приживаність бульбочкових бактерій у ґрунті залежить від багатьох факторів: гідротермічних умов середовища, доступності елементів мінерального живлення, екологічної пластичності самих інтродуцентів та ін. [1]. Значний вплив на виживання ризобій мають рослини-господарі, які здатні віддавати перевагу певним штамом у популяціях [20]. Водночас рівень вибірковості щодо мікосимбіонтів може значно варіювати залежно від виду або сорту рослин.

Проведений нами моніторинг інтродукованих у ґрунт штамів *B. japonicum* показав, що за вирощування сої у монокультурі відбувалось поступове витіснення штамом з інтенсивним ростом повільнорослих ризобій із бульбочкових популяцій. Вже на четвертий-п'ятий роки експерименту 100,0% бульбочок на коренях рослин формували лише штам з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11. Повільнорослі бульбочкові бактерії *B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* 6346 були неспроможні інфікувати сою. Отримані дані узгоджуються із численними літературними повідомленнями про те, що штамми-інокулянти часто не вдається виділити із бульбочок вже через 2-3 роки після їх інтродукції в агроценози [1, 21]. У роботі Bromfield E. із співавт. зазначається, що частоти деяких генотипів *Sinorhizobium meliloti* у двох популяціях ризобій, виділених із бульбочок та безпосередньо із ґрунту, істотно відрізняються [22].

На нашу думку, домінування штаму з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11 у бульбочкових популяціях сої зумовлено його розширеними екологічними можливостями: підвищеною сапрофітною компетентністю, рухливістю, що дозволяє штаму успішно колонізувати кореневу систему рослин, здатністю конкурувати з іншими ризобіями за сайти зв'язування [23]. Крім того, на закріплення зазначеного штаму у мікробному ценозі значний вплив мало збільшення його чисельності у ґрунті внаслідок періодичного виходу бактерій із симбіотичних ніш (зруйнованих бульбочок).

Проте, незважаючи на відсутність повільнорослих штамів *B. japonicum* у бульбочках, вони зберігались у ґрунті протягом п'яти років. Виявити їх вдалося лише за використання рослин-пасток (різних видів вигни), які відбирали досліджувані штами із ґрунту і вступали з ними у симбіотичні взаємовідносини, утворюючи на коренях численні бульбочки. Наявність повільнорослих штамів *B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* 6346 у бульбочкових популяціях вигни китайської, машу та квасолі адзукі доведена мікробіологічними, серологічними та молекулярно-генетичними методами.

Здатність рослин роду *Vigna* взаємодіяти з різними штамами ризобій сої, присутніми в ґрунтовій популяції, можна пояснити їх симбіотичними властивостями, а саме сумісністю з широким колом мікросимбіонтів [19, 24]. Крім того, у попередніх дослідженнях нами встановлено, що штам з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11 формує з вигною китайською неактивний симбіоз із низьким рівнем азотфіксації. Можливо, саме тому зазначений штам не є домінуючим у корневих бульбочках вигни.

Таким чином, за використання рослин-пасток з широким спектром хазяйської специфічності досліджена приживаність у ґрунті та симбіотична активність виробничих штамів бульбочкових бактерій сої. Одержані результати фенотипових та генотипових досліджень свідчать, що інтродуковані у агроценоз штами ризобій сої з різною швидкістю росту здатні зберігатись у ґрунті протягом тривалого часу. Вони займають свою екологічну нішу у місцевому ризобіальному угрупованні, але мають різні стратегії існування *ex planta* та *in planta*.

Домінуючим мікросимбіонтом сої виявився штам з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11, який на четвертий рік вирощування рослини-господаря у монокультурі повністю витіснив повільнорослі ризобії (*B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* 6346) з бульбочкових популяцій. Зазначені штами не формували симбіоз із соєю, однак існували у ґрунті як вільноіснуючі гетеротрофи. Їх присутність виявлена лише за вирощування різних видів вигни, які вступали з інтродукованими мікроорганізмами у симбіотичні взаємовідносини.

Подальші дослідження приживаності штамів *B. japonicum* у різних ґрунтах та за різних способів вирощування сої дозволять глибше розкрити особливості формування та функціонування популяцій специфічних бульбочкових бактерій.

