

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ

ДРОЗДЕНКО
ГАЛИНА МИКОЛАЇВНА

УДК 581.1.557:579.841. 224.4

**ЗВ'ЯЗОК ФЕНОТИПОВИХ ОЗНАК ЕФЕКТИВНОСТІ СИМБІОЗУ СОЇ
ІЗ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ШТАМІВ І
TN5-МУТАНТІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

03.00.12 – фізіологія рослин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2014

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Коць Сергій Ярославович,
Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, завідувач відділу

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Косаківська Ірина Василівна,
Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України,
старший науковий співробітник відділу;

доктор біологічних наук, професор,
академік НААН України
Патика Володимир Пилипович,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України, завідувач відділу

Захист відбудеться: «22» травня 2014 р. о 12.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.212.01 при Інституті фізіології рослин і генетики НАН України за адресою: 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології рослин і генетики НАН України за адресою: 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17.

Автореферат розісланий «18» квітня 2014 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради
доктор біологічних наук

Є.Ю. Мордерер

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним із перспективних напрямів інтенсифікації технологій у агропромисловому комплексі є широке застосування явища біологічної азотфіксації бобово-ризобіальними системами, завдяки якому можна зменшити шкідливий вплив на навколишнє середовище мінеральних азотних добрив і водночас знизити собівартість та отримати екологічно чисту продукцію (Старченков и др., 1984; Патица та ін., 2003). Ефективна мобілізація внутрішніх резервів і реалізація генетичного потенціалу азотфіксуючих симбіозів можлива лише за умов всебічного фундаментального дослідження механізмів взаємодії партнерів і з'ясування фізіолого-біохімічних та молекулярно-генетичних аспектів зв'язування інертної молекули азоту в доступні рослинам азотні сполуки (Патица та ін., 2003; Коць та ін., 2010).

Складність досліджень бобово-ризобіального симбіозу полягає у тому, що вступаючи у мутуалістичні взаємовідносини мікросимбіонт трансформує власні фізіолого-біохімічні процеси метаболізму відповідно до потреб взаємовигідного співіснування з рослиною-хазяїном (Коць и др., 2007).

Проте на прикладі бульбочкових бактерій гороху встановлено (Косенко та ін., 1990; Косенко, 1992), що їхні симбіотичні властивості – вірулентність, конкурентоспроможність, азотфіксувальна активність визначаються індивідуальними особливостями хімічного складу та структури ЕПС і ЛПС штамів ризобій. Показано, що втрата штамми *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* здатності до синтезу в чистій культурі білка із молекулярною масою 14 кДа спричиняє неспроможність формувати даними штамми симбіоз із бобовими рослинами (Sarma and Emerich, 2006). Також було показано, що інокуляція сої штамми зі зміненими симбіотичними властивостями змінює у рослин динаміку активності окисно-відновних ферментів (Кругова та ін., 2008), ферментів азотного метаболізму (Коць та ін., 2011) та інтенсивність фотосинтезу (Василюк та ін., 2008).

Таким чином, дослідження прояву фенотипових ознак симбіотичних систем сої, залежно від фізіолого-біохімічних особливостей ризобій, через призму фізіологічної відповіді рослин на інокуляцію робить можливим з'ясування окремих ланок механізму симбіотичної взаємодії між бобовими рослинами та ризобіями і відкриває перспективу визначення симбіотичних властивостей штамів ще в умовах чистої культури.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася в рамках науково-дослідних тем відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України: 2002–2006 рр. «Методами генної інженерії отримати нові штамми азотфіксуючих мікроорганізмів і створити високоефективні азотфіксуючі системи бобових та злакових культур» (р/№ 0102U002460), 2006–2010 рр. «Дослідити фізіологічні процеси функціонування бобово-ризобіального симбіозу і розробити методи його інтенсифікації» (р/№ 0106U006461),

2007–2011 рр. «Біотехнологічними методами створити високоефективні штами повільнорослих бульбочкових бактерій з широким інокуляційним спектром та вивчити їх взаємодію з рослинами» (р/№ 0107U004022).

Мета і задачі дослідження. Виявити фенотипові особливості прояву симбіотичних ознак системами соя – *Bradyrhizobium japonicum*, які обумовлені фізіологічною реакцією рослин на інокуляцію ризобіями з різними фізіолого-біохімічними властивостями.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- дослідити особливості росту, білкового і ліпополісахаридного складу та метаболізму органічних сполук штамами і Tn5-мутантами різного спектру активності в умовах чистої культури;
- створити модельні системи соя – *B. japonicum* із залученням штамів і Tn5-мутантів із відомими властивостями та визначити прояв фенотипових ознак ефективності симбіозу;
- вивчити особливості білкового складу коренів і бульбочок сої, залежно від активності мікросимбіонта та фази розвитку рослин;
- дослідити активність аскорбат- і гваяколпероксидаз на різних етапах формування і функціонування симбіотичного апарату сої різної ефективності.

Об'єкт дослідження – симбіотичні системи, створені за участю рослин сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Мар'яна і бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* вихідного штаму 646, виробничого штаму 6346, неактивного 604к та Tn5-мутантів штаму 646 (9-1, 21-2, 107, 113).

Предмет дослідження – фізіолого-біохімічні особливості ризобій різного спектру активності в умовах чистої культури та фізіологічні процеси, що відбуваються в симбіотичних системах сої, мікропартнерами якої є штами й транспозонові мутанти повільнорослих бульбочкових бактерій.

Методи дослідження – біохімічні (визначення азотфіксувальної активності симбіотичних систем, електрофорез білків та ліпополісахаридів у ПААГ в денатуруючих умовах, визначення вмісту фотосинтетичних пігментів у листках, активності аскорбатпероксидази (АП) і гваяколпероксидази (ГП) у коренях рослин сої), мікробіологічні (вирощування мікроорганізмів, облік кількості колоній), вимірювально-вагові (для оцінки біометричних показників рослин) і статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше показано, що трансформація геному ризобій сої у результаті транспозонового мутагенезу, яка призводить до зниження ефективності їх симбіотичної взаємодії з рослиною-хазяїном, викликає суттєві зміни у вуглеводному метаболізмі ризобій і порушення структури їх ліпополісахаридів.

Встановлено, що у бактероїдах бульбочок сої вміст поліпептидів із молекулярною масою 160 кДа збільшується пропорційно підвищенню

азотфіксувальної активності симбіотичних систем, що відображає участь даних протеїнів у функціонуванні нітрогеназного комплексу.

Вперше показано, що формування пулу протеїнів у рослинній частині бульбочки не залежить від симбіотичних властивостей ризобій, що свідчить про однаковий перебіг фізіологічних процесів при формуванні симбіотичних систем мікроорганізмами з контрастними симбіотичними властивостями.

Доведено, що при симбіотичній взаємодії фізіолого-біохімічні властивості мікросимбіонта визначають особливості функціонування окисно-відновних ферментів у коренях рослини-хазяїна. При цьому активність гваяколпероксидази пов'язана із вірулентністю мікросимбіонта, а аскорбатпероксидази – з інтенсивністю азотфіксації.

Практичне значення отриманих результатів.

Виявлені в умовах *ex planta* відмінності метаболізму вуглеводів та структури ліпополісахаридів ризобій сої, контрастних за симбіотичними властивостями, можуть стати основою для створення тест-системи відбору активних штамів *B. japonicum*.

Встановлений прямий зв'язок між активністю нітрогеназного комплексу і вмістом у бактероїдах поліпептидів із молекулярними масами 160, 120 і 80 кДа дозволяє використовувати вказані протеїни як додаткові маркери ефективності симбіозу.

