

УДК 581.557 : 57.04
КП
№ держреєстрації 0115U003995
Інв. №
Шифр 424

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ
(ІФРГ НАНУ)

03022, м. Київ,
вул. Васильківська, 31/17
тел. 257-51-60
факс. 257-51-50

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
директор ІФРГ НАН України
академік НАН України
_____ В.В. Моргун
„___” _____ 2020 р.

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Вивчити реакцію бобово-ризобіального симбіозу на дію біотичних та
абіотичних чинників

(заключний)

Керівник НДР
Член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор

С.Я. Коць

2020 рік

Результати цієї роботи розглянуто Вченою Радою ІФРГ НАН України
протокол № ___ від « ___ » _____ 2020 року

СПИСОК АВТОРІВ

керівник НДР член-кореспондент НАН України доктор біол. наук, професор	_____	С. Я. Коць (реферат, вступ, розділи 1–7, висновки, рекомендації)
	(підпис)	
Відповідальний виконавець старший наук. співроб. доктор. біол. наук	_____	О.В. Кириченко (розділи 1.1, 3.6., висновки)
	(підпис)	
Відповідальний виконавець старший наук. співроб. канд. біол. наук	_____	Н.А. Воробей (розділи 1.3, 6, висновки, рекомендації)
	(підпис)	
Відповідальний виконавець старший наук. співроб. канд. біол. наук	_____	Т.П. Маменко (розділи 1.2, 4.1, 5, висновки)
	(підпис)	
Відповідальний виконавець старший наук. співроб. канд. біол. наук	_____	Н.М. Мельникова (розділи 1.1, 3.1–3.5, висновки)
	(підпис)	
Відповідальний виконавець старший наук. співроб. канд. біол. наук	_____	Л.М. Михалків (розділи 1.2, 4.2, висновки)
	(підпис)	
Відповідальний виконавець науковий співроб. канд. біол. наук	_____	К.П. Кукол (розділи 1.3, 7.6–7.8, висновки, рекомендації)
	(підпис)	
Відповідальний виконавець наук. співроб. канд. біол. наук	_____	П.П. Пухтаєвич (розділи 1.3, 7.6–7.8, висновки, рекомендації)
	(підпис)	

Відповідальний виконавець
наук. співроб.
канд. біол. наук

(підпис)

Л.І. Рибаченко
(розділи 1.3, 7.1–7.5,
висновки, рекомендації)

Відповідальний виконавець
молодший наук. співроб.
канд. біол. наук

(підпис)

А.П. Павлице
(розділи 7.2, 7.3,
висновки)

Відповідальний виконавець
молодший наук. співроб.

(підпис)

С.В. Омельчук
(розділи 6.2, 6.3,
висновки)

Відповідальний виконавець
інженер I категорії

(підпис)

А.В. Жемойда
(розділ 6.4, висновки)

РЕФЕРАТ

звіту про виконання науково-дослідної роботи

«Вивчити реакцію бобово-ризобіального симбіозу на дію біотичних та абіотичних чинників»

Звіт про НДР: 177 с., 29 табл., 56 рис., 180 літературних джерел

АНАЛІТИЧНА СЕЛЕКЦІЯ, АЗОТФІКСАЦІЯ, АНТИОКСИДАНТНІ ФЕРМЕНТИ, ЕКСУДАТИ, ЛЮЦЕРНА, НАНОКАРБОКСИЛАТИ МЕТАЛІВ, НОДУЛЯЦІЯ, ПОСУХА, ПРОДУКТИВНІСТЬ, РИЗОБІЇ, СИМБІОЗ, СОЯ, ТРАНСПОЗОНОВИЙ МУТАГЕНЕЗ, ФОТОСИНТЕЗ, ФУНГІЦИДИ, ЦУКРИ

Об'єкт дослідження – **рослини** родини бобових (Fabaceae): соя (*Glycine max* L. (Merill)) сортів: Лісабон, Алмаз, Васильківська; люцерна (*Medicago sativa* L.) сорту Серафима; а також **бактерії** із музейної Колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України:

- повільнорослі бульбочкові бактерії сої (*Bradyrhizobium japonicum*) штамів 634б, 64б, 614а, 631, 622, 64б, 60б, 603, 102с, W12, К, 71т, 10к, В1, 69г, G80, M8 ; Tn5-мутанти *B. japonicum* (634б і 64б), зокрема В1-20 і 107; нові перспективні штами *B. japonicum* аналітичної селекції РС07, РС08, РС09. За результатами первинного скринінгу в подальших дослідженнях використовували Tn5-мутанти *B. japonicum* штаму 634б – Д36, Д37, Д87 і Tn5-мутанти штаму 64б – В75, В78, В79, В81, В81а, В94, В128, В157, В82, В130, В131, В137, В139, В140, В144, В154, В163, В166;
- швидкорослі бульбочкові бактерії люцерни (*Sinorhizobium meliloti*) штамів 441, 448а та СН;
- *Azotobacter chroococcum* Т79 та ізоляти ризосферних бактерій сої А20 і F1, а також гороху RP13;

- кишкова паличка *Escherichia coli* S17-1 із плазмідом рSUP5011, (рSUP5011::Tn5*mob*), яка містить транспозон Tn5.

У роботі використано: шести- та двадцятигодинні екsudати насіння і коренів сої (*Glycine max* L. (Merill)) сорту Васильківська; гексози глюкоза і галактоза, аміноцукри N-ацетил-D-глюкозамін й N-ацетил-D-галактозамін; нанокарбоксилати германію, молібдену, ванадію, кобальту, заліза, міді та цинку; фунгіциди Февер, Стандак Топ, Максим XL і Аканто Плюс; препарат на основі бульбочкових бактерій «Ризостим».

Мета роботи – вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярних аспектів формування та функціонування симбіотичних систем різної ефективності за дії біотичних та абіотичних чинників для створення високопродуктивних конкурентоспроможних бобово-ризобіальних комплексів.

Методи дослідження – мікробіологічні, фізіологічні та біохімічні, статистичні, із залученням спектрофотометра BIORAD SmartSpectPlus (США), фотоколориметра-нефелометра ФЕК-56М (СРСР), газового хроматографа Agilent GC System 6850 (США), оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ГІАМ-5М (Росія).

У результаті проведених досліджень розширено уявлення про вплив чинників різної природи на формування взаємовідносин між симбіопартнерами у бобово-ризобіальних азотфіксувальних системах, а також виявлено особливості функціонування цих симбіозів, що дозволило розробити певні заходи підвищення ефективності азотфіксації у бобових, зокрема, за стресових умов.

Відзначено, що особливості впливу екsudатів сої на ризосферні мікроорганізми, а також на процеси формування і функціонування симбіотичних систем сої з бульбочковими бактеріями визначаються їхніми властивостями, що, в свою чергу, залежать від органу походження (насіння чи коріння рослин) й тривалості виділення (6 чи 20 год), складу мікрофлори та фізико-хімічних властивостей води.

Виявлено, що за дії вуглеводів (глюкози, галактози, N-ацетил-D-глюкозаміну, N-ацетил-D-галактозаміну, 0,01M) як елементів сигналінгу взаємодії симбіонтів у середовищі росту бульбочкових бактерій сої змінювався ріст і розвиток мікроорганізмів в умовах чистої культури. Позитивним сигналінгом відносно ризобій характеризувалися вуглеводи групи галактози. Максимальний ефект відзначено у N-ацетил-D-галактозаміну, що підтверджується результатами оцінки росту культури за показниками кількості життєздатних клітин мікроорганізмів, часом генерації культури та швидкістю її розмноження.

Показано, що ефективність роботи симбіотичного апарату соєво-ризобіальних симбіозів обумовлена їх здатністю до максимального збереження функціонування нодуляційних та азотфіксувальних процесів за дії посухи і після відновлення поливу рослин. При цьому формування захисних реакцій рослин сої у симбіозі із *V. japonicum* за дії посухи пов'язане з активацією супероксиддисмутази, адаптаційними змінами активності каталази й аскорбатпероксидази, що приводить до регуляції вмісту пероксидів та інтенсивності процесів ліпопероксидації.

Дослідження впливу недостатнього водозабезпечення на початкових етапах формування симбіотичних систем люцерни з бульбочковими бактеріями *S. meliloti* показало, що урожай надземної маси люцерни визначається не лише ефективністю утворення симбіотичного апарату на ранніх етапах розвитку рослин, але й здатністю симбіотичних систем до реалізації нодуляційного та азотфіксувального потенціалів у постстресовий період.

Отримано нові штами *V. japonicum* Д37, Д87, В78, В157, ефективні при формуванні бобово-ризобіального симбіозу *Glycine max* L. (Merill) –*V. japonicum* на фоні 0,75 норми мінерального азоту, активні за традиційної (в день посіву насіння) та завчасної (за 7–14 діб до посіву) інокуляції насіння сої. На фоні місцевих рас ризобій азотфіксація сої, інокульованої новими штамми *V. japonicum*, збільшилася в 3,7–4,8 рази, отримана прибавка насіння становила 11,14–26,7%. Запропоновано застосування як традиційної, так і завчасної

інокуляції насіння новими активними, стійкими до підвищеного фону мінерального азоту та толерантними до ряду фунгіцидів, штамми *V. japonicum* як перспективний та раціональний елемент технології вирощування сої.

Виявлено, що використання нанокарбоксилату германію сприяє активному наростанню біомаси клітин *V. japonicum* 634б у чистій культурі, а також збільшенню бульбочок на коренях сої, підвищенню азотфіксувальної активності симбіотичних систем та інтенсивності фотосинтезу в листках сої. Доведено, що суміш нанокарбоксилатів германію та феруму в комплексі з активними штамми *V. japonicum* у співвідношенні 1:1:1000 дозволяє забезпечувати рослини додатковими елементами живлення, формувати ефективні рослинно-мікробні системи та приводить до збільшення урожаю насіння сої на 13 % у порівнянні із інокуляцією без використання мікроелементів. При цьому фізіологічна активність інокулянту, що містить вказані нанокарбоксилати, при довготривалому зберіганні залишається високою, що дозволяє виготовляти препарат завчасно.

У процесі дослідження дії фунгіцидів на формування та функціонування симбіотичних систем сої сорту Алмаз із стійкими у чистій культурі до пестицидів бульбочковими бактеріями *V. japonicum* PC07 та PC09 і Tn5-мутантами B78 й B144 відзначено особливості дії протруйників і підібрано комбінації фунгіцидів та ризобій, що забезпечують підвищенні продуктивності сої. За умов комплексного застосування Стандак Топу та бактеризації PC09 і B144 встановлено повну відсутність інгібуючого впливу хімічного препарату на азотфіксувальну активність сформованих симбіотичних систем. В умовах вегетаційних дослідів виявлено підвищення продуктивності рослин сої за комплексної дії протруйників Стандак Топ і Февер та інокуляції *V. japonicum* PC09 – на 12,0 та 14,6 % відповідно, а при застосуванні препарату Максим XL на фоні інокуляції сої *V. japonicum* PC07 і B78 – на 20,6 та 27,2 % відповідно.

На основі результатів проведених досліджень рекомендовано застосовувати модифікований нанокарбоксилатами германію та феруму препарат «Ризостим» у сучасних технологіях вирощування сої як природний засіб збільшення кількості азоту, доступного рослинам, для реалізації їх генетичного потенціалу врожайності.

