

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ СОЇ З РІЗНОЮ ШВИДКІСТЮ РОСТУ

Крутило Д.В.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна
E-mail: krutilod@mail.ru

Вивчено фенотипові та генотипові властивості мікросимбіонтів сої з різною швидкістю росту. Встановлено, що штами з інтенсивним ростом проявляють специфічність до рослини-живителя, однак істотно відрізняються від повільнорослих бульбочкових бактерій сої за серологічними, хемотаксономічними та симбіотичними властивостями.

*За антигенним складом інтенсивнорослі штами об'єднані в одну серогрупу. Відмічено подібність жирнокислотних профілів штаму з інтенсивним ростом *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 та повільнорослих штамів *B. japonicum* 6346 і *B. japonicum* KC2-3. Виявлено, що ЕПС штаму *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 відрізняються від ЕПС штамів *B. japonicum* KC2-3 і *B. japonicum* 6346 наявністю ксилози (2,7%) та підвищеним вмістом рамнози (18,4%). Аналіз послідовностей генів 16S рРНК дозволив віднести штами з інтенсивним ростом до роду *Bradyrhizobium*. Досліджені інтенсивнорослі штами утворюють неспецифічний симбіоз із вигною китайською.*

Ключові слова: антисироватка, бульбочкові бактерії сої, полісахариди, жирні кислоти, 16S рРНК.

Біологічна фіксація молекулярного азоту з атмосфери є одним з основних джерел азоту в агроценозах. Важливу роль у цьому процесі відіграють бульбочкові бактерії, які здатні індукувати утворення азотфіксуювальних бульбочок на корнях бобових рослин. Завдяки цій здатності бульбочкові бактерії розглядають як важливий генетичний ресурс для біотехнологій у сільському господарстві [1].

Вирощування бобових культур сприяє формуванню у ґрунті численних стабільних популяцій специфічних бульбочкових бактерій. Представники цих популяцій можуть як сприяти засвоєнню молекулярного азоту з атмосфери, так і перешкоджати інтродукованим високоефективним штамам-інокулянтам інфіку-

вати рослини та проявляти свій симбіотичний потенціал повною мірою.

Вивчення різноманітності бульбочкових бактерій за останні тридцять років пройшло декілька етапів – морфологічний, фізіологічний, а також молекулярно-генетичний [2]. У зв'язку з цим істотних змін зазнала таксономія ризобій. На сьогодні бульбочкові бактерії об'єднані в шість родів (клас *alpha-Proteobacteria*): *Allorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Azorhizobium* та *Bradyrhizobium* [3]. Виявлені також азотфіксувальні симбіотичні бактерії, які належать до філогенетично віддалених від ризобій родів: *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* та *Phyllobacterium* (клас *alpha-Proteobacteria*), а також *Burkholderia*, *Ralstonia* та *Cupriavidus* (клас *beta-Proteobacteria*) [4]. За швидкістю росту на живильних середовищах вони утворюють дві великі групи – швидко- і повільнорослі, які значно розрізняються між собою за низкою ознак [5, 6].

Відомо, що таксономічно віддалені ризобії можуть інфікувати один і той же вид бобових. Так, наприклад, соя вступає в симбіоз із бульбочковими бактеріями чотирьох видів: *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* та *Ensifer fredii*. У ґрунтах України типовими мікросимбіонтами культурної сої виступають повільнорослі ризобії виду *B. japonicum*. Для дикої сої (не трапляється на території країни) характерним є утворення бульбочок із швидкорослими ризобіями *E. fredii* [4, 5].

Раніше нами було показано, що в агроценозах України представники місцевих популяцій бульбочкових бактерій сої розрізняються за морфолого-культуральними властивостями, зокрема, за інтенсивністю росту на живильному середовищі. За цією ознакою досліджувані штами були поділені на дві групи: штами з повільним та інтенсивним ростом [7, 8]. Інтенсивнорослі штами виділені з популяцій ризобій сої вперше. Різнобічне вивчення бульбочкових бактерій сої з різною швидкістю росту дозволить виявити особливості їх існування у ґрунті та в симбіозі з рослиною-живителем.

