



УДК 581.557:631

ЕФЕКТИВНІСТЬ СИМБІОЗУ РОСЛИН СОЇ З TN5-МУТАНТАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* 646

В. П. Заболотна¹, С. Я. Коць², С. М. Маліченко²

¹Кременецький обласний гуманітарно-педагогічний інститут імені Тараса Шевченка
вул. Лицейна, 1, Кременець, Тернопільська обл. 47003, Україна
e-mail: virazabolotna@yandex.ua

²Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17, Київ 03022, Україна

В умовах польового дослідження вивчали утворення кореневих бульбочок, наростання їх маси, формування урожаю та його структуру в сої сорту Мар'яна, інокульованої Tn5-мутантами, створеними за допомогою транспозонового мутагенезу з використанням плазмиди pSUP2021. Встановлено, що досліджувані транспозонові мутанти впливали на формування симбіотичного апарату сої специфічно: Tn5-мутант 17–2 відзначався найвищою нодуляційною здатністю, 31–2 сформував найбільшу біомасу бульбочок, а 9–2 характеризувався найвищими загальною та питомою азотфіксувальними активностями. Інокуляція насіння транспозоновими мутантами 9–1, 9–2, 17–2 і 33–2 викликала збільшення насінневої продуктивності порівняно з інокуляцією виробничим штамом 634б. Усі Tn5-мутанти призвели до підвищення урожаю насіння порівняно з виробничим штамом 634б, а мутанти 9–2, 17–2 та 33–2 і порівняно з вихідним штамом 646. Бактеризація насіння високоактивними транспозоновими мутантами 9–2 і 17–2 забезпечувала найбільший приріст урожаю сої порівняно з контролем. Ці Tn5-мутанти можуть у перспективі бути вихідним матеріалом для подальшої селекції виробничих штамів бульбочкових бактерій сої.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутант, симбіоз, азотфіксувальна активність, урожайність.

ВСТУП

Соя належить до найважливіших культур світового землеробства і є найперспективнішою серед зернобобових рослин. За обсягами виробництва і використання вона в декілька разів перевищує всі разом узяті однорічні зернобобові рослини та займає провідне місце у світі серед високобілкових і олійних культур. Насіння сої містить 38–42 % білка, 18–23 % жиру, 25–30 % вуглеводів, а також ферменти, вітаміни, мінеральні речовини. Особливо слід підкреслити високу здатність її до симбіотичної азотфіксації: в умовах України соя може засвоювати з повітря 70–280 кг/га азоту за вегетаційний період [20, 21].

Отримання максимальних урожаїв сої за мінімальних матеріальних і енергетичних затрат можливе за умови інтенсифікації процесу симбіотичного зв'язування

рослинами азоту атмосфери і їх здатності формувати високоактивні симбіотичні азотфіксувальні системи з ризобіями [18]. Для створення ефективної симбіотичної системи ризобії–соєа необхідний ретельний добір симбіотичних партнерів, який потребує постійного поновлення сортів сої та штамів бульбочкових бактерій. Максимальна реалізація потенціалу соєво-ризобіальних систем можлива за наявності генетичної комплементарності мікро- та макросимбіонтів [11].

Останнім часом створені сорти сої, які, за умов інокуляції препаратами бульбочкових бактерій, забезпечують отримання високих урожаїв насіння. Якість таких препаратів постійно покращується заміною існуючих ризобій на більш конкурентоздатні й ефективні у симбіозі. Зазвичай, у разі отримання нових штамів бактерій із покращеними симбіотичними властивостями користуються методами аналітичної селекції [1], які ґрунтуються на відбиранні бактерій із природних популяцій і подальшому їх тестуванні на інтенсивність азотфіксації, вірулентність, конкурентоздатність тощо. Проте за ефективністю штами ризобій, отримані цими методами, перевищували вихідні не більше, ніж на 15–20 % [1, 3, 4, 23].