ЗМІСТ

	стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАК, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	12
ВСТУП.....	13
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1 Біологічна активність бульбочкових бактерій і формування бобово-ризобіального симбіозу за дії біотичних факторів.....	20
1.2 Фізіолого-біохімічні особливості симбіотичних систем бобових рослин та бульбочкових бактерій за стресових умов виращування.....	23
1.3 Розробка прийомів ефективного використання азотфіксувального потенціалу бобово-ризобіальної системи з метою підвищення урожайності рослин.....	26
2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	36
3 ДОСЛІДИТИ БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ В ПРИСУТНОСТІ РИЗОСФЕРНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА ДІЇ БІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ	
3.1 Азотфіксувальна активність ризобактерій за дії бульбочкових бактерій та ексудату насіння сої.....	49
3.2 Активність фіксації азоту змішаними бактеріальними композиціями за дії ексудату насіння сої.....	51
3.3 Особливості формування соєво-ризобіального симбіозу за дії ризосферних мікроорганізмів та ексудату насіння сої.....	52
3.4 Сумісна дія ексудатів насіння та коренів сої на утворення соєво-ризобіального симбіозу.....	57
3.5 Формування соєво-ризобіального симбіозу під впливом ексудатів насіння сої, отриманих за різних умов його проростання	61

3.6	Вплив цукрів, які є вуглеводними детермінантами лектину насіння сої та складають основну частку від суми вуглеводів, що входять до складу екзополісахаридів бульбочкових бактерій сої, на ростову активність ризобій в умовах чистої культури.....	64
4	З'ЯСУВАТИ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ СОЇ ТА ЛЮЦЕРНИ, ІНОКУЛЬОВАНИХ РІЗНИМИ ЗА АКТИВНІСТЮ ШТАМАМИ РИЗОБІЙ, НА НЕДОСТАТНЄ ВОДОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ	
4.1	Вплив недостатнього водозабезпечення на формування та функціонування симбіотичної системи сої з бульбочковими бактеріями.....	70
4.2	Ефективність інокуляції люцерни штамми <i>Sinorhizobium meliloti</i> за різного водозабезпечення.....	74
5	ВИВЧИТИ АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У РОСЛИН СОЇ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ ШТАМАМИ РІЗНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ, ЗА СТРЕСОВИХ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ.....	84
6	ОТРИМАТИ ВИСОКОЕФЕКТИВНІ КОНКУРЕНТОЗДАТНІ ШТАМИ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ МЕТОДАМИ ТРАДИЦІЙНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ТА ТРАНСПОЗОНОВОГО МУТАГЕНЕЗУ	
6.1	Первинний скринінг Tn5-мутантів повільнорослих бульбочкових бактерій <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , отриманих при використанні плазмідного вектора pSUP5011::Tn5mob за симбіотичними властивостями.....	100
6.2	Селекція Tn5-мутантів (pSUP5011::Tn5mob) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> за симбіотичними властивостями на підвищеному фоні мінерального азоту.....	104

6.3 Реалізація симбіотичних властивостей, конкурентоздатність та ефективність азотостійких Tn5-мутантів <i>Bradyrhizobium japonicum</i> залежно від тривалості періоду від обробки насіння сої бульбочковими бактеріями до посіву.....	109
6.4 Конкурентоздатність активних азотостійких Tn5-мутантів <i>Bradyrhizobium japonicum</i> в залежності від терміну обробки бактеріальним препаратом (в день обробки та за 7 діб до посіву)....	113
6.5 Тривалість життєздатності селекціонованих штамів бульбочкових бактерій <i>Bradyrhizobium japonicum</i> на насінні сої, обробленому фунгіцидами, в залежності від терміну його зберігання.....	118
7 СТВОРИТИ КОМПЛЕКСНІ МІКРОБНІ ПРЕПАРАТИ З НАНОКАРБОКСИЛАТАМИ ТА РОЗРОБИТИ МЕТОДИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ У СУЧАСНИХ АГРОТЕХНОЛОГІЯХ ВИРОЩУВАННЯ СОЇ. РОЗРОБИТИ ЗАХОДИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АЗОТФІКСАЦІЇ У БОБОВИХ	
7.1 Вплив нанокарбоксилатів мікроелементів на ріст бактерій <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 634б в умовах чистої культури.....	123
7.2 Функціонування симбіотичного апарату рослин сої за дії нанокарбоксилатів Ge, Mo та Fe.....	125
7.3 Інтенсивність фотосинтезу листків сої на фоні застосування нанокарбоксилатів металів та інокуляції ризобіями.....	128
7.4 Вивчення впливу комплексів найбільш ефективних нанокарбоксилатів мікроелементів на формування та функціонування симбіотичного апарату та продуктивність сої.....	131
7.5 Перевірка в польових умовах ефективності препарату за його довготривалого зберігання.....	135

7.6 Дія фунгіцидів за різних способів їх застосування на формування та функціонування симбіозу сої зі стійкими у чистій культурі до пестицидів ризобіями.....	138
7.7 Вплив інокуляції насіння сої стійкими до фунгіцидів ризобіями на ріст і розвиток рослин на фоні застосування протруйників.....	144
7.8 Продуктивність рослин сої за обробки насіння препаратами фунгіцидної дії та інокуляції резистентними до пестицидів бульбочковими бактеріями.....	146
ВИСНОВКИ.....	150
РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	156
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	157

Перелік умовних познач,
символів, одиниць, скорочень і термінів

АФА	азотфіксувальна активність
АПО	аскорбатпероксидаза
ВВ	водопровідна вода
ГР	глутатіонредуктаза
ДВ	дистильована вода
ДП	інокуляція насіння сої в день посіву
ІФРГ НАН України	Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
ЕПС	екзополісахариди
ЗЗР	засоби захисту рослин
КАТ	каталаза
КУО	колонієутворюючі одиниці
МДА	манітно-дріжджовий агар
ПВ	повна вологоємкість
ПОЛ	пероксидне окиснення ліпідів
СОД	супероксиддисмутаза
<i>A. chroococcum</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Gal	галактоза
Glc	глюкоза
GalNaC	N-ацетил-D-галактозамін
GlcNac	N-ацетил-D-глюкозамін
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
pSUP5011::Tn5mob	плазміда pSUP5011, яка містить транспозон Tn5, що включений у базовий реплікон

ВСТУП

Одне із стратегічних завдань сучасного аграрного виробництва – раціональне природокористування та широке використання відновлюваних природних ресурсів. У цьому аспекті феномен біологічної азотфіксації атмосферного азоту симбіотичними системами є тим засобом, використання якого і надалі залишається перспективним при впровадженні високопродуктивного та екологічно чистого землеробства.

Бобові культури є важливими складовими агроценозів і джерелом рослинного білка, тому їх залучення в сівозміни вважають дієвим способом підвищення продуктивності рослин у системах органічного та біологічного землеробства. Показана перспективність їх використання для підвищення родючості ґрунтів у регіонах із несприятливими кліматичними умовами. При цьому важливо враховувати азотфіксувальний потенціал симбіотичних систем та ступінь його реалізації під впливом стресових факторів і максимально його використовувати.

Процес симбіотичної фіксації азоту є особливо чутливим до умов довкілля, зокрема: забезпечення вологою, температурного режиму, аерації ґрунту та його кислотності, освітлення, засолення, перенасичення ґрунту мінеральними добривами, наявності пестицидів, фізіологічної активності ґрунтових мікроорганізмів тощо. Для цілеспрямованого керування цим процесом необхідно розуміти всі аспекти його перебігу, що обумовлені особливостями взаємодії двох геномів та впливом зовнішніх чинників різної природи. Відтак, проблема біологічного азоту потребує всебічного дослідження та пошуку шляхів оптимізації функціонування азотфіксувального апарату симбіотичних систем, утворених бобовими рослинами та бульбочковими бактеріями, зокрема за стресових умов.

На ріст і розвиток рослин, а також формування рослинно-бактеріальних симбіотичних систем важливий вплив мають мікроорганізми прикореневої зони.

Вони забезпечують фосфорне та азотне живлення рослин, збільшуючи поглинальну здатність коріння, секретують фітогормони у прикореневу зону, пригнічують активність фітопатогенів тощо. Завдяки своїм властивостям ризосферні мікроорганізми можуть викликати зміни в процесах утворення і функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу, підвищувати його ефективність, зокрема, за рахунок покращення розвитку бульбочкового апарату. З іншого боку, на формування симбіотичних азотфіксувальних систем суттєво впливають також кореневі і насінневі екsudати, зокрема їх вуглеводні компоненти, адже взаємодія між партнерами симбіозу розпочинається ще на доконтактному рівні, під час активізації необхідних для симбіотичного кооперування фізіологічних процесів у макро- та мікроорганізмів. Світові досягнення останніх років із залученням сучасних молекулярно-біологічних методів досліджень показали, що екsudати насіння і коренів відіграють важливу роль у різних процесах життєдіяльності рослин, зокрема у забезпеченні бобових рослин мінеральними елементами живлення, захисті рослин у випадку дії абіотичних і біотичних стресових факторів, оптимізації росту і розвитку, формуванні рослинно-мікробних симбіотичних взаємовідносин. У свою чергу, несприятливі чинники довкілля визначають характер модулюючої дії екsudатів щодо формування симбіотичних азотфіксувальних систем.

При створенні конкурентно-ефективних за певних умов симбіотичних систем важливим є врахування особливостей реакції симбіонтів на дію стресових факторів, їхньої здатності пристосовуватися до несприятливих чинників довкілля та забезпечувати оптимальну продуктивність. Важливе значення в адаптації рослин до дії стресів, в тім числі і посухи, належить біохімічним системам захисту. Тому значна увага дослідників приділяється з'ясуванню ролі антиоксидантних систем у метаболізмі і формуванні стійкості рослин за дії стрес-факторів. Антиоксидантні системи беруть участь у нейтралізації АФК, накопичення яких у рослинній клітині за дії стресу ініціює процеси окиснювальної деструкції мембранних структур, а також можуть виступати в ролі сигнальних молекул, які залучені у процес активації захисних систем за дії

стресу, зокрема індукують синтез ферментів-антиоксидантів. Ключовим ензимом захисту живих організмів від окиснювальної деструкції вважають супероксиддисмутазу, яка каталізує утворення з аніон-радикалів супероксиду пероксиду водню і кисню. Для утилізації H_2O_2 включається комплекс ензимів: каталаза, родина пероксидаз, а також ензими аскорбат-глутатіонового циклу – аскорбатпероксидаза і глутатіонредуктаза. Не зважаючи на значну кількість даних щодо впливу посухи на бобово-ризобіальний симбіоз, до кінця не з'ясований механізм цього явища, а тому необхідним є проведення досліджень у даному напрямку, що дозволить з'ясувати додаткові аспекти формування захисних реакцій та особливості функціонування симбіотичних систем за стресової дії посухи.

На сьогодні показано існування генетичної мінливості за стійкістю до більшості зовнішніх стресових факторів як у рослин-господарів, так і у відповідних їм штамів ризобій, при цьому відзначено, що бактерії стійкіші до зовнішніх стресів, ніж рослини. Ризобії не лише фіксують молекулярний азот атмосфери у симбіозі з бобовими рослинами та перетворюють його в легко засвоювані сполуки, але й продукують природні біологічно активних речовини, які є регуляторами ключових ланок метаболізму рослин і сприяють підвищенню їх урожайності. Це обумовлює необхідність пошуку і створення штамів із покращеними симбіотичними характеристиками та здатністю до виживання у стресових умовах. У великих обсягах ведуться роботи, спрямовані на селекцію штамів із високою конкурентоздатністю, використання підвищених доз інокулянтів, створення покращених носіїв та способів внесення інокулянтів, детальне вивчення місцевих штамів-конкурентів, молекулярних механізмів конкурентних взаємодій, дослідження ефективності повторної інокуляції, аналіз впливу рослини–господаря на конкуренцію і на обмеження бульбочкоутворення.

Традиційні інокулянти при незаперечній екологічній та економічній доцільності застосування не завжди забезпечують суттєве зростання продуктивності рослин. Тому важливого значення набувають дослідження, спрямовані на вдосконалення існуючих форм біологічних добрив на основі

мікроорганізмів, а також розробка та створення комплексних препаратів, які, окрім бактеріального компонента, містили би фізіологічно активні речовини, що дозволять забезпечити інтенсифікацію процесу азотфіксації та дадуть змогу повною мірою реалізувати генетичний потенціал сучасних сортів рослин. Перспективними в цьому плані є мікроелементи. Відомо, що вони в рослинах беруть участь у окисно-відновних процесах, каталізі та синтезі на атомарному рівні. Як ключова ланка ферментів, мікроелементи-метали безпосередньо впливають на імунітет рослин, їх життєздатність, стійкість до шкідників і захворювань. Мікроелементи також впливають як на ризосферні, так і на бульбочкові форми бактерій, підтримуючи каскад складних перетворень та взаємодій. Застосування сучасних нанотехнологічних підходів дає змогу підвищити ефективність мікроелементів шляхом переведення їх у біологічно активну форму – нанокарбоксилати та забезпечує контрольоване вивільнення добрив і цільову доставку біомолекул.