ПРИЖИВАЕМОСТЬ ШТАММОВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* В ПОЧВЕ ПРИ ИХ ИНТРОДУКЦИИ В АГРОЦЕНОЗ СОИ

Д.В. Крутило

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

Резюме

Цель. Оценить способность штаммов *Bradyrhizobium japonicum* с медленным и интенсивным ростом приживаться в почве и длительное время сохранять симбиотическую активность. **Методы.** Приживаемость штаммов-инокулянтов в почве изучали в полевых опытах с соей (*Glycine max* (L.) Merr.). Как растения-ловушки для ризобий сои применяли вигну китайскую (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), маш (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) и фасоль адзуки (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Наличие исследуемых штаммов в клубеньках определяли в реакции агглютинации с использованием специфических антисывороток. Морфолого-культуральные свойства изолятов клубеньковых бактерий изучали в соответствии с общепринятыми методиками. Секвенирование 16S-23S рДНК ризобий осуществляли на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI 3130 Genetic Analyser. **Результаты.** Штаммы *B. japonicum* с разной скоростью роста были интродуцированы в агроценоз сои в первый год эксперимента. При выращивании сои в монокультуре наблюдалось постепенное вытеснение штаммом с интенсивным ростом *B. japonicum* KB11 медленнорастущих ризобий (*B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 и *B. japonicum* 6346) из клубеньковых популяций. На четвертый год исследования указанные штаммы отсутствовали в клубеньках сои, однако сохранялись в почве как сапрофитные микроорганизмы. Их присутствие обнаружено при использовании растений-ловушек, которые вступали с исследованными микроорганизмами в симбиотические взаимоотношения. Доля штаммов с медленным ростом в клубеньках различных видов вигны колебалась в пределах от 2,1 до 58,3%. Наличие медленнорастущих штаммов в клубеньковых популяциях вигны китайской, маша и фасоли адзуки доказано микробиологическими, серологическими (принадлежность к серогруппам 46, M8, 6346) и молекулярно-генетическими методами. По результатам сиквенса последовательностей ITS-региона ризобии из клубеньков маша показали 99,4–99,8% идентичности со штаммами *B. japonicum*, депонированными в GenBank. Наивысший уровень гомологии (99,9–100,0%) отмечен со штаммом *B. japonicum* KC23, который является типичным представителем серологической группы M8. **Выводы.** Интродуцированные в агроценоз сои штаммы *B. japonicum* с медленным и интенсивным ростом сохраняются в почве длительное время. Они занимают свою экологическую нишу в местном ризобияльном сообществе, но имеют разные стратегии существования *ex planta* и *in planta*. В течение пяти лет соотношение исследуемых штаммов в клубеньковых популяциях сои существенно меняется: от наличия всех штаммов в клубеньках до полного доминирования штамма с интенсивным ростом *B. japonicum* KB11 и перехода медленнорастущих ризобий к сапрофитному существованию.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, изоляты, растение-ловушка, 16S-23S рДНК, соя, вигна, маш, фасоль адзуки.

SURVIVAL OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS IN SOIL AT THEIR INTRODUCTION INTO SOYBEAN AGROCENOSIS

D.V. Krutylo

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

Summary

Objective. The objective of our work was to assess the ability of *Bradyrhizobium japonicum* strains with slow and intensive growth rate to survive in the soil and maintain their symbiotic activity for a long time. **Methods.** The survival of inoculum strains in the soil has been studied in the field experiments with soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). The cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and adzuki beans (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) were used as trap plants for soybean rhizobia. The presence of studied strains in the nodules was determined in reaction of agglutination with specific antisera. Morphological and cultural properties of isolated rhizobia were studied by generally accepted methods. Sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer of rhizobia was performed on ABI 3130 Genetic Analyzer. **Results.** The *B. japonicum* strains with different growth rates were introduced into soybean agrocenosis in the first year of experiment. When soybean was grown in monoculture, gradual replacement of slow-growing rhizobia (*B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 and *B. japonicum* 634b) from nodule populations by strain with intensive growth rate *B. japonicum* KB11 was observed. At the 4th year of the studies, these strains were absent in the soybean nodule, however they remained in the soil as saprophytic microorganisms. Their presence was detected using trap plants, which had symbiotic relationships with the studied microorganisms. The proportion of strains with slow growth rate in the nodules of different cowpea species ranged from 2.1 to 58.3 %. The presence of slow-growing strains in nodule populations of cowpea, mung bean and adzuki bean is proved by microbiological, serological (belonging to serogroups 46, M8, 634b) and molecular genetic methods. The rhizobia from mung bean nodules showed 99.4-99.8 % identity to *B. japonicum* strains (from GenBank) based on nucleotide sequences of ITS region. The highest level of homology (99.9-100.0 %) was noted with *B. japonicum* KC23 strain, which is a typical representative of the serogroup M8. **Conclusion.** The strains of *B. japonicum* with slow and intensive growth rates introduced in soybean agrocenosis persist in the soil for a long time. They occupy their ecological niche in the local rhizobial population, however they have different *ex planta* and *in planta* strategies. Within five years, the ratio of studied strains in the nodule populations has been significantly changed: from the presence of all strains in the nodules to complete dominance of *B. japonicum* KB11 strain with intensive growth rates and the transition of slow-growing rhizobia to saprophytic existence.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*, isolates, trap-host, 16S-23S rDNA, soybean, cowpea, mung bean, adzuki bean.