Вирішити цю проблему можна використовуючи метод транспозонового мутагенезу [6, 12, 24], в основі якого лежить здатність генетичних елементів – транспозонів (*Tn*) – вбудовуватися в ген-мішень, інактивувати його і мітити маркером стійкості до антибіотика, спричиняючи поодинокі генетичні зміни [5, 10, 14]. Як вихідний матеріал для таких мутантів використовують високоактивні штами ризобій, одержані спочатку в результаті аналітичної, а згодом і мутаційної селекції.

На сьогоднішній день більшість робіт із вивчення ефективності *Tn5*-мутантів виконана з використанням швидкорослих ризобій, зокрема *Sinorhizobium meliloti* [12, 17]. Стосовно *Tn5*-мутантів повільнорослих бульбочкових бактерій, а саме *Bradyrhizobium japonicum*, то таких робіт є небагато і майже всі вони виконані за кордоном [2, 19, 25]. Вважають [12], що дослідження *Tn5*-мутантів ризобій сої може бути одним із напрямів отримання активних штамів бульбочкових бактерій і виготовлення на їх основі бактеріальних добрив, які б забезпечували максимальну фіксацію біологічного азоту й отримання екологічно чистої продукції.

Метою нашої роботи було дослідити формування і функціонування симбіотичних систем сої з транспозоновими мутантами *B. japonicum* і відібрати найефективніші з мутантів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Польові досліди проводились на агробіостанціонарі Кременецького обласного гуманітарно-педагогічного інституту імені Тараса Шевченка. Об'єктом дослідження була соя культурна (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Мар'яна спільної селекції Інституту фізіології рослин і генетики (ІФРГ) НАН України, Селекційно-генетичного інституту й Інституту землеробства УААН. У роботі використовували повільнорослі бактерії *B. japonicum* виробничого штаму 6346 та штаму 646, отримані з музейної колекції культур мікроорганізмів ІФРГ НАН України, а також активні *Tn5*-мутанти штаму 646: 9–1, 9–2, 17–2, 31–2 і 33–2, отримані у відділі симбіотичної азотфіксації цього ж інституту за методом Новикової зі співавт. [16], пристосованим для повільнорослих бульбочкових бактерій сої, за допомогою плазміди *pSUP2021* [26].

Перед висіванням насіння стерилізували 10 хв 70%-ним етанолом, після чого 1 год промивали проточною водою. Інокуляцію насіння здійснювали зволоженням його суспензіями бульбочкових бактерій. Культури повільнорослих бульбочкових бактерій вирощені на манітно-дріжджовому агарі (МДА) з подальшим інкубуванням

у термостаті при температурі 28 °С упродовж 6–7 діб [6]. Склад поживного середовища, г/л: K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,1; маніт – 10,0; дріжджовий екстракт – 0,5; агар – 15,0–17,0; дистильована вода; рН 6,8–7,0. Свіжоприготовлену поживну суміш стерилізували 30 хв при тиску 1 атм. Під час виготовлення бактеріальної суспензії біомасу клітин з поверхні МДА змивали стерильною водою. Бактеріальний титр суспензій – 9×10^9 клітин/мл [14]. Тривалість інкубації насіння з бульбочковими бактеріями – 1 год.

Для порівняння ефективності інокуляції штамми і Тп5-мутантами бульбочкових бактерій сої була вибрана земельна ділянка, на якій дана культура ніколи не вирощувалася. Досліди закладали за такою схемою: на першій ділянці висівали насіння, інокульоване ризобіями виробничого штаму 6346, на другій – вихідного штаму 646, на третій–сьомій – Тп5-мутантами штаму 646: 9–1, 9–2, 17–2, 31–2, 33–2 відповідно. Контролем слугував виробничий штам 6346.

Сою висівали широкорядним способом із шириною міжрядь 45 см; глибина загортання насіння – 4–5 см. Норма висіву – 80 кг/га. Повторність дослідів – 4-кратна, площа облікових ділянок 5 м². Розміщення дослідних ділянок довільне.

Протягом онтогенезу здійснювали фенологічні спостереження за ростом і розвитком рослин. Відбір рослин для дослідження формування симбіотичного апарату і процесу азотфіксації проводили у фазу бутонізації—початку цвітіння. Для визначення кількості й маси бульбочок відбирали моноліти ґрунту 25×25×30 см. Після відмивання коренів бульбочки відокремлювали, підраховували їхню кількість і зважували. У цьому разі з кожного варіанта брали по 5 рослин.