Особистий внесок здобувача полягає в самостійному пошуку та аналізі літератури за темою дисертації, плануванні і проведенні експериментів, аналізі та статистичній обробці одержаних результатів, підготовці до друку наукових робіт. Результати дисертаційної роботи отримані автором самостійно або спільно зі співробітниками ІФРГ НАН України, які є співавторами публікацій. Особистий внесок дисертанта складає понад 75 %.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові результати досліджень були представлені на Міжнародній науковій конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Кам'янець-Подільський, 2008), IV Міжрегіональній конференції молодих учених «Стратегія взаємодіяння мікроорганізмів и растений с окружающей средой» (Саратов, 2008), XII з'їзді товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Ужгород, 2009), IV Міжнародній конференції молодих науковців «Биология: от молекулы до биосферы» (Харьков, 2009), а також на наукових семінарах і щорічних звітах відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (2006–2009 рр.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 10 наукових праць, із них 6 статей у провідних фахових виданнях і 4 тез доповідей.

Об'єм та структура роботи. Дисертація викладена на 132 сторінках друкованого тексту й містить 18 рисунків і 11 таблиць. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, п'яти

розділів, у яких наведено результати досліджень, висновків та списку використаної літератури (173 найменування, із яких 96 – іноземні).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Перший розділ дисертації складається з дев'яти підрозділів, у яких викладено огляд вітчизняної та зарубіжної літератури стосовно фізіолого-біохімічних особливостей формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу, ролі генотипів макро- і мікросимбіонтів у забезпеченні його ефективності. Висвітлено проблему зниження симбіотичної активності бульбочкових бактерій, подано загальну характеристику традиційних та генно-інженерних методів отримання нових штамів ризобій. На основі аналізу й узагальнення літературних даних обґрунтовано актуальність проведення досліджень за темою дисертаційної роботи.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили з рослинами сої *Glycine max* (L.) Merr. сорту Мар'яна спільної селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, Селекційно-генетичного інституту й Інституту землеробства НААН України.

Для інокуляції насіння були використані активні і неактивні штами повільнорослих бульбочкових бактерій та Tn5-мутанти *Bradyrhizobium japonicum*. В якості активних використовували вихідний штам 646 та виробничий штам 6346 із музейної колекції азотфіксуючих мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАНУ, а неактивного – штам 604к, який був люб'язно наданий співробітником Кримського філіалу Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН України к.б.н. М.З. Толкачовим, Tn5-мутанти штаму 646 (9-1, 21-2, 107, 113) одержані методом транспозонового мутагенезу з використанням плазміди pSUP2021::Tn5 у відділі симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАНУ.

Вегетаційні дослідження проводили в умовах модельних експериментів на вегетаційному майданчику ІФРГ НАН України при вологості субстрату 60 % повної вологоємності (ПВ) і природному освітленні. Субстратом слугував промитий річковий пісок. Залежно від завдань дослідження по 6–8 рослин сої вирощували у посудинах, що містили від 0,7 до 10 кг піску, попередньо простерилізованих 20%-ним розчином H_2O_2 . Джерелом компонентів мінерального живлення була суміш Гельрігеля (Гродзинський, 1964), яка містила 0,25 н азоту (1 норма відповідає $708 \text{ мг } Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ на 1 кг субстрату) з додаванням мікроелементів В, Мо і Fe.

Перед посівом насіння сої стерилізували 15 хв 70%-ним розчином етанолу, промивали проточною водою та протягом 1 год інкубували в суспензії відповідних культур бульбочкових бактерій. Бактеріальний титр суспензій становив 10^9 клітин/мл. Повторність дослідів – 8-кратна.

Контролем слугували рослини, інокульовані вихідними та виробничими штамми.

Лабораторні дослідження з визначення вмісту білка у культуральному середовищі з мікроорганізмами здійснювали за методом Вітакера (1980) на спектрофотометрі BIORAD SmartSpecPlus (США). Бактерії відділяли від полісахаридів за методом Старченкова та ін. (1974). Звільнені від слизу клітини бульбочкових бактерій використовували для одержання білкових екстрактів за методикою Сараван (2004). Концентрацію білка в одержаних препаратах визначали за методом Бредфорда (1976). Для виділення ліпополісахаридів був використаний метод, описаний Магд (1988). Електрофоретичне розділення поліпептидів та ліпополісахаридів проводили у 8–15%-ному поліакриламідному гелі з 0,4 % додецилсульфат натрію за стандартною методикою Лемлі (1970). Аналіз гелів проводили за допомогою програми TotalLab версії 2.1.

Фізіолого-біохімічні властивості Tn5-мутантів *V. japonicum* вивчали згідно загальноприйнятих методів мікробіології і біохімії (Звягинцева, 1991; Селибер, 1962). Азотфіксувальну (нітрогеназну) активність (АФА) визначали ацетиленовим методом (Hardy, 1968; Крикунець, 1993). Активність гваяколпероксидази (ГП) (КФ 1.11.1.7) та аскорбатпероксидази (АП) (КФ 1.11.1.11) визначали згідно з методиками (Амако, 1994; Nakano, 1981). Визначення вмісту хлорофілів здійснювали за методикою (Wellburn, 1994).

Виділення білків із бульбочок, коренів та бактероїдів проводили за модифікованим методом, спираючись на рекомендації (Hurkman, 1986; Saravanan, 2004).

Масу надземної частини рослин, кореня і бульбочок, вимірювали в 6-кратних біологічних повторностях.

Статистичну обробку даних проводили за Доспеховим (1985) із використанням ПЕОМ і залученням пакетів спеціальних програм Microsoft Excel'07 та StatgraphicsPlus3.0.

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМІВ ТА TN5-МУТАНТІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* У КУЛЬТУРАЛЬНІЙ ФОРМІ

Враховуючи план досліджень, наша робота була розділена на два основні етапи. Перший включав характеристику фізіолого-біохімічних властивостей ризобій із різними симбіотичними властивостями ще в умовах чистої культури. Другий етап передбачав дослідження особливостей взаємодії цих мікроорганізмів із рослиною-хазяїном при формуванні та функціонуванні симбіозу різної ефективності.

Особливості росту культури та білкового складу штамів та Tn5-мутантів *V. japonicum* із відмінними симбіотичними властивостями.

Дослідження динаміки наростання культури мікроорганізмів і вмісту білка у середовищі їх вирощування показали, що інтенсивність поділу ризобій і кількість секретованого ними білка не залежить від симбіотичних

властивостей мікроорганізмів. Вихід культури досліджуваних штамів ризобій на стаціонарну фазу відбувається майже одночасно на 8–9 добу. Крім того, вміст білка у середовищі вирощування зменшується із віком культури, що може бути наслідком сповільнення поділу клітин та гальмування основних метаболічних реакцій у ризобій.

Електрофоретичне розділення загального пулу білків, виділених із клітин культури ризобій, показало, що ризобії, які за умов симбіозу характеризуються низькою азотфіксувальною активністю, мають і нижчий вміст протеїнів. Загальна кількість білка, виділеного із культури мало- і неактивних штамів, була майже в 1,5 раза нижчою, ніж в екстрактах високоактивних штамів і Tn5-мутантів. Якісний склад білків ризобій був ідентичним і лише у неактивного штаму *B. japonicum* 604к поліпептиди із молекулярною масою 15 кДа виявлено в слідових кількостях. Результати аналізу електрофореграм вказують на ідентичність структури білкового складу ризобій у асимбіотичній формі.

Отже, трансформація генів ризобій, які відповідають за симбіотичні властивості даних мікроорганізмів, не призводить до змін у складі протеїнів у чистій культурі.