1. Spaink HP, 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. Russian.
2. Kots SYa, Morgun VV, Patyka VF et al. [Biological nitrogen fixation: legume-rhizobial symbiosis]. Kiev.: Logos; 2011;(2). Russian.
3. Patyka VF, Krutylo DV, Kovalevska TM. [Effect of aboriginal populations of soybean nodule bacteria on symbiotic activity of introduced strain *Bradyrhizobium japonicum* 634b]. Mikrobiol Z. 2004; 66(3):14–21. Ukrainian.
4. Provorov NA. [Evolution of plant-microbial symbioses: phylogenetic, population, genetic and selection aspects]. Thesis for the degree of doctor of biological sciences by speciality 03.00.15 – genetic. St.-Petersburg, 2009. Russian.
5. Sullivan JT, Eardly BD, van Berkum P, Ronson CW. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. Appl Environ Microbiol. 1996; 62:2818–2825.
6. Sanginga N, Danso SKA, Mulongoy K, Ojeifo AA. Persistence and recovery of introduced *Rhizobium* ten years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an Alfisol in southwestern Nigeria. Plant Soil. 1994; 159:199–204.
7. Krutylo DV, Nadkernychna OV, Kovalevska TM, Patyka VP. [Biological diversity of soybean nodule bacteria in soils of Ukraine]. Mikrobiol Z. 2008; 70(6):27–34. Ukrainian.
8. Krutylo DV, Zotov VS. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine. Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2015; 5(2):102–109. <https://doi.org/10.1134/S2079059715020057>.
9. Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. 1968; 43(8):1185–1207. <https://doi.org/10.1134/S207905971502005710.1104/pp.43.8.1185>.
10. Silva FV, Simões-Araújo JL, Silva Júnior JP, Xavier GR, Rumjanek NG. Genetic diversity of Rhizobia isolates from Amazon soils using cowpea (*Vigna unguiculata*) as trap plant. Brazil J Microbiol. 2012; 43:682–691. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200033>.
11. Kebot E, Meyer B. [Experimental immunology]. Moskva: Medicina Publ.; 1968. Russian.
12. Krutylo DV, Volkova IV. [Serological diversity of soybean nodule bacteria in Ukraine soils]. Agroecological journal. 2012; 4:66–71. Ukrainian.
13. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part A + B + C. [eds. DJ. Brenner, NR. Krieg, JT. Staley. Editor-in-chief G.M. Garrity]. New York, NY: Springer SBM, 2nd ed., 2005. (2). 2800 p.
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. Beringer JE. R1 transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 1974; 84:188-198. <https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188>.
16. Normand P, Ponsonnet C, Nesme X et al. ITS analysis of prokaryotes. Mol. Microbial Ecology Manual. 1996; 5(3–4):1–12.
17. Ponsonnet C, Nesme X. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Arch Microbiol. 1994; 161:300–309.

18. Dospikhov BA. [Field Experience Method]. Moskow: Agropromizdat; 1985. Russian.
19. Tampakaki AP, Fotiadis CT, Ntatsi G, Savvas D. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. *Syst Appl Microbiol*. 2017; 40:179–189. <https://doi.org/10.1016/j.syam.2017.01.001>.
20. Brunel B, Rome S, Ziani R, Cleyet-Marel JC. Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual species of Medicago. *FEMS Microbiol Ecol*. 1996; 19:71–82. [https://doi.org/10.1016/0168-6496\(95\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0168-6496(95)00076-3).
21. Vlassak K, Vanderleyden J, Franco A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biol Fertil Soils*. 1996; 21:61–68.
22. Bromfield E.S.P., Barran L.R., Wheatcroft R. Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). *Mol. Ecol*. 1995; 4:183–188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00207.x>.
23. Krutylo DV. [Symbiotic relationship between *Bradyrhizobium japonicum* strains of different genetic groups and soybean plants]. *Mikrobiol Z*. 2017; 79(6):82–94. Ukrainian. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.06.082>.
24. Mpeperek S, Wollum AG, Makonese F. Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soil. *Plant Soil*. 1996; 186:167–171.

Отримано 20.02.2018