Активність процесу азотфіксації визначали модифікованим методом Харді [9, 13]. При цьому корені з бульбочками вміщували у скляні флакони, що герметично закривалися, в яких створювали 10%-ну концентрацію етилену. Тривалість інкубації 1 год. Після експозиції газову суміш аналізували на газовому хроматографі “Chromatograf-504” (Польща) з полуменево-іонізаційним детектором.

Насіннєву продуктивність і масу 1000 зерен визначали за Мойсейченком [15]. Облік урожаю проводили суцільним способом з усієї облікової площі з подальшим перерахунком на гектарну площу.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснено за Доспєховим [8].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Для створення симбіотичних систем і дослідження їх ефективності ми проводили інокуляцію сої відібраними в результаті первинного скринінгу транспозоновими мутантами *B. japonicum* штаму 646. Ефективність симбіотичних систем, утворених Тп5-мутантами сої, оцінювали за кількістю і масою утворених кореневих бульбочок, їх розміщенням на головному і боковому коренях, здатністю рослин до фіксації молекулярного азоту й урожайністю насіння.

Спостереження за формуванням симбіотичного апарату сої показали, що рослини, вирощені з насіння, інокульованого транспозоновими мутантами, формували різну кількість бульбочок, однак розміщувалися вони переважно вздовж головного кореня рослин або у верхній його частині, що характеризує ефективний симбіоз.

Встановлено, що отримані методом транспозонового мутагенезу Тп5-мутанти *B. japonicum* суттєво відрізнялися за своїми характеристиками. Так, підрахунок кількості ризобіальних наростів у фазі бутонізації—початку цвітіння показав, що серед досліджуваних Тп5-мутантів найбільш вірулентним виявився 17–2: інокуляція цим транспозоновим мутантом призвела до збільшення загальної кількості бульбочок

порівняно з виробничим 6346 і вихідним 646 штамми *B. japonicum* (табл. 1). Тп5-мутанти 33–2, 31–2 та 9–2 характеризувалися дещо нижчою нодуляційною здатністю. Мутант 9–1 ініціював утворення кореневих бульбочок найслабше — його нодуляційна активність була нижчою, ніж у контрольному варіанті та варіанті з інокуляцією вихідним штамом 646 (приблизно на 74,4 % та 59,9 % відповідно), що може свідчити про його низьку вірулентність. Як відомо, вірулентність ризобій та їх мутантів є одним із показників ефективності бобово-ризобіального симбіозу, однак лише деякі гени вірулентності є спільними для всіх видів ризобій, більшість із них є видо- або штамоспецифічні: вони контролюють структурні модифікації Nod-факторів, що визначають специфічність їх морфогенетичної дії на рослину [26]. Очевидно, що зміни нодуляційної активності досліджуваних Тп5-мутантів стосовно рослини-господаря викликані саме мутаціями їх генів вірулентності.

Таблиця 1. Кількість, маса й азотфіксувальна активність бульбочок сої сорту Мар'яна, інокульованої Тп5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*

Table 1. Amount, mass and nitrogen fixing activity of root nodules of soybean cultivar Mariana inoculated by Тп5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum*

Варіант	Кількість бульбочок, шт.	Маса бульбочок, г	Загальна азотофіксувальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /((рослину × год)	Питома азотофіксувальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /(г×год)
Штам				
6346 (контроль)	64,0±1,9	1,38±0,02	5,76±0,42	4,16±0,07
646 (вихідний)	58,7±,7*	1,26±0,03*	10,71±0,62*	8,47±0,30*
Тп5-мутант				
9–1	36,7±0,5*	0,98±0,02*	8,78±0,27*	8,98±0,15*
9–2	56,0±1,8*	1,81±0,03*	14,34± 0,45*	7,91±0,27*
17–2	66,3±2,2	1,95±0,03*	8,27±1,04*	4,23±0,12
31–2	57,0±1,8*	2,42±0,04*	11,79±0,51*	4,87±0,15*
33–2	62,3±0,4	2,22±0,05*	9,34±0,32*	4,21±0,21

Примітка. * У цій таблиці й у наступних різниця порівняно з контролем достовірна за $P < 0,05$.