Отримання високих урожаїв сільськогосподарських культур не можливе без надійного захисту від шкідливих організмів. У передових країнах світу і Україні домінуючим є хімічний метод захисту рослин від збудників хвороб різної етіології. Із появою нових фунгіцидів, сортів бобових рослин, штамів бульбочкових бактерій, виникає потреба в ретельному вивченні токсичної дії цих речовин на мікро- і макросимбіонти та на бобово-ризобіальну систему в цілому. Особливої гостроти це питання набуває за необхідності суміщення процесів протруювання насіння та його бактеризації. Показано, що хімічні засоби захисту рослин суттєво впливають на ефективність симбіозу бульбочкових бактерій із рослиною-хазяїном, і, як правило, пригнічують процес формування бульбочок на бобових рослинах, а в подальшому знижують азотфіксувальну активність симбіотичного апарату. Водночас підтверджено можливість підбору таких композицій фунгіцидів і ризобій, за яких нітрогеназна активність бульбочок на коренях бобових підвищується. При цьому вплив діючих речовин хімічних засобів захисту рослин на макро- та мікросимбіонти залежить від виду бобових, типу та доз використаних пестицидів, видів і властивостей ризобій та стадії

симбіозу, коли відбувається вказаний вплив. Таким чином, важливим є врахування усіх цих аспектів при вирощуванні бобових рослин. Перспективним, зокрема, є виробництво біопрепаратів на основі стійких до хімічних засобів захисту рослин штамів бульбочкових бактерій.

Зважаючи на викладене, метою представленої роботи було вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярних аспектів формування та функціонування симбіотичних систем різної ефективності за дії біотичних та абіотичних чинників для створення високопродуктивних конкурентоспроможних бобово-ризобіальних комплексів.

Звіт про виконання науково-дослідної роботи «Вивчити реакцію бобово-ризобіального симбіозу на дію біотичних та абіотичних чинників» є логічним продовженням багаторічних фундаментальних досліджень Інституту фізіології рослин і генетики НАН України щодо з'ясування механізму біологічної фіксації азоту та деталізацію перебігу окремих фізіолого-біохімічних реакцій даного процесу з метою розроблення заходів його оптимізації для підвищення продуктивності бобових культур, зокрема тих, що вирощуються за дії несприятливих зовнішніх чинників. У звіті подаються результати п'ятирічних досліджень колективу авторів основними завданнями яких було:

1. Дослідити біологічну активність бульбочкових бактерій в присутності ризосферних мікроорганізмів за дії біотичних факторів різної природи.

2. З'ясувати фізіолого-біохімічні особливості реакції сої та люцерни, інокульованих різними за активністю штамми ризобій, на недостатнє водозабезпечення.

3. Вивчити активність антиоксидантних ферментів у рослин сої, інокульованої штамми різної ефективності, за стресових умов вирощування.

4. Отримати високоефективні конкурентоздатні штамми бульбочкових бактерій методами традиційної селекції та транспозонового мутагенезу.

5. Створити комплексні мікробні препарати з нанокарбоксилатами та розробити методи їх застосування у сучасних агротехнологіях вирощування сої. Розробити заходи підвищення ефективності азотфіксації у бобових.

У процесі виконання роботи досліджено азотфіксувальну активність ризобактерій гороху RP13 і бактерій *Azotobacter chroococcum* T79 за дії бульбочкових бактерій сої з різними симбіотичними властивостями та шестигодинних ексудатів насіння сої, а також вивчено особливості формування і функціонування симбіозу соя–*Bradyrhizobium japonicum* 6346 за дії ризосферних мікроорганізмів сої A20 і F1, бактерій *Azotobacter chroococcum* T79, шести- та двадцятигодинних ексудатів насіння сої, отриманих при використанні стерильної дистильованої та водопровідної води, та за сумісної дії ексудатів насіння та коренів сої на різних етапах розвитку симбіозу. В умовах чистої культури досліджено ростову активність ризобій сої за дії глюкозо- і галактозовмісних моносахаридів.

Вивчено процеси утворення та функціонування азотфіксувальних систем люцерни із синоризобіями різних штамів, а також ефективність останніх щодо формування вегетативної маси рослин в умовах недостатнього водозабезпечення на початкових етапах розвитку симбіозу. Досліджено особливості нодуляції та азотфіксації, а також інтенсивність процесів ліпопероксидації, вміст пероксидів та активність ключових антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази, аскорбатпероксидази) у рослинах сої, за інокуляції штамми і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* із контрастними симбіотичними властивостями в умовах недостатнього водозабезпечення.

Методами аналітичної селекції та транспозонового мутагенезу отримані нові азото- та фунгіцидостійкі, конкуретоздатні за традиційної та завчасної інокуляції насіння (за 7–14 діб) штами бульбочкових бактерій сої, що відкриває можливість використання їх як бактеріальної основи у препаратах із подовженим терміном передчасної інокуляції насіння.

З'ясовано вплив нанокарбоксилатів мікроелементів на ризобії сої в чистій культурі, а також на ефективність симбіотичних систем соя–*Bradyrhizobium*

jaronicum. Досліджено процеси формування та функціонування симбіотичних систем сої зі стійкими до фунгіцидів бульбочковими бактеріями за впливу передпосівного протруювання насіння і профілактичного обприскування рослин фунгіцидом.

У процесі виконання роботи створено модифікований нанокарбоксилатами германію та феруму препарат «Ризостим», який рекомендовано використовувати у сучасних технологіях вирощування сої як природній засіб збільшення кількості азоту, доступного рослинам, для реалізації їх генетичного потенціалу врожайності. Підбрано комбінації фунгіцидів і резистентних до них ризобій, що забезпечують підвищення продуктивності сої у вегетаційних умовах на 12–27 %.

Результатами роботи є поповнення музейної Колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України новими штамми бульбочкових бактерій із високим симбіотичним потенціалом та оптимальною технологічністю, зокрема азото- та фунгіцидостійкими, конкуретоздатними за традиційної та завчасної інокуляції насіння (за 7–14 діб), що в подальшому матимуть практичне використання у сільськогосподарському виробництві як інокуляційні біопрепарати для забезпечення бобових рослин екологічно безпечним джерелом зв'язаного азоту.

Вагомим підсумком проведених досліджень є публікація низки монографій, оформлення патентів на винаходи та виконання значної кількості господарських договорів із сільськогосподарськими підприємствами України різних форм власності.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Біологічна активність бульбочкових бактерій і формування бобово-ризобіального симбіозу за дії біотичних факторів

Відомо, що мікроорганізми прикореневої зони відіграють важливу роль у процесі росту і розвитку рослин [1–4]. Ризосферні мікроорганізми здатні покращувати ріст і розвиток рослин [5–7], впливаючи прямо чи опосередковано. Пряма дія ризосферних мікроорганізмів пов'язана із забезпеченням фосфорного та азотного живлення рослин [8, 9], збільшенням поглинальної здатності коріння [10, 11], секрецією фітогормонів у прикореневу зону рослин [12–14]. Опосередковано бактерії ризосфери можуть впливати на ріст і розвиток рослин, наприклад, пригнічуючи активність фітопатогенів [15, 16]. Завдяки своїм властивостям ризосферні мікроорганізми можуть викликати зміни у формуванні і функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу [3], підвищуючи його ефективність [17], покращуючи розвиток бульбочкового апарату [18, 19]. Крім того, ризобактерії здатні модулювати біологічну активність представників мікрофлори прикореневої зони, які належать до різних родів та видів [20, 21], що обумовлено комплексом корисних властивостей мікроорганізмів. Наприклад, вільноживучі діазотрофи *Azospirillum brasilense* та *Azospirillum lipoferum* покращували ріст мікроросточків [20], тоді як бактерії *Bacillus subtilis* впливали на продуктивність симбіозу між рослинами гороху та ризобіями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [3]. Вищевикладене вказує на те, що дослідження ризобактерій та механізмів їх ефекторної дії залишаються актуальними.

Серед бактерій, які входять до складу ризосферної мікрофлори, чільне місце займає азотобактер, який зустрічається у різних ґрунтах і здатен фіксувати атмосферний азот, перетворюючи його в азотовмісні сполуки, придатні для живлення рослинного організму [4, 22]. Таким чином, азотобактер може підвищувати родючість ґрунтів і продуктивність рослин. Було показано, що

бактерії інших родів, які були ізольовані з ризосфери рослин, також мали азотфіксувальну активність [22]. До складу прикореневої мікрофлори можуть входити бульбочкові бактерії, які відновлюють молекулярний азот у симбіозі з бобовими рослинами.

Оскільки під час інтродукції у ґрунт із насінням, обробленим бактеріальними препаратами, надходить значна кількість ризобій *Bradyrhizobium japonicum* та/або ризобактерій, актуальним є дослідження впливу змішаних композицій ризосферних мікроорганізмів і ексудатів на розвиток соєво-ризобіального симбіозу з метою використання отриманих результатів у практичній площині при створенні бактеріальних препаратів під бобові культури.

Відомо, що під час набухання і проростання насіння бобових та протягом розвитку кореневої системи рослин у навколишнє середовище виділяється низка біологічно активних речовин, які можуть як біотичний фактор навколишнього середовища суттєво впливати на фізіологічну активність ризосферних мікроорганізмів, зокрема на симбіотичні властивості та показники росту бульбочкових бактерій [23], а також на розвиток бобово-ризобіального симбіозу [24–26]. З огляду на те, що взаємодія між партнерами симбіозу розпочинається ще на доконтактному рівні, коли відбувається активізація необхідних для симбіотичного кооперування фізіологічних процесів у макро- та мікроорганізмів, кореневі і насінневі ексудати можуть значним чином впливати на формування симбіотичних азотфіксувальних систем. Світові досягнення останніх років із залученням сучасних молекулярно-біологічних методів досліджень показали, що ексудати насіння і коренів відіграють важливу роль у різних процесах життєдіяльності рослин [27], зокрема у забезпеченні бобових рослин мінеральними елементами живлення, захисті рослин у випадку дії абіотичних і біотичних стресових факторів, оптимізації росту і розвитку, формуванні рослинно-мікробних симбіотичних взаємовідносин.

Насінневі і кореневі ексудати містять речовини, які належать до різних класів [27, 28]. Так, сполуки з низькою молекулярною масою представлені

органічними кислотами, сидерофорами, цукрами, вітамінами, амінокислотами, фенольними кислотами та ін. [27, 29], тоді як до високомолекулярних речовин належать білки та полісахариди [27]. Оскільки екsudати насіння і коренів бобових рослин різняться щодо якісного і кількісного вмісту біологічно активних органічних речовин [25, 30, 31] та можуть одночасно знаходитися в прикореневій зоні рослин, їх сумісна дія на розвиток соєво-ризобіального симбіозу, ймовірно, буде більш вираженою. Важливим також є вивчення впливу несприятливих чинників довкілля, зокрема складу водного середовища, що оточує рослини, на характер модулюючої дії екsudатів щодо формування симбіотичних азотфіксувальних систем.

Симбіотичні характеристики бульбочкових бактерій, як то, бульбочкоутворююча (нодуляційна) здатність, азотфіксувальна активність і специфічність до рослини-хазяїна є тими основними ознаками, що визначають ефективність бобово-ризобіальних симбіозів за штучної інокуляції насіння [32, 33, 34, 35]. Реалізацію симбіотичних властивостей бульбочкових бактерій можливо регулювати біологічно активними речовинами різної природи [32, 36, 37, 38, 39], в тому числі, й вуглеводної [40, 41, 42, 43].

Вуглеводам і їх полімерам належить важлива роль у метаболізмі живих організмів, яка пов'язана з енергетичним та біоінформаційним потенціалом. Роль вуглеводів у взаємодії мікроорганізмів із вищими рослинами полягає у наступному.

Різні вуглеводи входять до складу корневих метаболітів рослин і є позитивними хемоатрактантами для ґрунтових мікроорганізмів, зокрема бульбочкових бактерій [44], що забезпечує залучення мікроорганізмів до ризосферної зони рослини-хазяїна й первинні доконтактні взаємодії симбіонтів на рівні обміну сигнальними молекулами.