Особливості метаболізму вуглеводів та їх похідних у штамів та Tn5-мутантів *B. japonicum*

Дослідження здатності ризобій у чистій культурі використовувати в якості субстрату вуглеводи показало, що всі активні штами і Tn5-мутанти однаковою мірою здатні засвоювати лише сечовину (табл. 1). Малоактивні у симбіозі з соєю мутанти 113 і 107 характеризувались відсутністю уреазної активності. Лише Tn5-мутант 9-1, який набув властивості фіксувати атмосферний азот у більш пізній період, порівняно з іншими активними ризобіями, додатково метаболізував триптофан. Активні штами 634б і 646 та Tn5-мутант 21-2 не утворювали ацетон, проте у Tn5-мутантів 113, 107, 9-1, а також штаму 604к спостерігалась слабка активність (ледь помітний слабо рожевий колір). У той же час мутанти штаму 646 *B. japonicum* 107 і 113, які після траспозонового мутагенезу втратили здатність до активної фіксації азоту, крім попередньо перерахованих вуглеводів, використовували як субстрат дисахариди мальтозу і мелібіозу, хоча непристосованість до використання дисахаридів є однією із особливостей повільнорослих культур ризобій.

Крім того, мутант 107 у якості джерела вуглецю досить активно утилізував глікозид амігдалин подібно до штаму 604к. Особливістю неактивного штаму 604к, який практично не фіксує атмосферний азот, була здатність до редукування не лише вище зазначених вуглеводів, але й ряду сахароспиртів – сорбітолу, інозитолу, манітолу, а також мелібіозу.

Здатність малоактивних ризобій використовувати як субстрат нехарактерні для активних повільнорослих бульбочкових бактерій вуглеводи вказує на наявність у них альтернативних шляхів метаболізму даних сполук,

що, на нашу думку, може обумовлювати полісахаридний склад бактерій, який, у свою чергу, визначає ступінь ефективності взаємодії партнерів симбіозу.

Таблиця 1

Фізіолого-біохімічні властивості штамів та Tn5-мутантів
штаму *B. japonicum* 646

Штам	Сечовина (уреаза)	Триптофан (дезаміназа)	Продукція ацетону	Мальтоза	Мелбіоза	Амигдалин	Інозитол	Сорбітол	Манітол
Активні штами і Tn5-мутанти									
634б	+	-	-	-	-	-	-	-	-
646	+	-	-	-	-	-	-	-	-
21-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9-1	+	+	±	-	-	-	-	-	-
Неактивний штам і малоактивні Tn5-мутанти									
604к	+	+	±	+	+	+	+	+	+
107	-	+	±	+	+	+	-	-	-
113	-	+	±	+	-	-	-	-	-

Примітка. «+» – позитивна реакція, «-» – негативна реакція. «±» – слабка позитивна реакція

Ліпополісахаридні профілі штамів і Tn5-мутантів бульбочкових бактерій *B. japonicum*

Як уже було відмічено, мутанти ризобій, дефектні за синтезом полісахаридів, не здатні формувати ефективний симбіоз. Причому, основну роль відіграють структурні ліпополісахариди (ЛПС), які містять спеціалізовану інформацію про симбіотичний потенціал бульбочкових бактерій. У результаті перевірки складу ЛПС високо- та малоактивних штамів і транспозонових мутантів за допомогою електрофорезу ЛПС 5-добових культур ризобій сої встановлено подібність кількісного і якісного складу ЛПС I та ЛПС II у активних штамів і мутантів. Ймовірно, що у період активного поділу клітин (5 доба) не всі компоненти ліпополісахаридного складу можуть бути повністю сформовані. Тому нами проведено електрофоретичне розділення ЛПС у період виходу культури на стаціонарну фазу розвитку (9 доба) (рис.1).

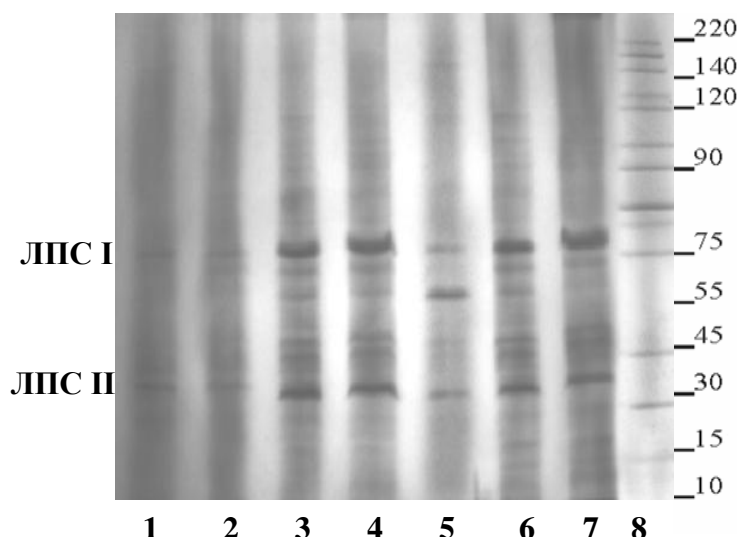


Рис. 1. Електрофореграма ліпополісахаридів, екстрактованих із клітин штамів та Tn5-мутантів бульбочкових бактерій *B. japonicum*, вирощених в умовах чистої культури (9-добова культура). Штам: 604к (1), 646 (3), 634б (7); Tn5-мутант: 21-2 (4), 9-1 (6), 113 (2), 107 (5); суміш маркерних білків (Fermentas, Латвія) (8)

Показано, що структура зони ЛПС I усіх досліджуваних штамів і Tn5-мутантів на 9 добу розвитку культури була схожою. Проте профіль зони ЛПС II досліджуваних ризобій відрізнявся. Активні мутанти 21-2 і 9-1 мали однаковий вміст легкого та важкого компонентів на відміну від штамів 634б і 646, у яких легкий компонент був у більшій кількості. У неактивного штаму і малоактивних мутантів спостерігали відмінності в зоні ЛПС II, яка, як уже було відмічено, відповідає за ефективність симбіотичної взаємодії і розвиток функціональної азотфіксуючої ділянки. Так, у штаму 604к був відсутній середній компонент. На 9 добу в малоактивних мутантів з'являвся середній компонент зони ЛПС II і її профіль відповідав будові зони ЛПС II у високоактивних штамів. Разом із тим, за кількісним вмістом ЛПС малоактивні мутанти 107 та 113 були більше схожі до неактивного штаму 604к, ліпополісахаридні профілі якого за відношенням до активних штамів і мутантів характеризувалися меншим вмістом як ЛПС I, так і ЛПС II.

Таким чином, отримані результати дозволяють припустити, що точкові мутації геному бульбочкових бактерій сої призводять до суттєвих змін у їх здатності метаболізувати вуглеводи, внаслідок чого може порушуватися структура ліпополісахаридного складу мікросимбіонта і знижуватись ефективність його симбіотичної взаємодії з рослиною-хазяїном. Підтвердженням цього слугує той факт, що набір вуглеводів, які здатні засвоювати активні ризобії, а також якісний і кількісний склад їх ліпополісахаридів є ідентичними. У той же час ліпополісахаридні профілі неактивного штаму 604к і малоактивних мутантів 107 і 113 та спектр засвоєваних ними вуглеводів є індивідуальними для кожного з вказаних мікроорганізмів.

При вивченні широкого спектру досліджуваних модельних систем, створених за участю симбіонтів із контрастними симбіотичними характеристиками, відзначені критерії можуть слугувати основою експрес-методу для відбору перспективних штамів бульбочкових бактерій.

ФОРМУВАННЯ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМ СОЇ ЗА ІНОКУЛЯЦІЇ ШТАМАМИ І Tn5-МУТАНТАМИ *V. JAPONICUM* ІЗ РІЗНИМИ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Вивчення модельних систем, створених за участю партнерів із модифікованими симбіотичними властивостями, зокрема Tn5-мутантів ризобій, є одним із шляхів дослідження фізіологічних особливостей симбіозу. Тому наступним етапом нашої роботи було вивчення фенотипових ознак симбіотичної взаємодії, а саме наростання вегетативної маси, кількості та маси корневих бульбочок, азотфіксувальної активності, залежно від фізіолого-біохімічних властивостей досліджуваних ризобій.