Comment. * In this and following tables the difference compared with control is reliable at $P < 0.05$.

Показником ефективної взаємодії рослини і ризобій є також маса активних бульбочок на коренях бобових [7] — вона характеризує здатність бобово-ризобіальних систем до інтенсивної фіксації атмосферного азоту. За цим показником чотири Тп5-мутанти (9–2, 17–2, 31–2 і 33–2) суттєво перевищували виробничий 6346 та вихідний 646 штамми. Винятком був Тп5-мутант 9–1, який викликав утворення дрібних бульбочок із незначною масою.

Найважливішим критерієм оцінки бобово-ризобіального симбіозу є азотфіксувальна активність кореневих бульбочок бобової рослини [7, 11]. Нами встановлено, що всі транспозонові мутанти підвищували загальну азотфіксувальну активність (ЗАФА) сої порівняно з виробничим штамом 6346, однак тільки Тп5-мутанти 31–2 і 9–2 порівняно з вихідним штамом 646. У результаті дослідження ЗАФА сої попередньо встановлено [12], що лише 19 % Тп5-мутантів здатні забезпечувати більшу азотфіксувальну активність сої порівняно з вихідним штамом. Очевидним стає той факт, що в результаті транспозонового мутагенезу отримали мутанти бульбочкових бактерій із розширеним спектром варіювання азотфіксувальної активності.

Найбільше зростання ЗАФА зафіксовано у варіанті з інокуляцією насіння Тп5-мутантом 9–2. Встановлено, що між нодуляційною здатністю бульбочкових бактерій і їх азотфіксувальною активністю не завжди існує прямий зв'язок. Підтвердженням цього є дані, отримані під час інокуляції рослин високовірulentними Тп5-мутантами 33–2 та 17–2, які формували велику кількість бульбочок, однак їх ЗАФА була відповідно на 14,7 і 29,5 % нижчою, ніж ЗАФА бульбочок, які утворив вихідний штам 646.

Стосовно питомої азотофіксувальної активності (ПАФА), то використання для бактеризації Тп5-мутантів 9–2, 9–1 призвело до її підвищення відповідно в 1,9–2,1 разу порівняно з бактеризацією виробничим штамом 6346. Незважаючи на значну масу бульбочок у варіантах з інокуляцією насіння Тп5-мутантами 17–2, 31–2 та 33–2, ПАФА сої цих варіантів була невисокою, що свідчить про низьку активність корневих бульбочок у цей період.

У процесі дослідження насінневої продуктивності сої виявилось, що найбільша кількість плодів утворилася на рослинах у варіанті з інокуляцією транспозоновим мутантом 17–2, а найменша – виробничим штамом 6346 (табл. 2). Щодо кількості насінин у бобі, то передпосівна інокуляція насіння як бактеріями вихідного штаму 646, так і всіма транспозоновими мутантами, сприяла формуванню насінин у бобі порівняно з контролем. Необхідно також відзначити, що більшість транспозонових мутантів (17–2, 31–2 і 33–2) сформували таку ж кількість насінин у плоді, як і вихідний штам 646. Найбільшу масу мало насіння у сої, інокульованої Тп5-мутантами 9–2, 33–2 та 17–2: маса 1000 насінин рослин цих варіантів відповідно на 8,5, 8,7 та 11,8 % перевищувала масу такої ж кількості насінин рослин контрольного варіанта. У рослин, інокульованих мутантом 31–2, насіння було дрібне і його маса була значно меншою, ніж в інших варіантах.