Враховуючи вищезазначене, метою нашої роботи було вивчити біологічні властивості та провести аналіз послідовностей гена 16S рРНК у бульбочкових бактерій сої з різною швидкістю росту.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень слугували вилучені нами з місцевих популяцій ризобій різних агроценозів Укра-

їни штами мікросимбіонтів сої, типовий штам *Bradyrhizobium japonicum* B-209^T = VKM 1967 = ATCC 10324, стандартний штам *B. japonicum* 6346 (B-167 = VKM = VNIAM 2490) та штам ризобій вигни *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) B1 (B-200), які зберігаються в Колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів ІСГМ УААН.

Штами ризобій сої (180 штамів) виділені з шести типів ґрунтів методом інокуляції стерильних проростків сої.

Антисироватки до бактеріальних штамів отримували за методикою ВНДІСГМ [9] у нашій модифікації. Антигенні властивості штамів ризобій вивчали за допомогою реакції аглютинації (метод Грубера-Відаля) [10].

Для виділення сумарної ДНК штамів ризобій використовували набір «ДНК-сорб-В» згідно протоколу виробника. Матриці для сиквенування генів 16S рРНК синтезували за допомогою ПЛР, використовуючи універсальні для більшості еубактерій праймери fD1 (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') та rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3') [11]. ПЛР проводили із застосуванням ампліфікатора GeneAmp PCR System 2720. Сиквенування здійснювали на автоматичному ДНК сиквенаторі ABI PRISM 3130 Genetic Analyser. Послідовності аналізували за допомогою програми BLAST шляхом порівняння з послідовностями з міжнародної бази даних GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів та моносахаридний склад екзополісахаридів (ЕПС) вивчали у трьох штамів бульбочкових бактерій сої: *B. japonicum* 6346 і *B. japonicum* KC2-3 – з повільним ростом, *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 – з інтенсивним ростом.

Культури вирощували на агаризованому бобовому середовищі при 28 °С. У пізню логарифмічну фазу росту бактеріальну масу змивали фізіологічним розчином, осаджували центрифугуванням за 10000 об./хвилину протягом 20 хвилин і двічі відмивали у такому ж режимі. Бактеріальні клітини висушували ацетоном та діетиловим ефіром.

Супернатант розводили фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1 і повторно центрифугували за 10000 об./хвилину протягом 20 хвилин. Повноту видалення бактеріальних клітин контролювали під мікроскопом. Екзополісахариди виділяли з супернатанту шляхом одноразового осадження сірчанокислим

амонієм (50 % насичення). Отримані препарати діалізували проти дистильованої води до повного видалення іонів SO_4^{2-} та ліофільно висушували.

Визначення жирнокислотного складу загальних клітинних ліпідів. Бактеріальну масу гідролізували в 1,5 % розчині хлористого ацетилу на метанолі при температурі 100 °С протягом 4 годин [12]. Метиллові ефіри жирних кислот екстрагували трічі гексаном (по 3 мл). Фракцію н-гексану відбирали і висушували на вакуумному випаровувачі. Аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert. Колонка HP-5MS, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм. Температурний режим 150-250 °С, градієнт температури 4 °С/хвилину, газ-носії – гелій, швидкість потоку через колонку 1,2 мл/хвилину. Температура випаровувача – 250 °С, з поділом потоку 1:100. Метиллові ефіри жирних кислот ідентифікували за тривалістю утримання їх порівняно зі стандартами. Як стандарти використовували метиллові ефіри жирних кислот фірми «Supelco». Вміст жирних кислот у відсотках загальної площі піків визначали за допомогою програмного забезпечення ChemStation.