Нами відмічено, що інокуляція рослин сої високоактивними штамми 6346 і 646 та Tn5-мутантами 21-2, 9-1 стимулювала наростання надземної маси упродовж усього періоду проведення досліджень. У фазу бутонізації (40 доба) найвищі показники маси надземної частини зафіксовані у варіантах з інокуляцією штамми 646, 6346 та мутантами 21-2, 9-1. При бактеризації насіння малоактивним штамом 604к та Tn5-мутантами 107, 113 наростання вегетативної маси відбувалось лише до фази трьох справжніх листків. Після вичерпання запасів мінерального азоту, у фазу бутонізації спостерігалось зниження маси надземної частини рослин. Ця тенденція зберігалася до кінця спостереження і у фазу утворення бобів (61 доба) відзначали значне відставання у розвитку цих рослин у порівнянні із рослинами тих варіантів, де застосовували активні штами і траспозонові мутанти (рис. 2).

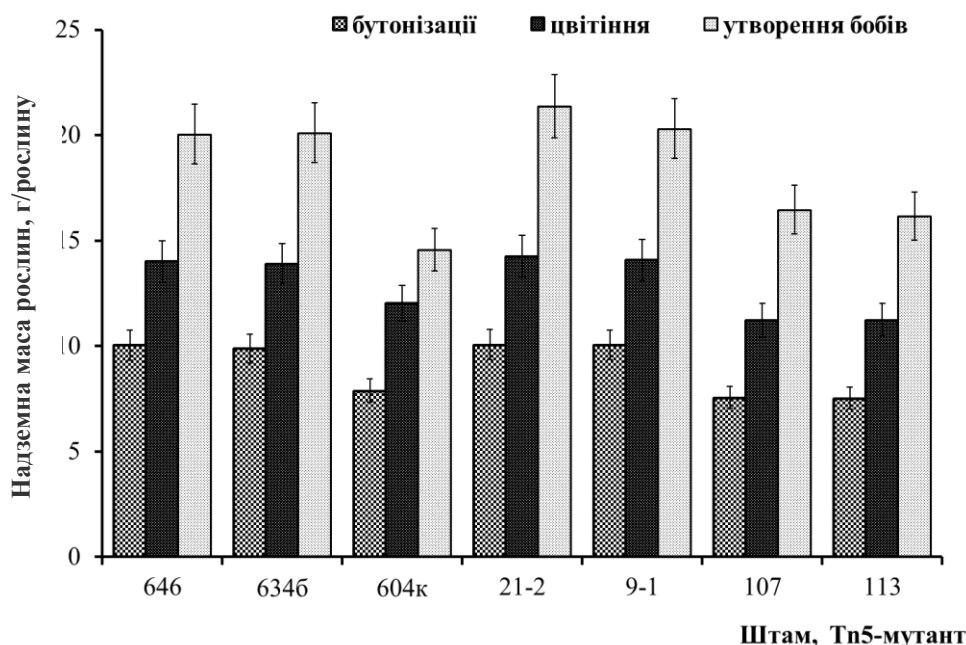


Рис. 2. Надземна маса рослин сої, інокульованої штамми і Tn5-мутантами *V. japonicum*

При використанні мікросимбіонтів сої із різними симбіотичними характеристиками, ми спостерігали відмінності у динаміці формування

симбіотичного апарату рослин. Перші бульбочки на корінні сої були сформовані на 15 добу після появи сходів.

Подальший аналіз показав інтенсифікацію бульбочкоутворення на рослинах усіх досліджуваних варіантів (рис. 3).

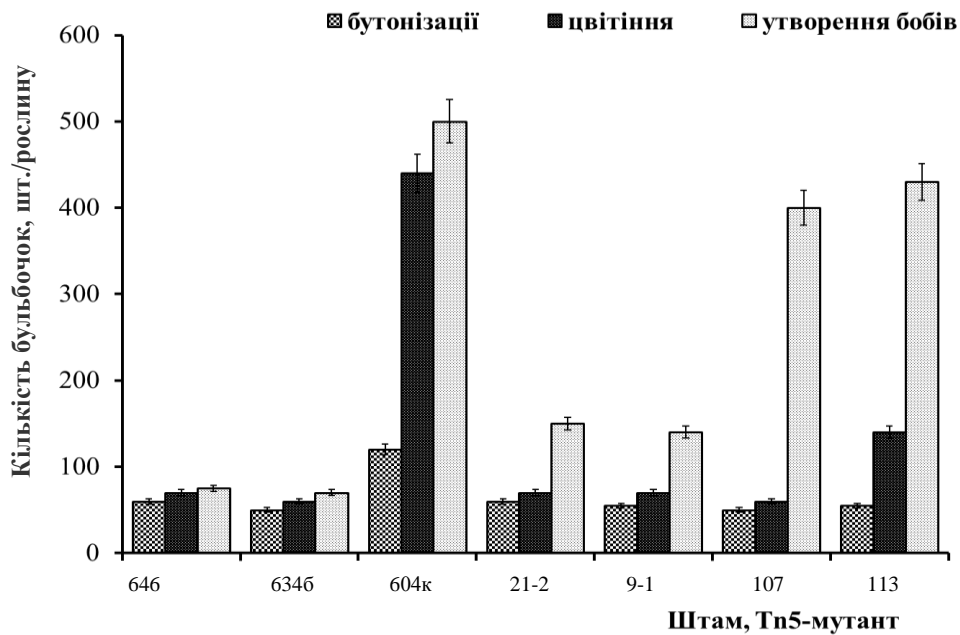


Рис. 3. Кількість бульбочок на коренях сої, інюкульованої штамами і Tn5-мутантами *V. jarrowii*

Разом із тим у варіантах з інюкляцією штамом 646 та Tn5-мутантами *V. jarrowii* 21-2, 9-1 і 107 зниження нодуляційної активності спостерігалось вже у фазу утворення бобів, на відміну від рослин, бактеризованих неактивним штамом 604к та Tn5-мутантом 113, у яких процес утворення бульбочок і надалі проходив інтенсивно.

При інюкляції сої високоактивними штамами і мутантами протягом усього періоду досліджень спостерігали постійне збільшення маси бульбочки (рис. 4).

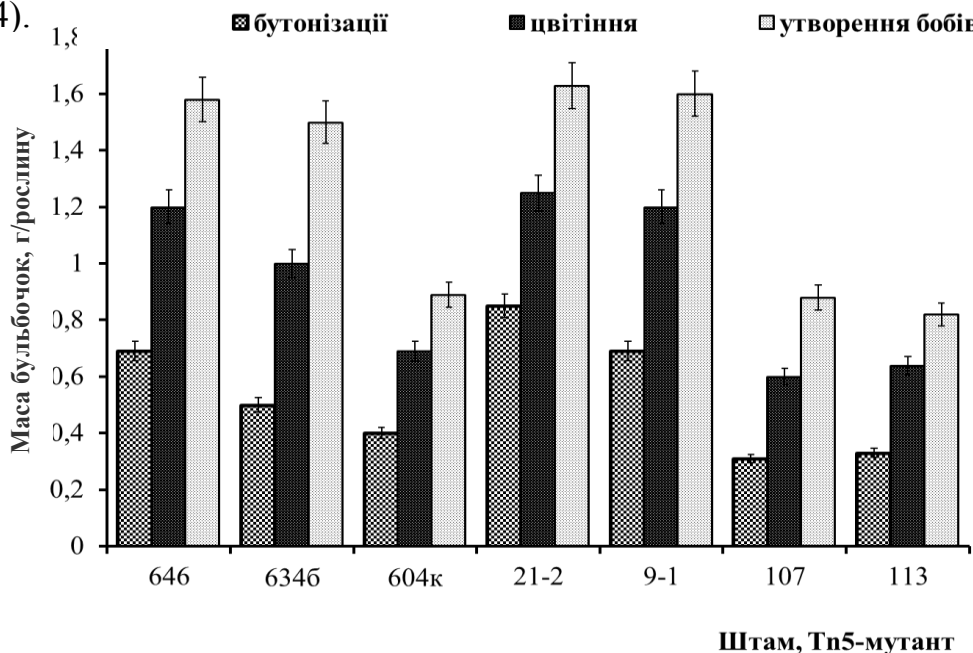


Рис. 4. Маса бульбочок на коренях сої, інюкульованої штамами і Tn5-мутантами *V. jarrowii*

Обробка насіння сої малоактивними ризобіями також приводила до збільшення маси бульбочок на рослині, проте в даному випадку за рахунок їх більшої кількості.