Таблиця 2. Насіннева продуктивність сої сорту Мар'яна, інокульованої Тп5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*

Table 2. Seeds productivity of soybean cultivar Mariana inoculated by Tn5-mutants *Bradyrhizobium japonicum*

Варіант	Кількість бобів на рослині, шт.	Кількість насінин у бобі, шт.	Маса 1000 насінин, г
Штам			
6346 (контроль)	23,0±0,6	2,0±0,01	166,2±2,83
646 (вихідний)	24,0±0,2*	2,3±0,06*	168,4±1,34
Тп5-мутант			
9–1	27,7±1,0*	2,2±0,04*	170,1±1,86
9–2	28,3±0,3*	2,1±0,01*	180,4±2,93*
17–2	29,0±0,3*	2,3±0,07*	185,8±2,35*
31–2	27,3±0,5*	2,3±0,02*	140,4±1,46*
33–2	24,3±0,7	2,3±0,04*	180,7±3,38*

Інтегральним показником впливу штамів бульбочкових бактерій і їх мутантів на розвиток рослин є урожайність рослин. Достовірний, порівняно з контролем, приріст урожаю насіння сої отримано в результаті її передпосівної інокуляції як вихідним штамом 646, так і всіма транспозоновими мутантами (табл. 3). Однак потрібно відзначити, що інокуляція лише чотирма з п'яти досліджуваних Тп5-мутантів призвела до суттєвого підвищення урожаю насіння (на 15,77–21,15 %) порівняно з вихідним штамом, що обумовлено жорсткішим контролем цього показника генотипом

рослини-господаря. Тільки за умови високоефективного партнерства макро- і мікросимбіонта і внаслідок посилення ряду фізіолого-біохімічних процесів активізуються ростові процеси та формування урожаю насіння.

Таблиця 3. Урожайність насіння сої сорту Мар'яна, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*

Table 3. Crop yield of seeds of soybeans cultivar Mariana inoculated by Tn5-mutants *Bradyrhizobium japonicum*

Варіант	Урожай насіння, ц/га	Приріст урожаю			
		до контролю		до вихідного штаму	
		ц/га	%	ц/га	%
Штам					
6346 (контроль)	15,6±0,43	–	–	– 2,4	–15,38
646 (вихідний)	18,0±0,22 ⁺	+ 2,4	+ 15,38	–	–
Тп5-мутант					
9–1	18,2±0,39 ⁺	+ 2,6	+ 16,77	+ 0,2	+1,1
9–2	18,8±0,19 ⁺	+ 3,2	+ 20,51	+ 0,8	+ 4,4
17–2	18,9±0,23 ⁺	+ 3,3	+ 21,15	+ 0,9	+ 5,0
31–2	16,8±0,20 ⁺	+ 1,2	+ 7,69	– 1,2	– 6,7
33–2	18,3±0,26 ⁺	+ 2,7	+ 17,31	+ 0,3	+ 1,7

Найвищий урожай отримано в результаті інокуляції рослин Tn5-мутантами 9–2 та 17–2. Ці мутанти суттєво (на 14,7 та 20,9 % відповідно) підвищували насіннєву продуктивність сої і в інших регіонах [12].

ВИСНОВОК

Отже, нами були створені різні за ефективністю симбіотичні системи сої з Tn5-мутантами *B. japonicum* штаму 646. Встановлено, що отримані методом транспозонного мутагенезу Tn5-мутанти *B. japonicum* суттєво відрізнялися за своїми характеристиками. Нами відмічено Tn5-мутант 9–2, який суттєво підвищував азотфіксувальну активність і урожайність насіння сої. Саме цей мутант, а також Tn5-мутант 17–2, інокуляція яким призвела до формування найбільшого урожаю насіння сої, є перспективним вихідним матеріалом для подальшої селекції виробничих штамів бульбочкових бактерій.

1. Antypchuk A.F., Rangelova V.N., Skochynskaya N.N. et al. Using of different indexes for the estimation of efficiency of nodule bacteria. **Microbiol. Zhurn**, 1985, 47(4): 89–90. (In Russian).
2. Bellato C., Krishnan H.B., Cubo T. et al. The soybean cultivar specificity gene *nodIX* is present, expressed in *nodD*-dependent manner, and of a symbiotic significance in cultivar-nonspecific strains of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *fredii*. **Microbiology**, 1997; 4(143): 1381–1388.
3. Berestetsky A.A., Dorosynsky L.M., Kozhemyakov A.P. Efficiency of preparations of rhizobiums in the Geographical network of experiments. **News AS USSR**. Ser. Biology, 1987, 5: 670–679. (In Russian).
4. Patyka V.P., Kots S.Ya., Volkogon V.V. et al. **Biological Nitrogen**. For Ed. V.P. Patyka. K.: World, 2003. 424. (In Ukrainian).
5. Camacho M., Burgos A., Chamber-Perez M.A. Nitrogen fixation in transposon mutants from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 impaired in nitrate reductase. **J. Plant Physiol**, 2003; 160 (4): 377–386.
6. Child J.J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. association with non-leguminous plant cell cultures. **Nature**, 1975; 253: 350–351.