Ідентифікація нейтральних моносахаридів ЕПС. Препарати ЕПС гідролізували у 2н HCl протягом 5 годин при 100 °С. Обробку зразків проводили за методом P. Albersheim із співавт. [13]. Суміш нейтральних моносахаридів у вигляді ацетатів поліолів розділяли на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert, колонка DB-225 mS 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, газ носій – гелій, потік через колонку 1 мл/хвилину. Температура випаровувача – 250 °С, інтерфейсу – 280 °С, термостату – 220 °С (режим ізотермічний). Пробу вводили з діленням потоку 1:100. Ідентифікацію моносахаридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів досліджуваних зразків і стандартних, а також з використанням комп'ютерної бази даних ChemStation. Кількісне співвідношення окремих моносахаридів визначали у відсотках від сумарної їх кількості за співвідношенням площ всіх піків моносахаридів [14].

Симбіотичні властивості отриманих нами штамів мікросимбіонтів сої вивчали у вегетаційному досліді згідно із загальноіснуючими правилами. В досліді використовували культурну (*Glycine max* (L.) Merr.) та дику (*Glycine soya*) сою, а також вигну китайську (*Vigna unguiculata*). Активність симбіотич-

ної азотфіксації визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі «Chrom-4» [15].

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за загальноприйнятими методами [16] та застосовували комп'ютерну програму Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення. Порівняльний аналіз 45 культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей тридцяти досліджуваних штамів бульбочкових бактерій сої з повільним та інтенсивним ростом показав, що вони істотно відрізняються за морфологією колоній, швидкістю росту, чутливістю до антибіотиків і використанням сполук вуглецю. Інтенсивнорослі штами проявляють високу специфічність до рослини-живителя і при повторному пасажі через рослину їх властивості не змінюються [17].

Повільнорослі бульбочкові бактерії сої трапляються в усіх п'яти досліджених регіонах України, тоді як штами з інтенсивним ростом виявлені лише в ґрунтах північного, центрального та східного Лісостепу. Кількісне співвідношення штамів – представників двох груп змінюється в залежності від ґрунтово-кліматичної зони.

Достатньо інформативним при вивченні різноманітності бульбочкових бактерій є серологічний метод. Із застосуванням модифікованої схеми імунізації кролів нами отримано імунні сироватки до штаму з інтенсивним ростом *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 та штамів із повільним ростом *B. japonicum* 634б та *B. japonicum* 46. У своїх дослідженнях ми також використовували антисироватку до повільнорослого штаму *B. japonicum* M8, люб'язно надану нам співробітниками лабораторії трансформації азоту і фосфору ІСГМ УААН.

За допомогою методу аглютинації вивчено серологічну спорідненість мікросимбіонтів сої з різною швидкістю росту (45 штамів). Встановлено, що п'ятнадцять інтенсивнорослих штамів ризобій сої, які виділені з різних агроценозів України, позитивно реагували виключно з антисироваткою до штаму *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 і не взаємодіяли з сироватками до повільнорослих штамів *B. japonicum* 634б, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* 46. Отримані дані засвідчують, що штами з інтенсивним ростом, різного еколого-географічного походження, чітко відокремлені від повільнорослих ризобій сої за серологічними ознаками і можуть бути об'єднані в одну серогрупу.

Тридцять досліджених штамів повільнорослих бульбочкових бактерій сої (представників географічно віддалених популяцій ризобій) виявилися серологічно гетерогенними і були віднесені нами до чотирьох серогруп.

Для підтвердження видового статусу повільнорослих штамів ризобій сої і з'ясування таксономічного положення інтенсивнорослих мікосимбіонтів сої нами була проведена ПЛР з універсальними бактеріальними праймерами fD1 та rP2. Порівнювали індивідуальні 16S рРНК послідовності цих штамів з сиквенсами, що містяться у базі даних GenBank (табл. 1).