За рахунок вуглевод-білкової взаємодії, зокрема лектин-вуглеводної рецепції, здійснюється контакт рослини з мікросимбіонтом на молекулярному рівні [45, 46].

Вуглеводні сполуки, які залучені до первинного сигналінгу між симбіонтами та акумулюються у ризосферній зоні рослини [28], визначають розвиток і функціональну активність ґрунтових мікроорганізмів. За екзогенної дії на бактеріальні клітини вони впливають на ріст, розвиток, метаболічну й фізіологічну активність бактерій та формування рослинно-мікробних асоціацій і симбіозів [42, 46, 47–52].

Вуглеводи є компонентами поживних середовищ росту бактерій – джерелом вуглецю для мікроорганізмів, необхідних для росту, розвитку й функціональної активності бактеріальної культури [53, 54].

1.2 Фізіолого-біохімічні особливості симбіотичних систем бобових рослин та бульбочкових бактерій за недостатнього водозабезпечення

Бобові культури є важливими складовими агроценозів і джерелом рослинного білка, тому їх залучення у сівозміни вважають дієвим заходом підвищення продуктивності рослин у системах органічного та біологічного землеробства. Показана перспективність їх використання для підвищення родючості ґрунтів у регіонах із несприятливими кліматичними умовами, зокрема, з недостатнім водозабезпеченням [55]. При цьому важливим аспектом є врахування азотфіксувального потенціалу симбіотичних систем та ступеня його реалізації під впливом стресових факторів.

Межа критичної вологості для нодуляції залежить від партнерів симбіозу, показано існування генетичної мінливості за стійкістю до більшості зовнішніх стресових факторів як у рослин-господарів, так і у відповідних їм штамів ризобій [56]. При цьому відзначено, що бактерії стійкіші до зовнішніх стресів, ніж рослини, і в посушливих умовах можуть виживати у водяній плівці навколо часточок ґрунту [57, 58]. За даними різних авторів [59–63] ризобії можуть розвиватися за вологості ґрунту в межах 16–90 % ПВ, оптимальною вважають

60–70 % ПВ. При цьому виживання та активність мікроорганізмів, а також ефективність сформованого за їх участю симбіозу залежать від багатьох факторів, зокрема фізіологічних особливостей макро- і мікросимбіонтів, природного середовища їх існування, типу ґрунту й змін його вологості [64,65]. Так, показано суттєве зниження популяції мікроорганізмів за посушливих умов та підвищення – при ослабленні водного стресу [66], виявлено, що ефективні штами здатні мігрувати в умовах посухи на більші відстані, ніж неефективні [67], доведено, що зниження водозабезпечення суттєво зменшує кількість інфекційних ниток у корневих волосках рослин, інгібує нодуляцію, а також фіксацію азоту сформованими бульбочками [68–70].

Тому з метою створення конкурентних та ефективних за умов недостатнього водозабезпечення симбіотичних систем необхідно враховувати особливості реакції симбіонтів на нестачу ґрунтової вологи, їхню здатність адаптуватися до несприятливих умов та забезпечити оптимальну продуктивність. Одним із важливих шляхів підвищення ефективності інокулянтів для збільшення урожайності бобових рослин є селекція штамів із покращеними симбіотичними характеристиками та здатністю до виживання у стресових умовах [71–73]. У попередніх дослідженнях нами було показано [73], що застосування нових штамів ризобій, отриманих методами транспозонового мутагенезу чи аналітичної селекції, дозволяє суттєво підвищити продуктивність рослин та покращити якісні показники зеленої маси, зокрема, за нестачі вологи.

Ранньою неспецифічною відповіддю рослини на різні за природою стресові впливи є збільшення рівня активних форм кисню (АФК), які ініціюють процеси окиснювальної деструкції мембранних структур клітини [74, 75]. Основним ініціатором вільнорадикального окиснення мембран ліпідів вважають супероксид, який легко генерується у багатьох спонтанних і ензиматичних реакціях окиснення, причому продуктами його вторинного перетворення можуть бути синглетний кисень, гідроксильний радикал, пероксид водню, органічні пероксиди та їх радикали [74]. За участю АФК процеси ліпопероксидації призводять до руйнування поліненасичених жирних кислот і зменшення вмісту

полярних ліпідів та ненасичених жирних кислот, появи гідропероксидних угруповань у складі гідрофобної зони мембран [76, 77]. Такі перебудови змінюють здатність мембран до латеральної дифузії, що призводить до відхилення у функціонуванні мембранно-зв'язаних ферментів, збільшення проникності мембран для багатьох речовин та іонів [78].

Адаптація рослин до несприятливих чинників навколишнього середовища, в тому числі до посухи, пов'язана зі змінами обміну речовин і структурними перебудовами рослинних клітин [79–81]. Недостатнє водозабезпечення призводить до змін у водообміні клітин і, як наслідок, до порушення обмінних функцій рослинного організму [82–84]. Для рослинного організму в стані стресу характерна зміна експресії геному, підвищення активності антиоксидантних ферментів, накопичення низькомолекулярних органічних осмолітів, синтез і виділення етилену [85–87]. Сигналом для запуску цього комплексу реакцій є стереотипна і біологічно важлива зміна внутрішнього середовища клітини, яка відбувається під впливом факторів стресу. Таким сигналом є порушення рівня пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у стані прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у біологічних мембранах, що обумовлено посиленою продукцією АФК [88, 89]. Вважають, що зсув рівноваги в бік прооксидантів є найінформативнішим показником для оцінки ступеня впливу різних факторів на організм. Водночас активація ПОЛ є однією із перших неспецифічних ланок в загальній стрес-реакції організму і може ініціювати включення інших механізмів захисту, а продукти ПОЛ розглядають в якості «індикаторів» і «первинних медіаторів» стресу [90, 91].

Важливе значення в адаптації рослин до дії несприятливих чинників навколишнього середовища, в тім числі і посухи, належить біохімічним системам захисту. Серед них значна увага приділяється з'ясуванню ролі антиоксидантних систем у метаболізмі і формуванні стійкості рослин за дії стрес-факторів [92–94]. Антиоксидантні системи беруть участь у нейтралізації АФК, накопичення яких у рослинній клітині за дії стресу ініціює процеси окиснювальної деструкції мембранних структур. Водночас доведено, що АФК

можуть також виступати в ролі сигнальних молекул, які беруть участь в активації захисних систем за дії стресу, зокрема, індукувати синтез ферментів антиоксидантів [95–97].

Ключовим ензимом захисту живих організмів від окиснювальної деструкції вважають супероксиддисмутазу (СОД), яка каталізує утворення з аніон-радикалів супероксиду пероксиду водню і кисню [97]. Для утилізації H_2O_2 включається комплекс ензимів: каталаза (КАТ), родина пероксидаз, а також ензими аскорбат-глутатионового циклу – аскорбатпероксидаза (АПО) і глутатіонредуктаза (ГР) [92, 93, 98].

Не зважаючи на значну кількість даних щодо впливу посухи на бобово-ризобіальний симбіоз, до кінця не з'ясований механізм цього явища [35, 99–102]. Проведення подальших досліджень у даному напрямку дозволить з'ясувати додаткові аспекти формування захисних реакцій та особливості функціонування симбіотичних систем за стресової дії посухи.

1.3 Розробка прийомів ефективного використання азотфіксувального потенціалу бобово-ризобіальної системи з метою підвищення урожайності рослин

Мікроорганізми можуть виступати джерелами природних біологічно активних речовин, які є регуляторами ключових ланок метаболізму важливих сільськогосподарських рослин. Яскравим прикладом даних організмів є ґрунтові бактерії, насамперед, ризобії, що у симбіозі з бобовими рослинами фіксують молекулярний азот атмосфери та перетворюють його в сполуки, здатні легко засвоюватися живими організмами, а також продукують фізіологічно активні речовини, що сприяє підвищенню урожаю сільськогосподарських культур [103, 104].

Процес симбіотичної фіксації азоту є особливо чутливим до змін умов довкілля, зокрема, таких як дефіцит вологи, аерація, кислотність ґрунту, низькі температури та недостатнє освітлення, засолення, перенасичення земель мінеральними добривами тощо [105]. Вагомий вплив на функціонування бобово-ризобіального симбіозу в ґрунті має фосфор, калій та мікроелементи [106], ґрунтово-кліматичні умови [104], внесення пестицидів [107]. Поміж біотичних факторів особливо важливі: продукція бактеріоцинів і антибіотиків [108], чисельність і властивості місцевих мікроорганізмів, швидкість утворення бульбочок, яка пов'язана з авторегуляторними ефектами синтезу екзополісахаридів [109], рухливість бактерій.

Вивчення впливу абіотичних, біотичних, антропогенних факторів на становлення та функціонування бобово-ризобіального симбіозу та розробка стратегії ефективного використання екологічно чистих джерел біологічного азоту зумовлює проведення досліджень по селекції активних форм бульбочкових бактерій стійких до впливу різних негативних чинників довкілля.

У теперішній час широко користуються попитом бактеріальні препарати під сою на основі азотфіксуючих мікроорганізмів *B. japonicum*, оскільки ефективність передпосівної інокуляції насіння ризобіями проявляється у збільшенні продуктивності цієї зернобобової культури, поліпшенні якості зерна, зменшенні застосування мінеральних енергозатратних високовартісних азотних добрив, і як наслідок зменшення негативного впливу на довкілля [110, 111].

Важливою ознакою бульбочкових бактерій, яка характеризує їх симбіотичний потенціал і є інтегрованим результатом багатьох властивостей ризобій, таких як агресивність, рухливість, низька чутливість до впливу негативних факторів довкілля і т. д., є конкурентоздатність. Недостатня конкурентоздатність штамів бульбочкових бактерій – один із вагомих факторів, який лімітує симбіотичну азотфіксацію [108].

Тому проводиться велика кількість робіт, спрямованих на селекцію штамів із високою конкурентоздатністю [112, 113], використання підвищених доз інокулянтів [114], створення покращених носіїв та способів внесення інокулянтів

[115, 116] детальне вивчення місцевих штамів-конкурентів, вивчення молекулярних механізмів конкурентних взаємодій [117], дослідження ефективності повторної інокуляції, аналіз впливу рослини-господаря на конкуренцію і на обмеження бульбочкоутворення [118].

Нарощування посівних площ під сою стрімко зростає. Зазвичай передпосівна інокуляція сої проводиться в день посіву або за день до посіву та потребує тривалого часу, обладнання і т.д., підготовки супутніх витратних матеріалів та людських ресурсів і т.п. Тому в технології вирощування сої часто використовується посівний матеріал із завчасною бактеризацією біологічними азотфіксувальними препаратами на основі активних штамів бульбочкових бактерій. На ринку пропозицій бактеріальних препаратів представлені інокулянти, не тільки сумісні з оригінальними протруйниками насіння сої, але й можливістю нанесення препарату за 1–2 дні (Ризобофіт), за 7 днів (Агрібактер), 21 днів (Біобуст Плюс (Liquid)) та 90 днів (Агрібактер+Райс) фірми Lallemand) тощо до висіву насіння в ґрунт.

З огляду на вищезазначене, перспективним залишається отримання високоефективних конкурентоздатних штамів бульбочкових бактерій методами традиційної селекції та транспозонового мутагенезу.

Оптимальні технології вирощування сільськогосподарських культур, включаючи сою, лежать в основі реалізації їх потенційної врожайності. Відомо, що біологічний потенціал сучасних сортів сої становить 14–17 т/га. При цьому, протягом останніх років в Україні середня врожайність цієї культури складає близько 1,5–2,0 т/га. Для досягнення максимальної продуктивності сої необхідно забезпечити рослинам правильну систему мінерального живлення. Саме система удобрення є одним із основних елементів технології вирощування, за допомогою якого можна регулювати процеси росту і розвитку рослин сої. Адже, за даними ряду вчених, частка впливу добрив у загальній варіабельності рівня врожайності може сягати 30–50 % [119].