7. Datsenko V.K., Laguta S.K., Starchenkov E.P. et al. Efficiency of legume-rhizobium symbiosis of different soybean varieties and strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Physiology and Biochemistry of Cult. Plants**, 1997, 29(4): 299–303. (In Russian).
8. Dospechov B.A. **Technique of field experience**. M.: Kolos, 1985. 371. (In Russian).
9. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K. et al. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiol**, 1968; 43 (8): 1185–1207.
10. Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. **Annu. Rev. Genet**, 2003; 37: 3–29.
11. Kots S.Ya., Beregovenko S.K., Kyrychenko E.V. et al. **Peculiarities of interaction of plants and nitrogen-fixing microorganisms**. K.: Scientific thought, 2007. 315. (In Russian)
12. Kots S.Ya., Morgun V.V., Tykhonovich I.A. et al. **Biological Nitrogen Fixation**. In 4 vols. K.: Logos, 2011. V.3. 404. (In Russian).
13. Krykunets V.M. Acetylene-reduction method in research of the physiology of legume-rhizobial symbiosis. **Physiology and Biochemistry of Cult. Plants**, 1993, 25(2): 419–430. (In Ukrainian).
14. Malichenko S.M., Datsenko V.K., Vasyliuk V.M., Kots S.Ya. Transposone mutagenesis of *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Physiology and Biochemistry of Cult. Plants**, 2007, 39 (5): 409–418. (In Ukrainian).
15. Moyseychenko V.F., Yeschenko V.O. **Bases of scientific researches in agronomy**. K.: Higher schk., 1994. 316. (In Ukrainian).
16. Novikova N.I., Sharypova L.A., Simarov B.V. Transposone mutagenesis of strain SKHM1-105 *Rhizobium meliloti*. **Mol. Genetics, Microbiology and Virology**, 1986, 8: 32–36. (in Russian).
17. Nychyk M.M., Pazyuk O.A., Bober A.F. et al. Efficiency of symbiosis of alfalfa with new strains of rhizobia obtained by transposon mutagenesis method. **Physiology and Biochemistry of Cult. Plants**, 2000, 32 (3): 219–222. (In Ukrainian).
18. O'Hara G.W. The role of nitrogen fixation in crop production. **J. Crop Prod**, 1998; 1: 115–138.
19. Parniske M., Kosch K., Werner D. et al. ExoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with reduced competitiveness for nodulation of *Glycine max*. **Mol. Plant-Microbe Interact**, 1993; 6 (1): 99–106.
20. Patyka V.Ph. Reserves of efficiency increase of *Rhizobium* symbiosis in soybean // **Genetics, selection and cultivation technology of soybean in Ukraine and Moldova**. Odessa: VSGI, 1991: 62–71. (In Russian).
21. Patyka V.P., Volkogon V.V., Nadkernychna O.V. et al. Biological fixation: yesterday, today, tomorrow. In the book: **Physiology of plants in Ukraine at the turn of the Millenia**. In 2 vols. K.: World, 2001. V.1. 212–226. (In Ukrainian).
22. Sidorova K.K., Shumnyi V.K., Glyanko M.N. et al. Expression of symbiotic gene of peas of nod4. **Genetics**, 2005, 41 (4): 661–667. (In Russian).
23. Simarov B.V., Aronshtam A.A. Biotechnology of symbiotic nitrogen fixation. **Agricultural Biology**, 1987, 11: 104–111. (In Russian).
24. Simon R., O'Connell M., Labes M., Puhler A. Plasmid vector for the genetic analysis and manipulations of rhizobia and other gram-negative bacteria. **Meth. Enzymol**, 1986; 118: 640–659.
25. Tsurumaru H., Yamakawa T., Tanaka M., Sakai M. The efficient strategy of plasmid rescue from Tn5 mutants derived from *Bradyrhizobium japonicum* Is-1, based on whole genome sequence information of strain USDA110. **J. Bac. Arg**, Kyushu Univ., 2008; 53 (1): 27–31.
26. Tykhonovich I.A., Provorov N.A. **Symbioses of plants and microorganisms: molecular genetics of agricultural systems of the future**. St.-Petersburg: St.-Petersburg University Press, 2009. 210. (In Russian).