Таблиця 1. Результати сиквенування фрагментів 16S рРНК бульбочкових бактерій сої

Номер досліджуваного штаму		Назва виду і номер референс-штаму у нуклеотидній базі GenBank	Довжина фрагменту 16S рРНК, що порівнюється	Ідентичність послідовностей, %
1		2	3	4
Повільнорослі штами	В-209 ^T = VKM 1967 = ATCC 10324	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	1080	99,9
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CCBAU 23019 DQ 993279	1075	99,9
		<i>Bradyrhizobium lupini</i> X 87273	1079	99,8
	46	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	1053	99,6
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 4 AF 208515	1056	99,9
		<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 53119 EF 394145	1053	99,8
	KC2-3	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	1025	99,6
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 4 AF 208515	1028	99,9
		<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> 2281 AF 363132	998	99,8

1		2	3	4
Інтенсивнорослі штами	KB1-1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	1164	99,7
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 123 AF 363151	1167	99,9
		<i>Bradyrhizobium canariense</i> AB 195986	1158	98,9
		<i>Bradyrhizobium lupini</i> U 69637	1165	99,7
	KC1-9	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	920	99,6
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 6153 FJ 025097	921	99,8
		<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> R10m EU 364715	920	99,6
		<i>Mesorhizobium loti</i> AB 367700	921	99,8

Значні відмінності інтенсивнорослих штамів від повільнорослих за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками, а також високий ступінь ідентичності (99,6-99,9 %) їх послідовностей генів 16S рPHK з послідовностями різних видів ризобій не дозволяють остаточно визначити їх видову належність.

Важливим критерієм при диференціації окремих видів мікроорганізмів є така їх хемотаксономічна ознака як своєрідність жирнокислотного складу загальних клітинних ліпідів.

Аналіз жирнокислотних спектрів бульбочкових бактерій сої показав, що штами з інтенсивним (*Bradyrhizobium* sp. KB1-1) і повільним (*B. japonicum* 6346 и *B. japonicum* KC2-3) ростом схожі, але не ідентичні, за жирнокислотними профілями (рис. 1). У загальних клітинних ліпідах цих штамів виявлено типові для бактерій виду *B. japonicum* насичені та ненасичені жирні кислоти з довжиною ланцюга від 12 до 18 вуглецевих атомів.

Домінуючими жирними кислотами є гексадеканова (15,25-28,03 %), октадеценева (46,02-78,80 %) та октадеканова (19,43-21,52 %) кислоти. Однак слід відмітити, що ліпіди штаму з інтенсивним ростом *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 містили більшу кількість 3-оксидодеканової (3-OH-C12:0) і 3-окситетрадеканової

(3-ОН-С14:0) кислот, а також не ідентифікованих нами жирних кислот (X1 и X2) у порівнянні з референтним та повільнорослими штамми.