Слід зауважити, що потреба рослин в елементах живлення не обмежується азотом, фосфором і калієм. Для нормальної життєдіяльності суттєве значення

мають мікроелементи, дія яких пов'язана з активністю ферментів та ферментних систем, які сприяють накопиченню в урожаї вуглеводів, білків, вітамінів і фізіологічно активних речовин [120]. Вони відіграють ключову роль в усіх фізіологічних процесах розвитку рослин, підвищують ефективність багатьох ферментів у рослинному організмі та покращують засвоєння рослинами елементів живлення із ґрунту. Більшість мікроелементів є активними каталізаторами, які прискорюють біохімічні реакції та впливають на їхню спрямованість.

Саме тому доцільним є дослідження, спрямовані на розробку комплексних препаратів, що містять б у своєму складі активні штами бульбочкових бактерій для забезпечення рослин азотом, а також ключові мікроелементи, адже роль цих речовин не можна замінити ніякими іншими сполуками і їх нестача може негативно вплинути на ріст та розвиток рослин сої.

Формування високої урожайності сої, як і більшості сільськогосподарських культур, значною мірою обумовлюється наявністю у ґрунті доступних для рослин поживних речовин, особливо сполук азоту. Проте через високу вартість енергоресурсів і низьку платоспроможність товаровиробників застосування мінерального азоту в останні роки різко скоротилося. У зв'язку з цим виникла необхідність в альтернативному шляху вирішення цієї проблеми, яка б базувалася на застосуванні економічно виправданих і екологічно безпечних прийомів технології вирощування цієї культури.

На сьогоднішній день важливим агротехнологічним прийомом вирощування сої, який дозволяє розкрити потенціал продуктивності цієї культури, є передпосівна інокуляція насіння препаратами, що містять у своєму складі високоефективні штами ризобій [121, 122]. Проте, слід зазначити, що традиційні інокулянти при незаперечній екологічній та економічній доцільності застосування не завжди забезпечують суттєве зростання продуктивності. Тому, важливого значення набувають дослідження, спрямовані на вдосконалення існуючих форм біологічних добрив на основі мікроорганізмів, а також розробка та створення комплексних препаратів, до складу яких окрім бактеріального

компонента входили б фізіологічно активні речовини, які дозволять забезпечити інтенсифікацію процесу азотфіксації та дадуть змогу повною мірою реалізувати генетичний потенціал сучасних сортів сої.

Перспективними в цьому плані є мікроелементи. Відомо, що вони в рослинах беруть участь у окисно-відновних процесах, каталізі та синтезі на атомарному рівні. Інколи достатньо дії лише мікромольних концентрацій іонів металів для нормального функціонування рослини. На відміну від макроелементів, які в значній мірі функціонують як структурні елементи, мікроелементи в складі ферментативної системи виконують роль каталізаторів хімічних реакцій. Як ключова ланка ферментів, мікроелементи-метали безпосередньо впливають на імунітет рослин, їх життєздатність, стійкість до шкідників і захворювань [123, 124].

Мікроелементи важливі й для здійснення процесів дихання, живлення, розмноження бульбочкових бактерій, вони беруть участь у синтезі низки ферментів бактеріальної клітини та активують їх [118]. Вони впливають як на ризосферні, так і на бульбочкові форми бактерій, підтримуючи каскад складних перетворень та взаємодій. Проте у вигляді солей ці елементи не можуть вповні засвоюватись рослинами. Мікродобрива у такій формі є неефективними та викликають забруднення ґрунтів. До того ж, застосування високих концентрацій мікроелементів у середовищі вирощування бактерій чинить значний токсичний ефект на мікроорганізми.

Вирішенням даної проблеми є використання нанотехнологій, саме вони дозволяють підвищити ефективність мікроелементів, переводячи їх у біологічно активну форму – нанокарбоксилати, та забезпечують контрольоване вивільнення добрив і цільову доставку біомолекул [125, 126].

Препарати на основі таких мікроелементів мають ряд переваг порівняно із препаратами на основі неорганічних солей. Зокрема, вони практично нетоксичні, повністю розчинні у воді та легко засвоюються рослинами, стійкі у діапазоні рН ґрунту та не зв'язуються ним у важкорозчинні сполуки, не руйнуються мікроорганізмами. Такі препарати забезпечують підвищення стійкості до

несприятливих погодних умов і збільшення врожайності майже всіх продовольчих і технічних культур [127]. Ефект тут досягається завдяки більш активному проникненню мікроелементів у рослину за рахунок нанорозміру частинок та їх нейтрального статусу. Тому перспективним видається створення комплексних препаратів на основі суміші нанокарбоксилатів металів та активних штамів *B. japonicum* з метою інтенсифікації процесу азотфіксації, які б дозволяли знизити токсичний вплив мікроелементів на рослини та витрати на передпосівну обробку насіння.

На сьогодні біологічна азотфіксація – це безальтернативний шлях забезпечення рослин азотом, який не порушує екологію природного середовища. Крім того, широке використання біологічної фіксації N_2 у практиці сучасного сільськогосподарського виробництва дозволяє забезпечити високий вихід рослинного білка з гектара без застосування екологічно небезпечних мінеральних добрив. Тому обробка насіння бобових культур мікробними препаратами є одним із важливих агротехнічних прийомів у технологіях їх вирощування [128].

Отримання високих урожаїв сільськогосподарських культур не можливе без надійного захисту від шкідливих організмів, серед яких значною шкодочинністю відзначаються хвороби. Так, відомо близько 120 збудників хвороб сої, серед них патогени грибною, бактеріальною та вірусною етіології. Часто рослини інфікують одночасно кілька збудників хвороб, що призводить до зниження енергії проростання насіння та його схожості, зрідження посівів, зменшення фотосинтетичної поверхні листового апарату, як наслідок знижується урожайність насіння, вміст білка та жиру [129].

У передових країнах світу й Україні домінуючим є хімічний метод захисту рослин від збудників хвороб різної етіології. Величезних обсягів набула обробка насіння та посівного матеріалу пестицидами, мікродобривами і регуляторами росту рослин, що в сукупності, окрім захисної функції, підсилює імунітет рослин [130].

Із появою нових фунгіцидів, сортів бобових рослин і штамів бульбочкових бактерій виникає потреба в ретельному вивченні токсичної дії цих речовин на мікро- і макросимбіонти та на бобово-ризобіальну систему в цілому. Особливої гостроти це питання набуває за необхідності суміщення процесів протруювання насіння та його бактеризації [131].

Відомо, що хімічні засоби захисту рослин впливають на ефективність симбіозу бульбочкових бактерій із рослиною-хазяїном. Так, дослідники повідомили про несприятливі наслідки карбендазиму і тираму (фунгіциди) та імазетапіру (гербіцид) на симбіоз бобових рослин з *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti* і *Bradyrhizobium* sp. [132]. Встановлено, що концентрація тираму вище 500 мкг/мл проявляє надзвичайно токсичну дію на ріст і розвиток рослин сої та клітини ризобій [133].

У Бразилії у лабораторних та польових експериментах досліджували можливість сумісної обробки насіння фунгіцидами (на основі беномілу, каптану, карбендазину, карбоксину, дифенококоназолу, тіабендазолу, тираму, толілфлуаніду) з інокуляцією сої активними штамми *Bradyrhizobium* sp. Відзначено зменшення виживання бактерій на насінні внаслідок застосування вказаних препаратів. Зокрема, кількість життєздатних клітин ризобій скоротилася на 62 % через 2 год і на 95 % через добу після обробки посівного матеріалу. Токсичні ефекти досліджуваних фунгіцидів були більш вираженими на піщаних ґрунтах. Тому автори рекомендують застосовувати обробку насіння протруйниками лише у випадках значного накопичення патогенів у ґрунті [134]. Мають місце експериментальні дані про відсутність негативного впливу фундазолу і гезагарду на формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу у інокульованих рослин гороху і вики, на біотичну взаємодію агентів біопрепаратів з природними популяціями діазотрофних і фосфатмобілізуєчих мікроорганізмів, а це свідчить про можливість сумісного використання інокулянтів і пестицидів при вирощуванні вказаних культур [135].

У результаті багаторічних досліджень впливу пестицидів на азотфіксацію сої інші науковці дійшли висновку, що обробка насіння препаратами

фунгіцидної дії (контактний + системний) перед застосуванням інокулянта зменшує кількість бульбочок на коренях сої, спричиняє зменшення фіксації атмосферного азоту і може поставити під загрозу кількість отриманого врожаю, особливо за наявності у ґрунті Со і Мо (джерелом яких у експериментах слугував хлорид кобальту та молібдат натрію). Також визначено, що фунгіциди на основі важких металів, таких як Zn, Cu та Pb, мало сумісні з інокуляцією [136].

Отримані вітчизняними науковцями результати показали, що обробка фунгіцидами з подальшою бактеризацією насіння, в основному, знижувала азотфіксувальну активність симбіотичного апарату сої, утвореного дослідженими промисловими штамами ризобій. Проте є можливість підібрати такі композиції фунгіциду і ризобій, за яких нітрогеназна активність підвищується [137]. Аналізуючи дані літературних джерел, можна дійти висновку, що вплив на макро- та мікросимбіоти діючих речовин хімічних засобів захисту рослин залежить від виду бобових, які вирощують, типу та доз використаних пестицидів, видів і властивостей ризобій та стадії симбіозу, коли відбувається вказаний вплив.

Перспективним є виробництво біопрепаратів на основі стійких до хімічних засобів захисту рослин штамів бульбочкових бактерій. Так, наприклад, виділено толерантний до тебуконазолу ізолят *Rhizobium* MRP1, який при внесенні у субстрат вказаної діючої речовини у концентраціях від 100 до 300 мкг на 1 кг та інокуляції насіння гороху забезпечував підвищення показників азотфіксації, кількості насіння та білковість зерна, у порівнянні з неінокульованими рослинами, вирощеними в умовах фунгіцидного стресу [138].

У роботі Тагіґ зі співавт. [139] ризобії гороху визначили як стійкі до діючих речовин пестицидів, які належать до класу бензimidазолів. За даними Якименко [140] інокуляція сої на фоні обробки протруйником максимум забезпечувала більш інтенсивне утворення бульбочок на коренях, приріст надземної маси та прибавку врожаю порівняно з бактеризацією «у чистому вигляді». Shahid та Saghir Khan [141] досліджували штам *B. japonicum* RV9 у чистій культурі та симбіозі з

рослинами машу за дії гексаконазолу (фунгіцид із класу триазолів). Автори дійшли висновку, що застосування у якості інокулянту вказаного штаму дозволяє зменшити токсичність пестициду. Однак, зі значним збільшенням концентрації фунгіциду відмічали негативний вплив на ріст і розвиток рослин, ультраструктурні анатомічні зміни в сформованих бульбочках та зміни рівня проліну і антиоксидантних ферментів.

Російськими дослідниками доведена можливість, а в умовах значної насінневої та ґрунтової інфекції, необхідність застосування протруйників ТМТД, скарлет, максим, фундазол згідно встановлених регламентів комплексно з інокуляцією. При цьому обробку насіння ТМТД проводити завчасно (за 1,5 місяці до посіву), фундазол, скарлет або максим доцільно застосовувати за 3–5 діб, бактеризацію проводити у день посіву. Такі обробки дозволяють знизити інфекційне навантаження насіння на 60–100 %, зберегти високий рівень азотфіксувальної активності і підвищити урожайність на 10–20 % [142]. Згідно даних Zilli зі співавт. [143], обробка насіння сої фунгіцидами на основі карбендазиму з тирамом є несумісною з інокуляцією *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, що проявляється у зменшенні кількості утворених бульбочок на коренях і зниженні урожаю зерна. При цьому не було відзначено негативного впливу протруйника на кількість симбіотичних утворень і асиміляцію ними азоту у варіантах з інокуляцією насіння сої *B. japonicum* SEMIA 5079 та SEMIA 5080, що підтверджує думку про можливість підбору таких композицій фунгіциду і ризобій, за яких нітрогеназна активність не зменшується.