При дослідженні азотфіксувальної активності було відмічено, що симбіотичні системи, сформовані ефективними штамми та Tn5-мутантами, починали фіксувати атмосферний азот на 18 добу після появи сходів. На 25 добу штам 646 та Tn5-мутанти 9-1 та 21-2 суттєво відрізнялись між собою за рівнем АФА, утворених ними симбіотичних систем при цьому значно (в 5–20 разів) перевищували за цим показником малоактивні Tn5-мутанти 107 і 113.

При інокуляції сої вихідним штамом *V. japonicum* 646 найвищий рівень азотфіксації корневих бульбочок було відзначено у фазу цвітіння (50 доба після появи сходів) (рис. 5).

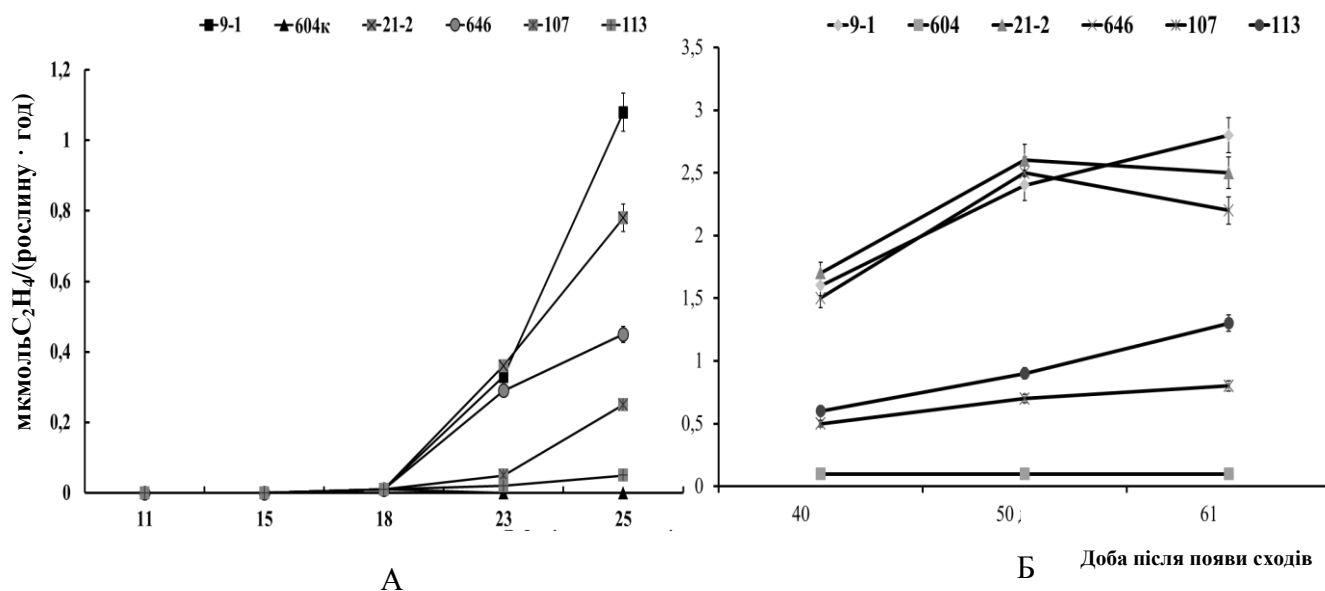


Рис. 5. Динаміка загальної азотфіксувальної активності бульбочок сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *V. japonicum* різної ефективності (А – початковий період формування симбіозу; Б – період активного функціонування симбіозу)

У фазу утворення бобів спостерігали зниження даного показника у штаму 646 та Tn5-мутанта 21-2, які характеризувались постійним зростанням інтенсивності фіксації азоту протягом усього періоду спостережень. Разом із тим ацетиленвідновлювальна активність бульбочок сої, інокульованої Tn5-мутантом 113, збільшилась утричі у фазу цвітіння, порівняно із фазою бутонізації і на 50 % була вищою у фазу утворення бобів, порівняно із фазою цвітіння. Цікавим виявився той факт, що транспозоновий мутант 9-1, який у результаті мутагенезу отримав здатність до засвоєння триптофану та редукції ацетону, у фазу утворення бобів характеризувався відмінною здатністю до симбіотичної активності в порівнянні з штамом 646 та Tn5-мутантом 21-2.

Таким чином, за результатами досліджень, нами показано, що фізіолого-біохімічні властивості ризобій впливають на ефективність симбіотичної взаємодії ризобій із рослиною-хазяїном.

ОСОБЛИВОСТІ БІЛКОВОГО СКЛАДУ БУЛЬБОЧОК СОЇ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ ШТАМАМИ ТА TN5-МУТАНТАМИ З РІЗНИМИ СИМБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Щоб пояснити, який компонент симбіотичної системи – рослинний чи бактеріальний – більшою мірою впливає на прояв фенотипових ознак ефективності симбіозу, нами було проведено аналіз білкового складу бульбочок сої, попередньо розділених на рослинну та бактероїдну фракції. Крім того, порівняння білкового складу бактероїдів зі складом білків ризобій у чистій культурі дасть можливість зрозуміти, чи відбувається в бульбочкових бактеріях експресія генів, відповідальних за фіксацію і метаболізм атмосферного азоту, поза їх співіснуванням із рослинами.

Особливості білкового складу бактероїдів і рослинної частини бульбочок сої, інфікованої штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* різної активності

На рисунку 6 представлено білковий склад рослинної частини бульбочок сої у фазу цвітіння. Як видно з даного рисунку, значних відмінностей у складі поліпептидів не виявлено. Лише відмічено збільшення низькомолекулярних білків із масою 15 кДа пропорційно активності штаму-інокулянта.

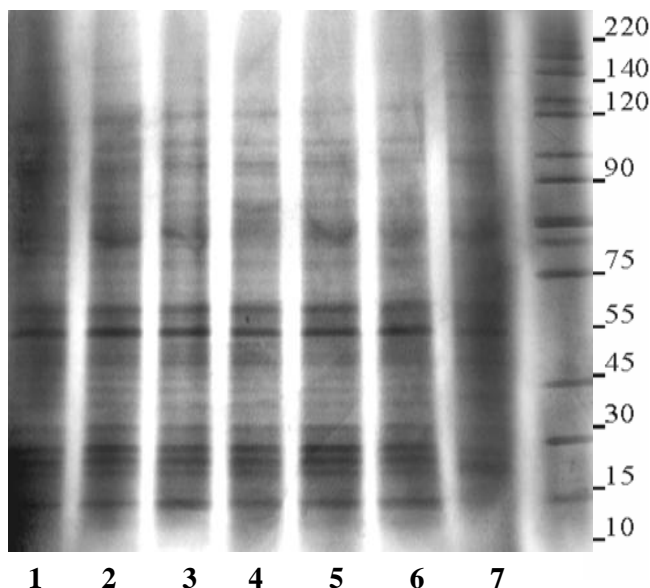


Рис. 6 Електрофоретичне розділення екстракту загального білка рослинної частини бульбочок сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* різної ефективності (фаза цвітіння). Штам: 646 (1), 604к (2); Tn5-мутант: 21-2 (3), 107 (4), 9-1 (5), 113 (6), без інокуляції (7), суміш маркерних білків (Fermentas, Латвія) (8)

Згідно літературних джерел, у даному діапазоні молекулярних мас знаходиться рослинний білок – легемоглобін, який створює кисневий бар'єр і забезпечує оптимальні умови для роботи нітрогенази у бактероїдах. Таким чином, ми можемо констатувати, що однією з особливостей фізіологічної реакції рослини на інокуляцію ризобіями різної ефективності є синтез

протеїнів, які забезпечують відповідні умови функціонування мікросимбіонта.