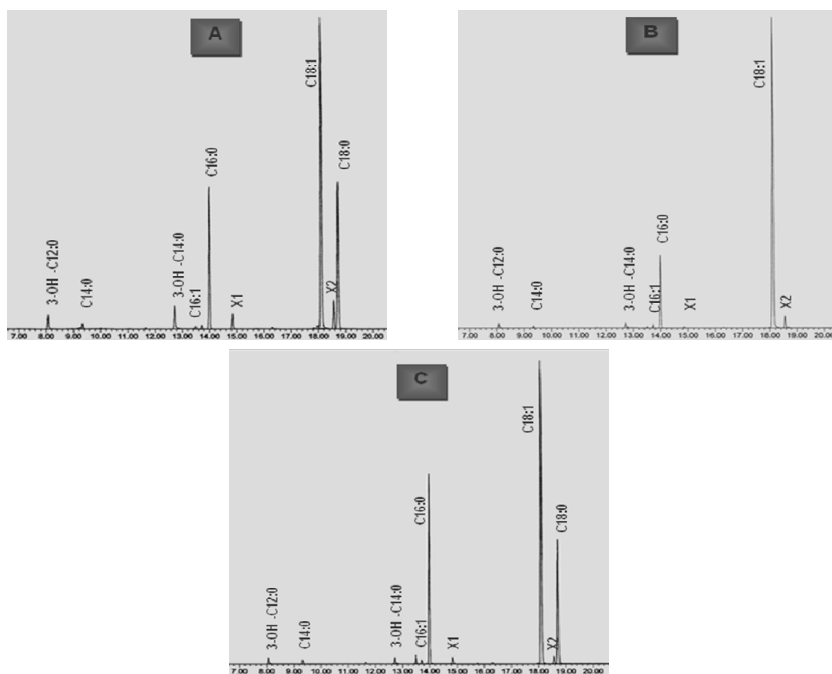


Рис. 1. Жирнокислотні спектри різних штамів бульбочкових бактерій сої (А – штам з інтенсивним ростом *Bradyrhizobium* sp. KB1-1, В – повільнорослий штам *B. japonicum* KC2-3, С – повільнорослий стандартний штам *B. japonicum* 634б).

Відомо, що багатоступінчастий процес формування бульбочок у бобових рослин ініціюють екзополісахариди бульбочкових бактерій. Раніше нами було показано, що інтенсивнорослі штами продукують більшу кількість цих сполук порівняно із повільнорослими. Виявлено, що штами з інтенсивним і повільним ростом мають кількісні та якісні відмінності у моносахаридному складі екзополісахаридів (табл. 2). Домінуючими моносахаридами ЕПС всіх досліджених штамів є глюкоза, маноза та галактоза. ЕПС інтенсивнорослого штаму *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 відрізняються від ЕПС повільнорослих штамів *B. japonicum* KC2-3 та *B. japonicum* 634б наявністю ксилози (2,7 %) і значної кількості (18,4 %) рамнози.

У штамів із повільним ростом остання присутня в мінорних кількостях (0,6-0,9 %).

Таблиця 2. Моносахаридний склад екзополісахаридів бульбочкових бактерій сої

Штами	Моносахариди				
	рамноза	ксилоза	маноза	галактоза	глюкоза
<i>B. japonicum</i> 6346	0,9	–	34,2	14,5	50,4
<i>B. japonicum</i> KC2-3	0,6	–	34,6	17,5	47,3
<i>Bradyrhizobium</i> sp. KB1-1	18,4	2,7	28,9	9,3	40,7

Примітка: кількість моносахаридів наведено у процентах від загальної площі піків; «–» – моносахарид не виявлено.

Зважаючи на те, що повільно- та інтенсивнорослі штамми бульбочкових бактерій сої розрізняються за багатьма ознаками, нами було проведено вивчення специфічності їх взаємодії з різними бобовими рослинами.

За умов вегетаційного дослідження вивчали особливості функціонування симбіотичних систем культурної (*Glycine max* (L.) Merr.) і дикої (*Glycine soja*) сої та вигни китайської (*Vigna unguiculata*) із штамми бульбочкових бактерій сої з повільним (*B. japonicum* 6346, *B. japonicum* 46) і інтенсивним (*Bradyrhizobium* sp. KB1-1, *Bradyrhizobium* sp. KC1-9) ростом та штамом ризобій вигни (*Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) B1). Активність та ефективність симбіозу бактерій з рослинами оцінювали порівняно до стандартного штамму ризобій сої *B. japonicum* 6346.

Слід зазначити, що при проведенні вегетаційного дослідження у стерильний субстрат (вермикуліт) висівали поверхнево стерилізоване насіння, тому у контрольних варіантах на коренях рослин бульбочки були відсутні (табл. 3).

Внесені штамми бульбочкових бактерій сої та вигни формували численні бульбочки на коренях рослин різних видів, що засвідчує наявність прямого та перехресного інфікування. Особливої різниці між повільно- та інтенсивнорослими штамми ризобій сої за впливом на показник кількості бульбочок нами не виявлено.