У лабораторних дослідах у результаті вивчення впливу виробничих норм протруйників фунгіцидної дії на інтенсивність росту штриха чистих культур *B. japonicum* та *Sinorhizobium fredii* встановлено, що препарат віалстраст не вплинув на інтенсивність росту штамів синоризобій і *B. japonicum* 648 а, проте уповільнював до помірного ріст *B. japonicum* БМ-85 та СМ-42; фундазол знижував інтенсивність росту всіх досліджуваних штамів, але не спричинював загибелі чистих культур ризобій; препарат максим не впливав на ріст штамів швидкорослих синоризобій (КБ-11, ББ-55, ББ-49), а на ріст штамів

повільнорослих бактерій *B. japonicum* (648 а, БМ-85, СМ-42) проявив стимулюючу дію [144]. Слід зазначити, що результати лабораторного тестування штамів щодо їхньої резистентності до фунгіцидів не завжди корелюють із їх ефективністю у бобово-ризобіальній системі за умов застосування хімічних засобів захисту рослин. Тому актуальним є проведення вегетаційних експериментів для вивчення процесів формування та функціонування симбіотичних систем сої зі стійкими до пестицидів бульбочковими бактеріями за впливу нових, сучасних хімічних засобів захисту рослин.

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили у лабораторних, вегетаційних і польових умовах на базі Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, а також в умовах Київської області на експериментальній ділянці Науково-виробничого відділу «Олександрія» Інституту захисту рослин НААН України.

Об'єкти досліджень

У експериментах були залучені рослини родини бобових (Fabaceae):

- соя (*Glycine max* L. (Merill)) сортів: Лісабон, Алмаз, Васильківська. Сорт Лісабон (оригіна́тор Заатбау (Saatbau) – раннього дозрівання 105–110 днів, маса 1000 насінин 190 г. Сорт Алмаз – ранньостиглий, вегетаційний період складає 100–105 днів, високопластичний до кліматичних умов, маса 100 насінин – 190–220 г. Сорт занесено до Реєстру сортів рослин України на 2007 р. і рекомендовано для вирощування у Лісостепу України. Сорт Васильківська (оригіна́тори Селекційно-генетичний інститут, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Інститут землеробства) – середньоранній, стійкий до вилягання, осипання, середньостійкий до ураження хворобами; маса 100 насінин – 170–200 г;
- люцерна (*Medicago sativa* L.) сорту Серафима (оригіна́тор – Інститут землеробства південного регіону УААН). Даний сорт посухостійкий та зимостійкий, незначно уражується хворобами, характеризується високою адаптаційною та азотфіксуючою здатністю, напрям використання - сінокісний.

При виконанні досліджень використовували **бактерії** із музейної Колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України:

- повільнорослі бульбочкові бактерії сої (*Bradyrhizobium japonicum*) штамів 634б, 646, 614а, 631, 622, 646, 606, 603, 102с, W12, К, 71т, 10к, В1, 69г, G80, М8 і Tn5-мутанти *B. japonicum* (634б і 646), зокрема В1-20 і 107, а також нові перспективні штами *B. japonicum* аналітичної селекції РС07, РС08. Штами

B. japonicum PC07 та PC08 виділені з бульбочок сої сорту Київська 27, яка росла на темно-сірому опідзоленому ґрунті в Уманському районі Черкаської області України. За результатами первинного скринінгу в подальших дослідженнях використовували Tn5-мутанти *B. japonicum* штаму 6346 – Д36, Д37, Д87 і Tn5-мутанти штаму 6466 – В75, В78, В79, В81, В81а, В94, В128, В157, В82, В130, В131, В137, В139, В140, В144, В154, В163, В166, відібрані за покращеними симбіотичними властивостями на підвищеному фоні мінерального азоту (0,75 норми за Гельрігелем). *B. japonicum* PC07, PC09 та Tn5-мутанти В78 та В144 за результатами попередньо проведених лабораторних дослідів проявили стійкість до виробничих норм фунгіцидів у чистій культурі [145, 146];

- швидкорослі бульбочкові бактерії люцерни (*Sinorhizobium meliloti*) штамів 441, 448а та СН;
- ізоляти ризосферних бактерій сої F1 і гороху RP13;
- *Azotobacter chroococcum* T79;
- кишкова паличка *Escherichia coli* S17-1 із плазмідною рSUP5011, (рSUP5011::Tn5mob), яка містить транспозон Tn5 [147].

Лабораторні досліді

Умови культивування мікроорганізмів. Бульбочкові бактерії та ризосферні мікроорганізми вирощували на рідкому і агаризованому манітно-дріжджовому середовищі залежно від досліді, а азотобактер – на середовищі Ешбі до початку стаціонарної фази росту при температурі 28° С. Бактеріальні суспензії готували шляхом змиву біомаси мікроорганізмів із поверхні поживного середовища стерильною водопровідною водою. Оптичну густина суспензії визначали за допомогою фотоколориметра-нефелометра ФЕК-56М (СРСР).

Одержання корневих та насінневих ексудатів. Для одержання ексудатів насіння сої стерилізували 15 %-ним перекисом водню із наступним промиванням стерильною водою, розкладали на чашки Петрі в асептичних умовах та витримували протягом шести і двадцяти годин. Ексудати центрифугували, фільтрували за допомогою мембранного фільтра (Millipore Co., США), перевіряли на стерильність шляхом висіву на поживне середовище та

використовували в подальших експериментах. В іншому випадку для одержання ексудату насіння сої його розкладали на чашки Петрі в асептичних умовах, додавали стерильну водопровідну або дистильовану воду та витримували протягом шести годин. Для одержання ексудату коренів насіння сої стерилізували перекисом водню, промивали і пророщували в стерильних умовах протягом двох діб. Кореневі ексудати збирали у стерильне середовище Прянішнікова протягом доби, після чого центрифугували, стерилізували і використовували для обробки бактеріальної суспензії. Кількість білку в ексудатах визначали за Вітакером [148] із залученням спектрофотометра BIORAD SmartSpectPlus (США). Ексудати насіння сої вирівнювали по білку, вміст якого становив 1,0 мг/мл.

Визначення азотфіксувальної активності ризобактерій. При дослідженні азотфіксувальної активності ризобактерій ацетиленовим методом [149], попередньо підготовлені суспензії цих мікроорганізмів (до суспензій додавали 10^7 ризобій та/або 10 мкл ексудатів насіння сої) вносили у флакончики для визначення азотфіксації у кількості 1 мл, додавали 10 % ацетилену, інкубували протягом 4 год та оцінювали рівень азотфіксації за допомогою газового хроматографа Agilent 6850 (USA), обладнаного полум'яно-іонізаційним детектором. Титр мікроорганізмів у суспензіях ризобактерій складав 10^8 .

Розчини вуглеводів – глюкози (Glc), галактози (Gal), N-ацетил-D-глюкозаміну (GlcNAc), N-ацетил-D-галактозаміну (GalNAc) **готували** у вигляді маточних розчинів (0,01M), які стерилізували при 0,5 атм протягом 20 хв. Ростову активність бульбочкових бактерій сої за дії моноцукрів у середовищі росту в умовах *in vitro* оцінювали за оптичною густиною суспензії (на спектрофотометрі «Smart Spec Plus Bio-Rad» (США) при довжині хвилі 560 нм) та кількістю життєздатних клітин бактерій у суспензії (методом серійного розведення суспензії, висіву культури на тверде середовище росту й підрахунку колоній [150]) протягом трьох тижнів росту культури, а також застосовували показники – час генерації (g) – відрізок часу, впродовж якого кількість бактерій

у середовищі подвоюється і кількість поколінь за добу (N), яка характеризує швидкість розмноження мікроорганізмів [151].

Добір компетентних штамів для проведення транспозонового мутагенезу проведено за селективними маркерами стійкості до стрептоміцину (800–1000 мкг/мл) та чутливості до канаміцину (25–50 мкг/мл), оскільки спектр штамів бульбочкових бактерій, до яких можна застосувати метод транспозонового мутагенезу обмежується особливостями залученого вектора (pSUP5011::Tn5mob). Уведення транспозону до клітин бульбочкових бактерій (унаслідок міжродової кон'югації між *E. coli* S17-1(pSUP5011::Tn5mob) і штамми *B. japonicum* 646 та 6346) проведено за методикою, описаною в літературі [152, 153]. Частоту транспозиції (V) обчислювали за співвідношенням:

$$V = \frac{\text{кількість клітин в «0» розведенні, на N79 (або МДА) + Km + Str}}{\text{кількість клітин у «x» розведенні, які вирости на N79 (або МДА) + Str}}$$

Tn5-мутанти *B. japonicum* відбирали, використовуючи контрелекцію проти батьківських штамів: за набутою стійкістю до канаміцину (200 мкг/мл) від штамів-реципієнтів (бульбочкових бактерій), а за стійкістю до стрептоміцину – відповідно від клітин штаму-донора (*E. coli*).

За результатами первинного скринінгу в подальших дослідженнях використовували Tn5-мутанти *B. japonicum* штаму 6346 – Д36, Д37, Д87 і Tn5-мутанти штаму 6466 – В75, В78, В79, В81, В81а, В94, В128, В157, В82, В130, В131, В137, В139, В140, В144, В154, В163, В166, відібрані за покращеними симбіотичними властивостями на підвищеному фоні мінерального азоту (0,75 норми за Гельрігелем).

Відновлення фізіологічної активності бульбочкових бактерій *B. japonicum* та визначення бактеріального титру інокулянтів проведено за використання стандартних мікробіологічних методів [154]. Культури *B. japonicum* вирощували на синтетичному середовищі манітно-дріжджовий агар (МДА) г/л: K₂HPO₄ – 0,5;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,1; маніт – 10,0; дріжджовий екстракт – 0,5; агар – 15,0 – 17, 0, дистильована вода, рН 6,8–7,0 протягом 7–8 діб при 28°C.

Приготування інокуляційних бактеріальних суспензій. Біомасу бактерій із поверхні агару змивали водою, суспендували. Водні суспензії ризобій вирівнювали між собою в межах досліду за стандартом каламутності. Інфекційне навантаження становило 10^8 – 10^9 клітин / мл. Насіння сої, простерилізоване 70 %-ним етанолом протягом 15 хв, промивали проточною водою та інокулювали суспензією бульбочкових бактерій протягом 1 год.

Конкуренездатність Tn5-мутантів *B. japonicum* визначали непрямим методом (за масою рослин, інокульованих досліджуваним ефективним штамом у суміші з неефективним штамом-тестером *B. japonicum* 604к) і розраховували за формулою Амаргер [155].

Динаміку життєздатності стійких до фунгіцидів бульбочкових бактерій *B. japonicum* на поверхні інокульованого насіння (КУО / 1 насінині) на фоні завчасного (за 2 год) протруювання препаратами Максим XL та Февер визначали в умовах лабораторного досліду. Готували серію послідовних розведень отриманого змиву з насінин із наступним посівом на чашки Петрі з МДА. Кількість життєздатних клітин ризобій на поверхні насіння визначали через 2 год та 7, 14, 21, 28 діб після бактеризації насіння. Підраховували КОЕ на чашках Петрі, визначали число бактерій на одній інокульованій насінині сої. Повторність 4-кратна.

Первинний скринінг та вивчення Tn5-мутантів *B. japonicum* за симбіотичними властивостями і впливом на Eff⁺⁺-фенотип рослин здійснені в умовах вегетаційного досліду.

З метою створення комплексних мікробних препаратів із нанокарбоксилатами культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували при 26–28 °C на манітно-дріжджовому середовищі наступного складу (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,2, NaCl – 0,1, дріжджовий екстракт – 1,0, маніт – 10,0 [156]. У манітно-дріжджове середовище у відповідних варіантах вносили нанокарбоксилати: германію, молібдену, ванадію, кобальту, заліза, міді

і цинку. Використані препарати мікроелементів надані ТОВ «Науково-виробнича компанія «АВАТАР»» (Україна, м. Київ). Розчини мікроелементів використовували у розведенні 1:500, 1:1000, 1:5000. Контроль у даному досліді – культивовані на манітно-дріжджовому середовищі без додатково внесених речовин *B. japonicum* 6346. Для виявлення оптимального способу використання нанокарбоксилатів стерилізацію внесених сполук і поживного середовища здійснювали як окремо, так і разом. Після додавання карбоксилатів мікроелементів у середовище, його перевіряли на наявність спонтанної контамінації шляхом висіву на м'ясо-пептонний агар. Визначення кількості мікроорганізмів (за показником оптичної густини) проводили за допомогою стандартної методики із залученням спектрофотометра BIORAD SmartSpecPlus (США) при довжині хвилі 600 нм. Вимірювання оптичної густини проводили на третю та четверту доби культивування.