При проведенні електрофорезу білкових екстрактів бактероїдів, утворених штамми різної активності, нами виявлені значні відмінності у кількісному та якісному складі білків (рис. 7)

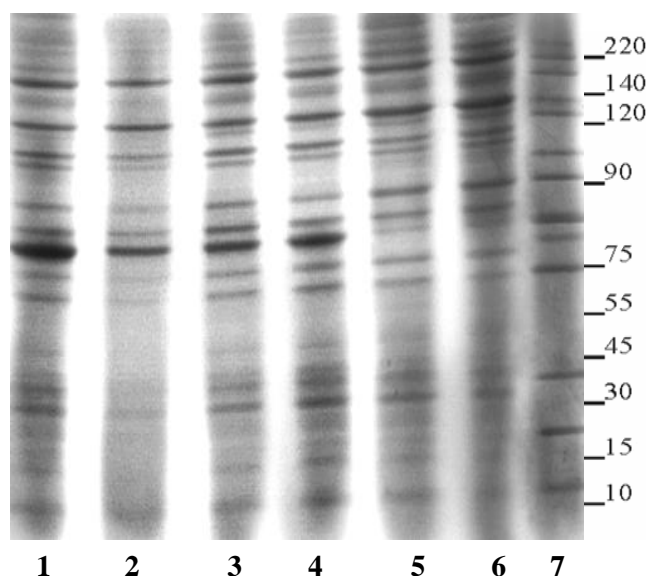


Рис. 7. Електрофореграма білків, екстрагованих із бактероїдів бульбочок сої, інокульованої штамми та Тп5-мутантами *V. jaronicum* різної ефективності (фаза цвітіння). Штам: 646 (1), 604к (2); Тп5-мутант: 9-1 (3), 21-2 (4), 113 (5), 107 (6), суміш маркерних білків (Fermentas, Латвія) (7)

Для бактероїдів, утворених неактивним штамом 604к, був характерним менший вміст як високо-, так і низькомолекулярних білків. Крім того, на гелях виявлені в слідових кількостях високомолекулярні поліпептиди (160 і 120 кДа) і низькомолекулярні (15 кДа), низьку кількість яких ми спостерігали ще в умовах чистої культури. Відмінною рисою малоактивних Тп5-мутантів 107 і 113 був нижчий вміст поліпептидів із молекулярною масою 80 кДа.

Таким чином, ми прийшли до висновку, що вміст поліпептидів із молекулярними масами 160, 120, 80 і 15 кДа у бактероїдній формі пов'язаний з ефективністю роботи нітрогеназного комплексу. Білковий склад бактероїдів чітко відображає активність симбіотичної системи і дозволяє виявити ключові компоненти функціонування нітрогеназного комплексу, які не вдається виявити в умовах чистої культури. Отримані результати передбачають можливість використання даних протеїнів як маркерів ефективного симбіозу.

АКТИВНІСТЬ ОКИСНО-ВІДНОВНИХ ФЕРМЕНТІВ У СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМАХ СОЯ – *V. JARONICUM* ЗАЛЕЖНО ВІД ОСОБЛИВОСТЕЙ ФУНКЦІОНУВАННЯ АЗОТФІКСУВАЛЬНОГО АПАРАТУ

Відомо, що важливим компонентом відповіді рослини на інфікування симбіотичними бактеріями є продукування і знешкодження активних форм кисню. Багато дослідників вважає, що в регуляції бульбочкоутворення та функціонуванні симбіотичного апарату бобових важливу роль відіграють дві форми пероксидази: аскорбат- та гваяколпероксидази.

Дослідження активності гваяколпероксидази (рис. 9А) у коренях рослин сої показали, що вона була високою у всіх без винятку інокульованих варіантах, порівняно із контролем без інокуляції.

Підвищення рівня активності ГП у коренях бактеризованих рослин було відмічено вже на 15 добу після появи сходів. Хоча симбіотичні характеристики досліджуваних штамів і Tn5-мутантів *V. jarrowicum* значною мірою відрізнялись, динаміка активності ГП відповідала інтенсивності бульбочкоутворення. У бульбочках, утворених штамами 604к і 646 та малоактивними Tn5-мутантами 107 і 113, максимальне значення активності ГП спостерігалось на 18 добу після появи сходів, Tn5-мутантом 21-2 – на 15 добу, а Tn5-мутантом 9-1 – на 23 добу, що прямо корелювало з їх нодуляційною активністю ($r = 0,83$). На 25 добу відзначали зменшення інтенсивності бульбочкоутворення, а також зниження активності ГП у рослинах більшості варіантів.

Динаміка активності аскорбатпероксидази мала дещо інший характер (рис. 9Б).

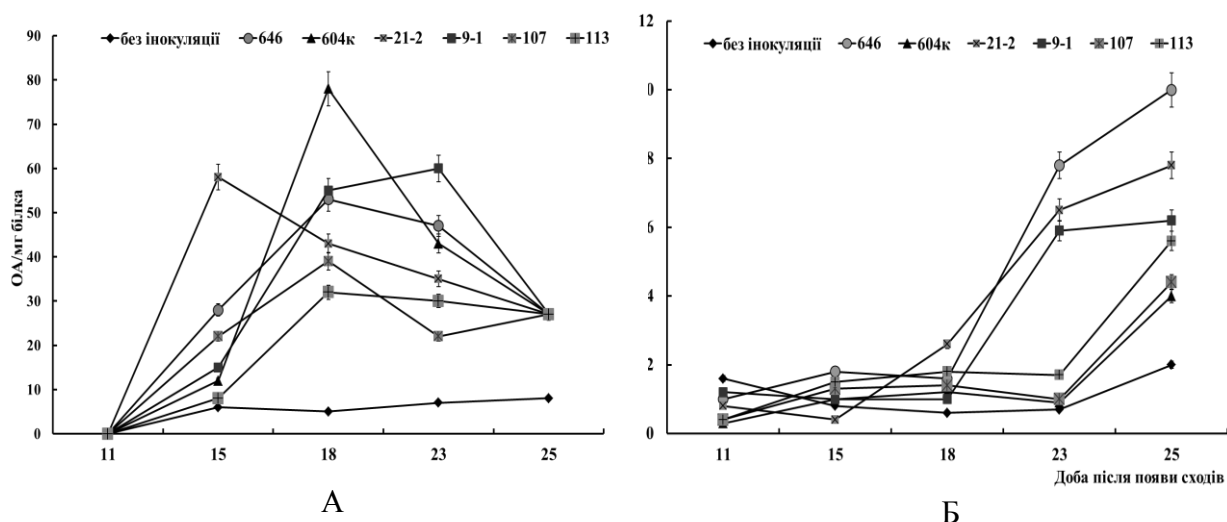


Рис. 9. Активність окисно-відновних ферментів у коренях сої за інокуляції різними за активністю штамами та Tn5-мутантами *V. jarrowicum* (А – активність гваяколпероксидази; Б – активність аскобатпероксидази)

Так, суттєві зміни в активності даного фермента в залежності від інокулянта спостерігали лише із 18 доби після появи сходів, тобто з моменту, коли симбіотичні системи соя – *V. jarrowicum* починали фіксувати атмосферний азот. Найвищу активність АП спостерігали у рослин, інокульованих штамами та транспозоновими мутантами, що характеризувались високою активністю азотфіксації. На 23 та 25 добу рівень АП у коренях інокульованої цими ризобіями сої перевищував контроль та варіанти із застосуванням неактивного штаму *V. jarrowicum* 604к, а також малоактивних Tn5-мутантів 107 і 113 в 4–6 та 1,5–2 рази, відповідно. Нами

відмічено прямий зв'язок між активністю АП та нітрогенази на 23 ($r = 0,92$) та 25 ($r = 0,98$) доби після появи сходів.