З даних табл. 3 видно, що в симбіозі з культурною та дикою соєю бульбочкові бактерії сої як з повільним, так і з інтенсивним ростом активно фіксували молекулярний азот.

Таблиця 3. Активність симбіозу бульбочкових бактерій сої та вигни з різними видами бобових культур (вегетаційний досвід)

Варіанти дослідів	Кількість бульбочок, од./рослину	Маса бульбочок, г/рослину	Активність симбіотичної азотфіксації, мкг N/рослину за год.	Вміст сухої речовини в надземній масі рослин, г/рослину
КУЛЬТУРНА СОЯ				
Контроль (без інокуляції)	0	0	0	0,99
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 6346	47,50	0,36	15,89	1,25
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46	56,92	0,41	30,46	1,34
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. KB1-1	55,00	0,36	20,31	1,29
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. KC1-9	62,50	0,40	16,11	1,26
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Vigna</i>) B1	57,25	0,30	16,11	1,26
НІР ₀₅	4,13	0,02	2,81	0,06
ДИКА СОЯ				
Контроль (без інокуляції)	0	0	0	0,30
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 6346	26,42	0,13	1,11	0,35
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46	31,75	0,13	1,45	0,39
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. KB1-1	37,08	0,15	2,05	0,39
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. KC1-9	29,50	0,14	1,27	0,36
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Vigna</i>) B1	31,00	0,13	1,51	0,37
НІР ₀₅	3,99	0,02	0,24	0,04
ВИГНА КИТАЙСЬКА				
Контроль (без інокуляції)	0	0	0	0,49
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 6346	86,25	0,91	12,79	1,26
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46	98,08	0,94	21,85	1,44
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. KB1-1	78,17	0,87	3,85	0,97
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. KC1-9	85,17	0,82	4,17	0,74
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Vigna</i>) B1	104,08	1,00	25,82	1,67
НІР ₀₅	5,36	0,04	2,26	0,05

Протерівень активності нітрогенази у представників обох груп штамів на культурній сої був вищим (16,11-30,46 мкг N/рослину за год.), ніж на дикій (1,11-2,05 мкг N/рослину за год.), що пов'язано з більшою масою бульбочок. Кращими за впливом на симбіотичні показники обох культур виявилися повільнорослий штам ризобій сої *B. japonicum* 46, інтенсивнорослий штам *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 та штам ризобій вигни *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) B1.

Найбільші відмінності між повільно- та інтенсивнорослими штамми спостерігали при взаємодії їх із вигною китайською. Якщо досліджувані штами практично не відрізнялися за впливом на формування кореневих бульбочок, то азотфіксувальна активність у варіантах з інокуляцією інтенсивнорослими штамми була у 3,1-5,7 раза нижчою, порівняно із штамми з повільним ростом. Урожайні дані також засвідчують той факт, що інтенсивнорослі штами (*Bradyrhizobium* sp. KB1-1 та *Bradyrhizobium* sp. KC1-9) утворюють неспецифічний симбіоз із вигною. Вміст сухої речовини в надземній масі рослин у варіантах з інокуляцією цими штамми був у 1,3-1,9 раза нижчим порівняно до повільнорослих штамів *B. japonicum* 6346 та *B. japonicum* 46.

Ефективність симбіозу повільнорослих штамів ризобій сої із вигною китайською підтверджується підвищеним вмістом хлорофілів *a* та *b* в біомасі листя вигни як у фазу бутонізації, так і у фазу цвітіння (табл. 4).