Для дослідження стабільності комбінованих біопрепаратів на основі ризобій та мікроелементів за умов їх довготривалого зберігання, проведено модифікацію рідкого бактеріального препарату «Ризостим». У манітно-дріжджове середовище додатково вносили нанокарбоксилати Fe та Ge в концентрації 1:1:1000. Вирощування бактерій здійснювали аналогічно попередньому досліді. За контроль брали стандартний препарат «Ризостим» без додатково внесених речовин. Після стерилізації середовище витримували протягом тижня та перевіряли на наявність спонтанної контамінації.

Вимірювання у готових бактеріальних добривах проводили двічі: 1) у день виготовлення препаратів, 2) після їх довготривалого зберігання (30 та 45 діб).

Вегетаційні досліді

Проводили на спеціально обладнаному вегетаційному майданчику ІФРГ НАН України. Рослини вирощували у піщаній культурі з додаванням поживного розчину Гельрігеля [157], за природних освітлення та температури.

Вплив ексудатів насіння і коренів сої на формування соєво-ризобіального симбіозу вивчали з використанням піщаної культури з додаванням середовища Гельрігеля (0,2 норми азоту), упродовж травня-липня. Насіння поверхнево

стерилізували 16 %-ним перекисом водню і ретельно промивали стерильною водою. Після цього інокулювали суспензіями бульбочкових бактерій *V.japonicum* 634б, попередньо інкубованих із ексудатами. Частина насіння сої обробляли бінарними суспензіями мікроорганізмів, що включали бульбочкові бактерії *V.japonicum* 634б і ризобактерії у співвідношенні 1:0,1 та/або шестигодинний ексудат і витримували протягом доби. Рослини сої відбирали у фази примордіальних і двох трійчастих листків, також у фазу бутонізації. Контрольні рослини інокулювали культурою бульбочкових бактерій без додаванням досліджуваних ексудатів чи ризобактерій. Дослід проводили у трикратній чи чотирикратній повторності.

З метою з'ясування фізіолого-біохімічних особливостей реакції сої та люцерни, інокульованих різними за активністю штамми ризобій, на недостатнє водозабезпечення проведено серію вегетаційних дослідів. Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на манітно-дріжджовому середовищі протягом 9 діб при 26–28°C. Перед посівом простерилізоване 70 %-ним етанолом і промите під проточною водою впродовж 1 год насіння інокулювали суспензіями бульбочкових бактерій різної ефективності (титр *V. japonicum* – 10^8 клітин у 1 мл).

Рослини сої вирощували у 10-кілограмових посудинах у піщаній культурі із внесенням поживної суміші Гельрігеля з 0,25 норми азоту за оптимального водозабезпечення (60 % повної вологості (ПВ)). У фазу трьох справжніх листків створювали модельну посуху 40 % ПВ, а у фазу бутонізації вологість субстрату знижували до 30 % ПВ, застосовуючи контрольований полив рослин. Тривалість посухи підтримували упродовж 12 діб, після чого полив у всіх варіантах відновлювали до оптимального рівня (60 % ПВ) у фазу масового цвітіння впродовж 5 діб. Контролем слугували неінокульовані та інокульовані ризобіями рослини сої, що зростали за оптимального поливу (60 % ПВ). Для проведення досліджень відбирали бульбочки, корені та листки сої у фази трьох справжніх листків, бутонізації та масового цвітіння.

Рослини люцерни вирощували у 4-кілограмових посудинах (7 рослин/посудину) на промитому річковому піску вологістю 60 % ПВ та 40 % ПВ. Джерелом мінерального живлення була суміш Гельрігеля, що містила 0,25 норми азоту. Перед посівом насіння стерилізували концентрованою сірчаною кислотою упродовж 5 хв, промивали у проточній водопровідній воді та інокулювали бульбочковими бактеріями *S. meliloti* штамів 441, 448а та СН. Тривалість інокуляції насіння – 1 год.

Перед посівом у посудинах створювали різні режими водозабезпечення: 60 % ПВ – оптимальне та 40 % ПВ – недостатнє, які в подальшому підтримувалися шляхом контрольованого поливу. Через 20 діб після посіву, в період появи у більшості рослин першого трійчастого листка, полив відновлено до рівня оптимального водозабезпечення у всіх варіантах досліду. Відбори зразків для аналізу здійснювали на 23, 29 та 37 доби після посіву, що відповідало фазам початок стеблуння, стеблуння, бутонізація, при цьому початок стеблуння за 60 % ПВ характеризувався наявністю у рослин чотирьох трійчастих листків, тоді як за 40 % ПВ – двох-трьох трійчастих листків.

При перевірці високоефективних конкурентоздатних штамів бульбочкових бактерій, отриманих методами традиційної селекції та транспозонового мутагенезу сою вирощували у пластикових посудинах (на 10,0 кг субстрату) по 8 рослин у кожній на річковому піску, збагаченому сумішшю Гельрігеля з вмістом 0,25 та 0,75 норми азоту $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ за 60 %-ної вологості субстрату (рис. 1.1). Повторюваність у варіантах досліду 5-кратна. У дослідах були варіанти із завчасною (за 7 діб та 14 діб до посіву насіння) та з інокуляцією в день посіву.

Упродовж вегетації рослин у фази трьох справжніх листків, бутонізації та бутонізації-початку цвітіння, повне цвітіння визначали азотфіксувальну активність, формування кореневих бульбочок (кількість та масу).

Із метою дослідження ефективності комплексних мікробних препаратів із нанокарбоксилатами рослини сої вирощували у 4-кілограмових посудинах у піщаній культурі із внесенням поживної суміші Гельрігеля з 0,25

норми азоту за оптимального (60 % ПВ) водозабезпечення. Насіння перед посівом



А.....Б

Рисунок 1.1 – Загальний вигляд дослідів, рослини сої у фази: А – початок утворення третього справжнього листка, Б – бутонізація-початок цвітіння

стерилізували 70 %-ним розчином етанолу і промивали проточною водою. Інокуляцію проводили впродовж 1 год ризобіями штамів 634б та 604к, вирощеними на середовищі із додаванням нанокарбоксилатів молібдену, заліза, германію у розведенні 1:1000 згідно розробленої схеми дослідів: 1. насіння + *V. japonicum* 634б (контроль 1); 2. насіння + *V. japonicum* 634б + Мо; 3. насіння + *V. japonicum* 634б + Fe; 4. насіння + *V. japonicum* 634б + Ge; 5. насіння + *V. japonicum* 604к (контроль 2); 6. насіння + *V. japonicum* 604к + Мо; 7. насіння + *V. japonicum* 604к + Fe; 8. насіння + *V. japonicum* 604к + Ge.

Дослідження впливу обробки бактеріальними препаратами, що містили суміші нанокарбоксилатів металів, на симбіотичний апарат і продуктивність сої проводили за тих же умов, що і попередній вегетаційний дослід, за схемою: 1. *V. japonicum* 634б (контроль); 2. *V. japonicum* 634б + Ge; 3. *V. japonicum* 634б + Ge + Мо; 4. *V. japonicum* 634б + Ge + Fe.

Зразки для аналізу процесів формування та функціонування симбіотичного апарату проводили у фази: трьох справжніх листків, бутонізації та цвітіння. Вимірювання інтенсивності фотосинтезу здійснювали у фази трьох справжніх листків та бутонізації.

У дослідженнях із вивчення ефективності інокуляції сої бульбочковими бактеріями за дії фунгіцидів використовували препарати контактної-системної та системної дії з різними діючими речовинами:

1) Максим XL («[Syngenta](#)», Швейцарія) – протруйник контактної і проникаючої дії. Діючі речовини флудіоксоніл (25 г/л, клас фенілпіроли) та металаксил–М (10 г/л, клас феніламідів). Норма витрати препарату для обробки насіння сої – 1,0 л/т, використання робочого розчину – 10 л/т насіння;

2) Февер («[Bayer CropScience AG](#)», Німеччина) – протруйник контактної-системної дії із активною діючою речовиною протіокназол (300 г/л, підклас триазолінтіонів); норма витрати препарату для обробки насіння сої становить 0,2–0,4 л/т, використання робочого розчину – 10 л/т насіння;

3) Стандак Топ («[BASF](#)», Німеччина) – інноваційний протруйник для контролю основних хвороб та шкідників сої з діючими речовинами фіпроніл (250 г/л; клас фенілпіразоли) + тіофанат-метил (225 г/л; клас бензimidазоли) + піраклостробін (25 г/л; клас стробілурини); норма витрати протруйника складає 1–2 л/т, робочого розчину – 10 л/т насіння;

4) Аканто Плюс («[DuPont](#)», США) – фунгіцид на основі пікоксістробіну (200 г/л, клас стробілурини) + ципроконазолу (80 г/л; клас триазоли). Препаратом здійснюють обприскування рослин у період вегетації для захисту від хвороб листкового апарату, з нормою витрати 0,5–0,75 л/га [158].

Рослини вирощували у 15-кілограмових посудинах. Джерелом мінерального живлення була поживна суміш Гельрігеля, збагачена мікроелементами Мо, В і Си та збіднена на азот – 0,25 норми. Обробку насіння препаратами фунгіцидної дії здійснювали у день посіву, використовуючи їх робочі розчини, приготовлені згідно рекомендацій виробників. Перед посівом оброблене фунгіцидами насіння інокулювали протягом 1 год суспензією клітин активних штамів бульбочкових бактерій. Інфекційне навантаження складало 10^9 кл/мл. У контролі інокульоване насіння не обробляли хімічними засобами захисту рослин.

Польові дослід

Дрібноділянкові польові дослід із соєю (рис. 1.2) закладали на дослідній



А

Б

Рисунок 1.2 – Загальний вигляд дрібноділянкових дослідів, рослини сої у фазах: А – початок утворення третього справжнього листка, Б – бутонізація-початок цвітіння

ділянці ІФРГ НАН України (грунт – сірий лісовий супіщаний, рН 5,9–6,0, вміст гумусу в ньому складав 1,2–1,5 %, фосфору 8,8–10,1, калію 9,4–10,2, легкогідролізованого азоту 10,4–12,6 мг/100 г ґрунту, рН 5,9–6,0). Повторення у варіантах 4-разове, рендомізоване. Бактеризованим насінням сої засівали однометрові рядки по 60 насінин у кожній. Контролі – неінокульоване насіння сої. Глибина загортання насіння сої 3,0–5,0 см, ширина міжрядь – 45 см. Попередник – козлятник східний.

Вплив довготривалого зберігання модифікованого препарату «Ризостим» досліджували в польових умовах Київської області на експериментальній ділянці Науково-виробничого відділу «Олександрія» Інституту захисту рослин НААН України (грунт сірий, супіщаний, рН 5,9–6,0, вміст гумусу 1,2–1,5 %, азоту 10,4–12,6, фосфору 8,8–10,1, калію 9,4–10,2 мг / 100 г ґрунту). Насіння сої сорту Алмаз обробляли: 1) свіжовиготовленим стандартним препаратом, 2) свіжовиготовленим модифікованим препаратом, 3) модифікованим препаратом після довготривалого зберігання.

Насіння сої перед висівом у ґрунт інокулювали суспензією *V.japonicum* 6346 із титром ризобій 10^8 кл/1 мл. Посів сої проводили з розрахунку 600 тис. схожих насінин на 1 га. Насіння сої висівали на глибину 3–5 см, ширина міжрядь – 45 см, облікова площа ділянки – 15 м². У фазу бутонізації–початку цвітіння визначали азотфіксувальну активність, а також кількість і масу бульбочок на коренях сої. Повторність досліду – 6-разова. У всіх дослідах дотримувалися загальноприйнятої агротехніки.

Нодуляційну здатність ризобій визначали за підрахунком кількості та маси корневих бульбочок.