Виходячи з отриманих результатів, можна зробити висновок, що реакція компонента антиоксидантної системи рослин гваяколпероксидази на інокуляцію є схожою із реакцією на проникнення патогенів. Разом із тим, інший ключовий фермент антиоксидантної системи – аскорбатпероксидаза – активно забезпечує ефективну роботу нітрогеназного комплексу бактерій і активність даного ферменту тісно корелює з АФА мікросимбіонта.

ВИСНОВКИ

У процесі виконання дисертаційної роботи на модельних дослідах із залученням штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* різного спектру активності встановлено вплив фізіолого-біохімічних особливостей ризобій на фізіологічну відповідь рослини-хазяїна, яка проявляється у формуванні фенотипових ознак симбіотичних систем сої.

1. Показано, що в умовах *ex planta* у штамів та Tn5-мутантів бульбочкових бактерій сої кількісний і якісний склад білків, як правило, не залежить від їх симбіотичних властивостей.

2. Відмічено, що якісний і кількісний склад ліпополісахаридів для усіх активних штамів і Tn5-мутантів бульбочкових бактерій є ідентичним, у той час як ліпополісахаридні профілі неактивного штаму 604к і малоактивних мутантів 107 та 113 мають індивідуальні структурні особливості.

3. Встановлено здатність неактивного штаму 604к та малоактивних мутантів використовувати як субстрат ширший спектр органічних сполук у порівнянні з активними ризобіями, що вказує на наявність альтернативних шляхів залучення органічних сполук до метаболізму.

4. Відмічено залежність фенотипових ознак ефективності комплементарної взаємодії макро- і мікросимбіонтів, таких як показники кількості і маси корневих бульбочок, азотфіксувальної активності, вегетативної продуктивності рослин, від властивостей ризобій.

5. Показано, що формування пулу протеїнів у рослинній частині бульбочки не залежить від симбіотичних властивостей мікроорганізмів, що свідчить про однаковий перебіг фізіологічних процесів при формуванні симбіотичних систем ризобіями з контрастними симбіотичними властивостями.

6. Виявлено зміни білкового профілю бактероїдів бульбочок сої, які визначають азотфіксувальну активність симбіотичної системи, ідентифіковано білкові компоненти розміром 160, 120, 80, 15 кДа що, очевидно, контролюють ефективність функціонування нітрогеназного комплексу.

7. Показано, що симбіотичні властивості мікросимбіонта визначають активність окисно-відновних ферментів у коренях рослини-хазяїна. Зокрема, рівень активності гваяколпероксидази пов'язаний із нодуляційними властивостями мікросимбіонта, тоді як рівень активності

аскорбатпероксидази корелює з інтенсивністю роботи нітрогеназного комплексу.

8. Відзначені особливості метаболізму вуглеводів та структури ліпополісахаридів ризобій *ex planta*, а також зв'язок між активністю нітрогенази і вмістом у бактероїдах поліпептидів (160, 120, 80 і 15 кДа) можуть бути використані для оцінки ефективності симбіотичних систем.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. *Маменко П.М.* Білковий склад бульбочок сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності / П.М. Маменко, С.Я. Коць, Г.М. Дрозденко та ін. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т. 40, № 6. – С. 525–531.

2. *Коць С.Я.* Перспективність використання Tn5-мутантів ризобій при виготовленні бактеріальних добрив / С.Я. Коць, С.М. Маліченко, П.М. Маменко, Г.М. Дрозденко // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2008. – Вип. 8. – С. 32–39.

3. *Дрозденко Г.М.* Особливості білкового складу штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* різної активності / Г.М. Дрозденко, П.М. Маменко, С.М. Маліченко та ін. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 5. – С. 423–429.

4. *Дрозденко Г.М.* Активність окисно-відновних ферментів і білковий склад коренів сої у період формування та на початку функціонування симбіотичних систем соя – *Bradyrhizobium japonicum* / Г.М. Дрозденко, П.М. Маменко, С.Я. Коць // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 1 (28). – С. 18–26.

5. *Кондратюк Ю.Ю.* Порівняльний аналіз методів екстрагування та розділення білків для протеомного дослідження білкових профілів коренів і бульбочок сої / Ю.Ю. Кондратюк, П.М. Маменко, А.С. Левішко, Г.М. Дрозденко, С.Я. Коць // Физиология и биохимия культ. растений. – 2013. – Т. 45. №3. – С. 222–229.

6. *Маменко П.М.* Ліпополісахаридний склад і метаболізм вуглеводів у контрастних за симбіотичними властивостями штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum*. / П.М. Маменко, Г.М. Дрозденко, Л.Ю. Соболенко, Н.А. Воробей, Ю.Ю. Кондратюк // Физиология и биохимия культ. растений. – 2013, Т. 45. №6 – С. 537–543.

7. *Дрозденко Г.М.* Дослідження білкового складу Tn-5 мутантів *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності / Г.М. Дрозденко, С.Я. Коць, В.М. Заєць // Актуальні проблеми ботаніки та екології. Матеріали міжнародної конференції молодих учених (13-16 серпня 2008р., м. Кам'янець-Подільський). – Київ, 2008. – С. 220.

8. *Маменко П.Н.* Динаміка белкового состава клубеньков сои, инокулированной Tn-5 мутантами *Bradyrhizobium japonicum* / П.Н. Маменко Г.Н. Дрозденко, А.В. Жемойда // Стратегия взаимодействия

микроорганизмов и растений с окружающей средой. Материалы IV Межрегиональной конференции молодых ученых (14-16 октября 2008, г. Саратов). – Саратов: Научная книга, 2008. – С. 60.

9. Дрозденко Г.Н. Белковый состав штаммов и Tn-5 мутантов *Bradyrhizobium japonicum* и их бактериоидов / Г.Н. Дрозденко, П.Н. Маменко // Біологія: від молекули до біосфери. Матеріали IV Міжнародної конференції молодих науковців (17-21 листопада 2009., м. Харків). – Харків: ППВ “Нове слово”, 2009. – С. 372.

10. Дрозденко Г.М. Особливості білкового та ліпополісахаридного складу штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* різної активності / Г.М. Дрозденко, П.М. Маменко, М.В. Волкогон, С.Я. Коць // ПХ з'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (25-30 травня 2009 р., Ужгород). – Ужгород: Патент, 2009. – С.49.

АНОТАЦІЯ

Дрозденко Г. М. Зв'язок фенотипових ознак ефективності симбіозу сої із фізіолого-біохімічними характеристиками штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum*. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин (біологічні науки). – Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, 2014.