Таблиця 4. Вплив інокуляції бульбочковими бактеріями сої та вигни на вміст хлорофілів у біомасі листя вигни китайської (вегетаційний дослід)

Варіанти досліді	Фаза бутонізації			Фаза цвітіння		
	кількість хлорофілу, мг/100 г					
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>
Контроль (без інокуляції)	11,18	3,38	14,56	10,71	2,32	13,03
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 6346	62,03	14,49	76,52	71,28	16,30	87,58
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46	70,30	15,19	85,49	91,98	21,00	112,98
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. KB1-1	27,45	5,92	33,37	32,77	7,26	40,03
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. KC1-9	21,31	4,37	25,68	25,06	3,28	28,34
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Vigna</i>) B1	89,91	22,87	112,68	102,96	24,49	127,45
НІР ₀₅	1,61	1,49	2,43	2,24	3,77	5,22

У варіантах із інокуляцією штамми з інтенсивним ростом сума хлорофілів (фаза цвітіння) була у 2,2-4,0 рази нижчою порівняно із штамми *B. japonicum* 6346 та *B. japonicum* 46. Найбільший вміст хлорофілів відмічено в листках вигни за інокуляції специфічним штамом *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) В1 (112,68 та 127,45 мг/100 г).

Найбільш комплементарними за симбіотичною ефективністю є пари: культурна соя – повільнорослий штам *B. japonicum* 46, дика соя – штамми *B. japonicum* 46 та *Bradyrhizobium* sp. KB1-1, вигна китайська – штамми *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) В1 та *B. japonicum* 46.

Таким чином, в агроценозах України сформувалися місцеві популяції бульбочкових бактерій сої, гетерогенність яких підтверджується наявністю в них двох груп штамів: з інтенсивним та повільним ростом. Вилучені штамми мають комплекс характерних ознак і суттєво розрізняються за серологічними, хемотаксономічними та симбіотичними властивостями.

Подальші дослідження бульбочкових бактерій сої із застосуванням сучасних молекулярно-генетичних методів (аналіз симбіотичних генів, ДНК-ДНК гібридизація, RAPD, t-RFLP та AFLP) дозволять уточнити видову належність інтенсивнорослих штамів, а також виявити фактори, що визначають різноманітність бактерій у ґрунтових популяціях брадирізобії.

1. Zahran H.H. Rhizobia from wild legum: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology /H.H. Zahran //J. Biotechnol. – 2001. – Vol. 91, № 2-3. – P. 143-153.

2. Broughton W.J. Roses by other names: taxonomy of the *Rhizobiaceae* /W.J. Broughton //J. Bacteriol. – 2003. – Vol. 185, № 10. – P. 2975-2979.

3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part A+B+C //eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley; editor-in-chief G.M. Garrity. – New York: Springer SBM, 2005. – Vol. 2. – 2800 p.

4. Willems A. The taxonomy of rhizobia: an overview /A. Willems //Plant and Soil. – 2006. – Vol. 287. – P. 3-14.

5. Spaink H. *Rhizobiaceae*: molecular biology of model plant-associated bacteria /Spaink H., Kondorosi A., Hooykaas P.; пер. с англ. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. – СПб., 2002. – 568 с.

6. Новикова Н.И. Современные представления о филогении и систематике клубеньковых бактерий /Н.И. Новикова //Микробиол. – 1996. – Т. 65, Вып. 4. – С. 437-450.

7. Крутило Д.В. Поширення та екологічні особливості бульбочко-

вих бактерій сої в різних регіонах України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.16 «Екологія» /Крутило Д.В. – Київ, 2006. – 22 с.

8. Крутило Д.В. Бульбочкові бактерії сої як складова мікробіоти ґрунтів України /Д.В. Крутило, Т.М. Ковалевська //Живлення рослин: теорія і практика: зб. наук. пр. – К.: Логос, 2005. – С. 346-355.

9. Берестецкий О.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности /О.А. Берестецкий. – Л., 1979. – 33 с.

10. Кэбот Э. Экспериментальная иммунология /Э. Кэбот, Б. Мейер. – М.: Медицина, 1968. – 677 с.

11. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study /W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane //J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173. – P. 697-703.