EFFECTIVENESS OF SYMBIOSIS OF SOYBEAN PLANTS WITH TN5-MUTANTS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* 646

V. P. Zabolotna¹, S. Ya. Kots², S. M. Malichenko²

¹Kremenets Regional Humanitarian-Pedagogical Institute named after Taras Shevchenko
1, Litseina St., Kremenets, Ternopil Region 47003, Ukraine

²Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine
31/17, Vasylykivska St., Kyiv 03022, Ukraine

The formation of root nodules, increase of their mass, formation of harvest and its structure in soybean of cultivar Mariana inoculated by Tn5-mutants created by means transposon mutagenesis with the use of plasmid pSUP2021 was studied in conditions of field experiment. It has been found that the investigated transposon mutants specifically influenced the forming of soybean symbiotic apparatus: Tn5-mutant 17–2 was marked by the highest nodular ability, 31–2 formed the largest biomass of nodule roots, while 9–2 was characterized by the highest general and specific nitrogen-fixing activities. The seeds inoculation by transposon mutants 9–1, 9–2, 17–2 and 33–2 was marked to cause an increase of the seed productivity in comparison with inoculation by commercial strain 634b. All Tn5-mutants proved to cause an increase of the seed harvest in comparison with the commercial strain 634b, while mutants 9–2, 17–2 and 33–2 in comparison with the initial strain 646. Bacterization of seeds by high-activity transposon mutants 9–2 and 17–2 provided the largest harvest growth of soybean in comparison with the control. In perspective these Tn5-mutants could be the initial material for subsequent selection of soybean rhizobia production strains.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-mutant, symbiosis, nitrogen fixing activity, productivity.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОЗА РАСТЕНИЙ СОИ С Tn5-МУТАНТАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

В. П. Заболотная¹, С. Я. Коць², С. М. Маличенко²

¹Кременецкий областной гуманитарно-педагогический институт им. Тараса Шевченко
ул. Лицейная, 1, Кременец, Тернопольская обл. 47003, Украина

²Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
ул. Васильковская, 31/17, Киев 03022, Украина

В условиях полевого опыта изучали образование корневых клубеньков, нарастание их массы, формирование урожая и его структуру у сои сорта Марьяна, инокулированной Tn5-мутантами, созданными с помощью транспозонового мутагенеза с использованием плазмиды pSUP2021. Установлено, что исследованные транспозоновые мутанты влияли на формирование симбиотического аппарата сои специфически: Tn5-мутант 17–2 отличался самой большой нодуляционной способностью, 31–2 сформировал самую большую биомассу клубеньков, а 9–2 характеризовался самыми высокими общей и удельной азотфиксирующими активностями. Инокуляция семян транспозоновыми мутантами 9–1, 9–2, 17–2 и 33–2 вызвала увеличение семенной продуктивности по сравнению с инокуляцией производственным штаммом 634б. Все Tn5-мутанты привели к повышению урожая семян в сравнении с производственным штаммом 634б, а мутанты 9–2, 17–2 и 33–2 и в сравнении с исходным штаммом 646. Бактеризация семян высокоактивными мутантами 9–2 и 17–2 обеспечивала самый большой прирост урожайности сои по сравнению с контролем. Эти Tn5-мутанты могут в перспективе быть исходным материалом для дальнейшей селекции производственных штаммов клубеньковых бактерий сои.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутант, симбиоз, азотфиксирующая активность, урожайность.

Одержано: 01.03.2014