Дисертація присвячена вивченню впливу фізіологічних і біохімічних властивостей ризобій на особливості реакції рослини-хазяїна за інокуляції, які відображаються в певних фенотипових ознаках симбіотичних систем сої. Вперше показано, що трансформація геному ризобій сої у результаті транспозонового мутагенезу призводить до суттєвих змін у метаболізмі вуглеводів, внаслідок чого може порушуватися ліпополісахаридний склад мікросимбіонта і знижуватись ефективність його симбіотичної взаємодії з рослиною-хазяїном. Виявлено, що набір вуглеводів, які здатні засвоювати активні ризобії, а також якісний і кількісний склад їх ліпополісахаридів є ідентичним. Ліпополісахаридні профілі неактивного штаму і малоактивних мутантів та спектр засвоюваних ними вуглеводів є індивідуальними для кожного з вказаних мікроорганізмів. Встановлено, що у бактероїдах бульбочок сої вміст поліпептидів із молекулярною масою 160 кДа збільшується пропорційно підвищенню азотфіксувальної активності симбіозу, що підтверджує участь даних протеїнів у роботі нітрогеназного комплексу.

Вперше показано, що формування пулу протеїнів у рослинній частині бульбочки не залежить від симбіотичних властивостей ризобій, що свідчить про однаковий перебіг фізіологічних процесів при формуванні симбіотичних систем мікроорганізмами з контрастними симбіотичними властивостями.

Доведено, що при симбіотичній взаємодії фізіолого-біохімічні властивості мікросимбіонта визначають особливості функціонування окисно-відновних ферментів у коренях рослини-хазяїна: активність

гваяколпероксидази пов'язана із вірулентністю мікросимбіонта, а аскорбатпероксидази – з інтенсивністю азотфіксації.

Встановлений прямий зв'язок між активністю нітрогеназного комплексу і вмістом у бактероїдах поліпептидів із молекулярними масами 160, 120, 80 та 15 кДа дозволяє використовувати вказані протеїни як додаткові маркери ефективності симбіозу.

Дослідження метаболізму вуглеводів та складу ліпополісахаридів ризобій сої із контрастними симбіотичними характеристиками в умовах *ex planta* в подальшому можуть бути використані як основа тест-системи для відбору активних штамів і Tn5-мутантів *B. japonicum* в умовах чистої культури.

Ключові слова: азотфіксація, бобово-ризобіальний симбіоз, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутагенез, протеїни, ліпополісахариди, окисно-відновні ферменти.

АННОТАЦІЯ

Дрозденко Г.Н. Связь фенотипических признаков эффективности симбиоза сои с физиолого-биохимическими характеристиками штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum*. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 – физиология растений (биологические науки). – Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев, 2014 .

Диссертация посвящена изучению влияния физиологических и биохимических свойств ризобий на особенности реакции растения-хозяина на инокуляцию, которые отображаются в определенных фенотипических признаках симбиотических систем сои.

Впервые показано, что трансформация генома ризобий сои в результате транспозонного мутагенеза приводит к существенным изменениям в метаболизме углеводов, вследствие чего может нарушаться липополисахаридный состав микросимбионта и снижаться эффективность его симбиотического взаимодействия с растением-хозяином. Отмечено, что набор углеводов, которые способны усваивать активные ризобии, а также качественный и количественный состав липополисахаридов для всех активных штаммов и Tn5-мутантов клубеньковых бактерий идентичен, в то время как липополисахаридные профили неактивного, штамма и малоактивных мутантов имеют индивидуальные структурные особенности.

Показано, что формирование пула протеинов в растительной части клубенька не зависит от симбиотических свойств ризобий, что свидетельствует о схожем протекании физиологических процессов при формировании симбиотических систем микроорганизмами с контрастными симбиотическими свойствами. Установлено, что количественный и качественный состав белков, экстрагированных из клубеньков сои, в значительной степени зависит от фазы ее развития и активности

симбиотического аппарата. Отмечено, что в бактериоидах клубеньков сои содержание полипептидов с молекулярной массой 160 кДа увеличивается пропорционально повышению азотфиксирующей активности симбиоза, что подтверждает участие данных протеинов в работе нитрогеназного комплекса.

Доказано, что при симбиотическом взаимодействии физиолого-биохимические свойства микросимбионта определяют особенности функционирования окислительно-восстановительных ферментов в корнях растения-хозяина. Инокуляция растений способствует существенному повышению активности гваяколпероксидазы, которая, будучи высокой на этапе образования симбиоза, снижается с его формированием. Уровень активности этого фермента зависит от нодуляционной активности микросимбионта. С началом азотфиксации в корнях растений сои активизируется работа аскорбатпероксидазы, активность которой в дальнейшем коррелирует с интенсивностью работы азотфиксирующего аппарата. Таким образом, полученные данные об особенностях функционирования антиоксидантной системы растений свидетельствуют о ее участии в регулировании работы симбиотического аппарата, что является важным фенотипическим проявлением симбиотических свойств исследуемых микросимбионтов.

Установленная прямая связь между активностью нитрогеназного комплекса и содержанием в бактериоидах полипептидов с молекулярными массами 160, 120, 80 и 15 кДа позволяет использовать указанные протеины как дополнительные маркеры эффективности симбиоза.

Исследования метаболизма углеводов и состава липополисахаридов ризобий сои с контрастными симбиотическими характеристиками в условиях *ex planta* могут быть использованы для создания тест-системы по отбору активных штаммов и Tn5-мутантов *B. japonicum* в условиях чистой культуры.

Ключевые слова: азотфиксация, бобово-ризобиальный симбиоз, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутагенез, протеины, липополисахариды, окислительно-восстановительные ферменты.

ANNOTATION

Drozdenco G.M. The feedback between phenotypic traits of soybean symbiotic efficiency and physiological and biochemical characteristics of strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. – Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences (Ph.D.) degree in speciality 03.00.12 – plant physiology. – Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2014.

Dissertation is devoted to the studying of the influence of physiological and biochemical characteristics of rhizobia on the features of response of the host plant on inoculation that appear in some phenotypic traits of soybean symbiotic systems. It was shown for the first time that the genome transformation of soybean rhizobia due to Tn5-mutagenesis leads to the significant changes in the metabolism of carbohydrates, thus the lipopolysaccharide composition of microsymbiont can

be changed and the effectiveness of its symbiotic interaction with the host plant can be reduced. The identity of the set of carbohydrates that are able to be assimilated by active rhizobia as well as qualitative and quantitative composition of their lipopolysaccharides was revealed. At the same time the lipopolysaccharide profiles of inactive strain and low-active mutants and the spectrum of assimilated by them carbohydrates is individual for each of these microorganisms. It was found that the content of polypeptides with molecular weights of 160 kDa in bacteroids of soybean nodules increases in proportion to rise of the nitrogen fixing symbiotic activity which confirms the participant of data proteins in the functioning of nitrogenase complex.

It was shown for the first time that the forming of the protein pool in plant part of nodule does not depend on symbiotic properties of rhizobia indicating that the courses of physiological processes at the formation of symbiotic systems with the microorganisms with contrasting symbiotic properties are identical.

It was proved that the physiological and biochemical properties of microsymbiont define the features of redox enzymes functioning in the roots of the host plant at the time of symbiotic interaction. Meanwhile, the activity of guaiacol peroxidase is connected with microsymbiont virulence and ascorbate peroxidase activity \square with the intensity of nitrogen fixation.

The established direct link between nitrogenase complex activity and content of bacteroid polypeptides with molecular weights of 160, 120, 80 and 15 kDa allows the use of the protein as an additional marker of symbiotic efficiency.

The investigation of carbohydrate metabolism and lipopolysaccharide content of rhizobia with contrast symbiotic characteristics in *ex planta* conditions in the future can be used as a basis of test system for selection of active strains and Tn5-mutants of *B. japonicum* in pure culture conditions.

Key words: nitrogen fixation, legume-rhizobia symbiosis, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-mutagenesis, proteins, lipopolysaccharides, redox enzymes.