12. Васюренко З.П. Особенности состава жирных кислот липидов у *Providencia alcalifaciens* и *Providencia stuartii* II /З.П. Васюренко, Е.Н. Чернявская, Л.В. Опенько //Микробиол. – 1982. – Т. 51, № 1. – С. 54-59.

13. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gasliquid chromatography /P. Albersheim, D.J. Nevis, P.D. English, A. Karr //Carbon. Res. – 1976. – Vol. 5, № 3. – P. 340-345.

14. Варбанец Л.Д. Методи исследования эндотоксинов /Л.Д. Варбанец, Г.М. Здоровенко, Ю.А. Книрель. – К.: Наук. думка, 2006. – 237 с.

15. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation /R.W.F. Hardy, R.D. Holsten, E.K. Jackson, R.C. Burns //Plant Physiol. – 1968. – Vol. 43, № 8. – P. 1185-1207.

16. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 352 с.

17. Біологічна різноманітність бульбочкових бактерій сої в ґрунтах України /Д.В. Крутило, О.В. Надкернична, Т.М. Ковалевська, В.П. Патица //Мікробіол. журн. – 2008. – Т. 70, № 6. – С. 27-34.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ СОИ С РАЗНОЙ СКОРОСТЬЮ РОСТА

Крутило Д.В.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,
г. Чернигов

Изучены фенотипические и генотипические свойства микросимбионтов сои с разной скоростью роста. Установлено, что штаммы с интенсивным ростом проявляют специфичность к растению-хозяину, однако существенно отличаются от медленнорастущих клубеньковых бактерий сои по серологическим, хемотаксономическим и симбиотическим свойствам.

*По антигенному составу интенсивнорастущие штаммы объединены в одну серогруппу. Отмечено сходство жирнокислотных профилей штамма с интенсивным ростом *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 и медленнорастущих штаммов *B. japonicum* 6346 и *B. japonicum* KC2-3. Выявлены количественные и качественные отличия в моносахаридном составе ЭПС исследованных штаммов. ЭПС штамма *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 отличаются от ЭПС штаммов *B. japonicum* KC2-3 и *B. japonicum* 6346 наличием ксилозы (2,7 %) и повышенным содержанием рамнозы (18,4 %). Анализ последовательностей генов 16S рРНК позволил отнести интенсивнорастущие штаммы к роду *Bradyrhizobium*. Исследованные интенсивнорастущие штаммы образуют неспецифический симбиоз с вигной китайской.*

Ключевые слова: антисыворотка, клубеньковые бактерии сои, полисахариды, жирные кислоты, 16S рРНК.

THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF SOYBEAN NODULE BACTERIA WITH THE DIFFERENT SPEED OF GROWTH

Krutylo D.V.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

The phenotypical and genotypic properties of soybean microsymbionts with the different speed of growth were studied. It was established that the strains with the intensive growth were specific to the host-plant, but had differed by their serological, chemotaxonomical and symbiotic properties.

*The investigated intensive-growing strains were combined into the one serogroup by their antigenic content. The similarity of fatty acids spectrum was observed for the strains with the intensive growth *Bradyrhizobium* sp. KB1-1, slow-growing strains *B. japonicum* 634b and *B. japonicum* KC2-3. The quantitative and qualitative differences in monosaccharides contents of EPS of the studied strains were revealed. Presence of xylose (2,7 %) and increased contents of rhamnose (18,4 %) were shown to be different in EPS of strain *Bradyrhizobium* sp. KB1-1 and EPS of strains *B. japonicum* KC2-3 and *B. japonicum* 634b. Analysis of the sequences of the 16S rRNA genes allowed attributing the strain with the intensive growth to the *Bradyrhizobium* genus. Genes consistency analysis of 16S rRNA had allowed to refer the intensive-growing strains to the *Bradyrhizobium* genus. It was shown that studied intensive-growing strains had formed the nonspecific symbiosis with cow pea.*

Key words: antiserum, soybean nodule bacteria, polysaccharides, fatty acids, 16S rRNA.