Азотфіксувальну активність вимірювали ацетиленовим методом [149, 159] на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США) з полуменево-іонізаційним детектором. Для цього корені з бульбочками поміщали в герметично закриті скляні флакони ємкістю 75 см³, у яких створювали 10 % концентрацію ацетилену. Тривалість інкубації – 1 год. Після інкубації газову суміш, яка містила етилен, утворений в результаті редукції ацетилену нітрогеназою, аналізували на газовому хроматографі. Загальну АФА виражали у молярних одиницях утвореного етилену в розрахунку на одну рослину за 1 год (мкмоль С₂Н₄ / рослину × год). Питому АФА – у молярних одиницях утвореного етилену за 1 год в перерахунку на одиницю маси корневих бульбочок (мкмоль С₂Н₄/ г бульбочок × год).

Інтенсивність ПОЛ оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів у результаті кольорової реакції з тіобарбітуровою кислотою на спектрофотометрі за довжини хвилі 532 нм [160]. Результати представлено у нмоль МДА на г маси сухої речовини. Масу сухої речовини визначали шляхом висушування зразків надземної та підземної частин рослин до постійної величини за температури +105°C.

Вміст пероксидів визначали феротіюціанітним методом Сагісакі [161] та розраховували за калібрувальною кривою, побудованою із відомими концентраціями Н₂О₂. Результати представлено у мкмоль Н₂О₂ на г маси сухої речовини.

Активність АПО (КФ 1.11.1.11) – за зменшенням оптичної густини при довжині хвилі 290 нм протягом 2 хв у результаті окиснення аскорбату ($\epsilon = 2,8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) [98]. Активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали за здатністю ензиму інгібувати фотохімічне відновлення нітросинього тетразолія [97]. Оптичну густину вимірювали при 560 нм. Активність КАТ (КФ 1.11.1.6.) визначали за розвитком кольорової реакції з молібдатом амонію при довжині хвилі 410 нм на спектрофотометрі «Smart Spec Plus» згідно модифікованої методики Доліби зі співавт. [162]. Результати визначення активності ферментів представлено у перерахунку на **вміст (мг) сумарного розчинного білка**, який **визначали** за Бредфордом [163].

Інтенсивність фотосинтезу визначали у контрольованих умовах за допомогою оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ГІАМ-5М (Росія), увімкненого за диференціальною схемою. Для вимірювань використовували середню долю невідокремленого від рослини третього зверху листка, яку розміщували в термостатованій камері. Листок освітлювали лампою КГ-2000 через водяний фільтр. Щільність потоку ФАР у камері становила 400 Вт/м^2 , температура – $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Через камеру продували повітря із природною концентрацією CO_2 зі швидкістю 1 л/хв. Інтенсивність поглинання CO_2 на світлі вимірювали через 30–40 хв після розміщення листка у камері, за досягнення стаціонарного рівня. Розрахунки проводили за загальноприйнятою методикою [164].

Статистична обробка експериментальних даних виконана за Доспеховим [165] при використанні методів статистичного аналізу програми Microsoft Excel. У таблицях і на рисунках представлені середні арифметичні та їх стандартні похибки.

Дані стосовно окисно-відновних ферментів представлені у таблицях та рисунках у вигляді $x \pm \text{SD}$ ($x \pm$ стандартне відхилення). Відмінності між величинами контрольної та експериментальної груп визначали за допомогою тесту Тукі, де відмінності вважалися вірними за $P < 0,05$ (з урахуванням поправки на Бонфероні).

3 ДОСЛІДИТИ БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ В ПРИСУТНОСТІ РИЗОСФЕРНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА ДІЇ БІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ

3.1 Азотфіксувальна активність ризобактерій за дії бульбочкових бактерій та ексудату насіння сої

Дослідження в чистій культурі показали (рис. 3.1), що бульбочкові бактерії сої пригнічують азотфіксувальну активність бактерій RP 13, виділених з ризосфери гороху. Найбільш виражений інгібуючий ефект відзначався при використанні активного штаму ризобій *V. jarrowicum* 634б. У той же час неактивний штам бульбочкових бактерій *V. jarrowicum* 604к меншою мірою знижував рівень азотфіксації культури ризосферних мікроорганізмів гороху. Внесення шестигодинного ексудату насіння сої, навпаки, викликало активізацію процесів, пов'язаних з функціонуванням нітрогеназного комплексу ризобактерій (рис. 3.1). На це вказує зростання азотфіксувальної активності бактеріальної суспензії RP13.

Схожа тенденція спостерігалась при дослідженні впливу ризобій сої та насінневих ексудатів на азотфіксувальну активність бактерій *A. chroococcum* T79 (рис. 3.2). Так, ефекторна дія активного штаму ризобій *V. jarrowicum* 634б на рівень азотфіксації діазотрофа була більш вираженою порівняно до неактивного штаму *V. jarrowicum* 604к. Однак, внесення культур бульбочкових бактерій до суспензії *A. chroococcum* T79, на відміну від ризобактерій гороху RP13, не викликало суттєвого погіршення функціонування нітрогенази (рис. 3.2). Як і у випадку з ризобактеріями гороху RP13, ексудат насіння сої сприяв збільшенню азотфіксувальної активності азотобактера. Тенденція до покращення азотфіксації спостерігалась також при додаванні до азотобактера бульбочкових бактерій неактивного штаму *V. jarrowicum* 604к.

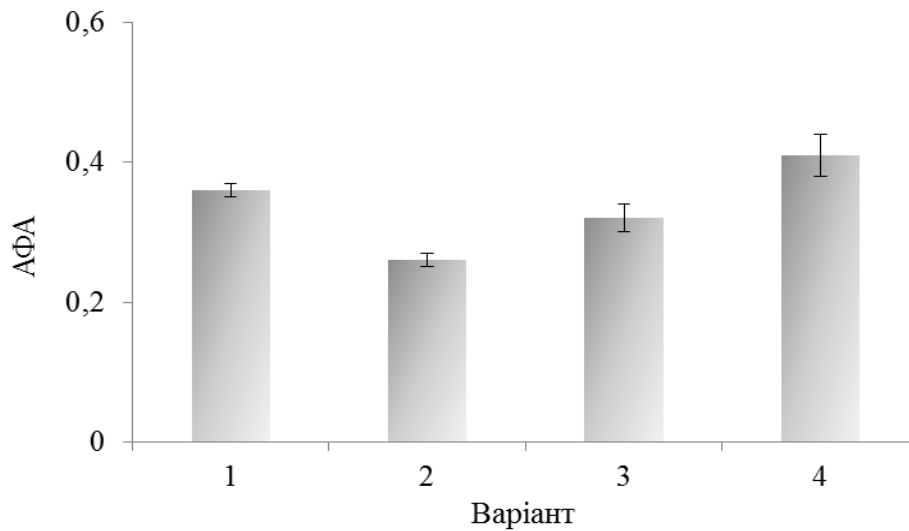


Рисунок 3.1 – Азотфіксувальна активність (АФА, мкмоль $C_2H_4/(10^8$ бактеріальних клітин \times 4 год) ризобактерій гороху RP13 за дії бульбочкових бактерій сої і ексудату насіння сої: 1 – ізолят ризобактерій RP13 (контроль), 2 – ізолят ризобактерій RP13 + *V. japonicum* 634б, 3 – ізолят ризобактерій RP13 + *V. japonicum* 604к, 4 – ізолят ризобактерій RP13 + 10 мкл шестигодинного ексудату насіння сої

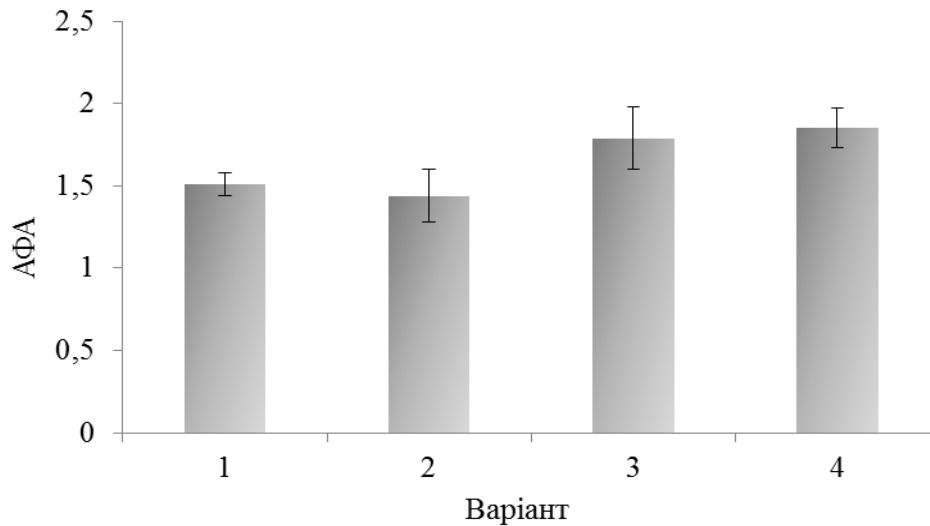


Рисунок 3.2 – Азотфіксувальна активність (АФА, мкмоль $C_2H_4/(10^8$ бактеріальних клітин \times 4 год) бактерій *A. chroococcum* T79 за дії ризобій сої і ексудату насіння сої: 1 – *A. chroococcum* T79 (контроль), 2 – *A. chroococcum* T79 + *V. japonicum* 634б, 3 – *A. chroococcum* T79 + *V. japonicum* 604к, 4 – *A. chroococcum* T79 + 10 мкл шестигодинного ексудату насіння сої

3.2 Активність фіксації азоту змішаними бактеріальними композиціями за дії ексудату насіння сої

Дослідження показали (рис. 3.3), що одночасне внесення до суспензії вільноживучих азотфіксаторів *A. chroococcum* T79 ексудату насіння сої і культури активного штаму бульбочкових бактерій сої *V. jaronicum* 634б призвело до незначного збільшення азотфіксувальної активності азотобактера. Навпаки, у разі використання неактивного штаму ризобій *V.jaronicum* 604к у бінарній композиції з шестигодинним ексудатом насіння сої спостерігалось достовірне зниження рівня азотфіксації у азотобактера (рис. 3.3).

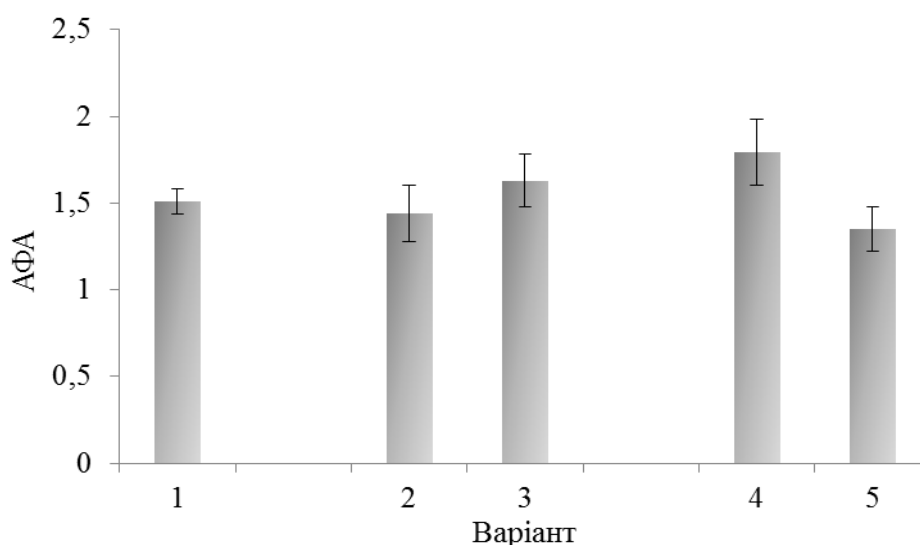


Рисунок 3.3 – Азотфіксувальна активність (АФА, мкмоль C₂H₄/ (10⁸ бактеріальних клітин × 4 год) бактерій *A. chroococcum* T79 за одночасної дії ризобій сої і ексудату насіння сої: 1 – *A. chroococcum* T79 (контроль), 2 – *A.chroococcum* T79 + *V. jaronicum* 634б, 3 – *A. chroococcum* T79 + *V.jaronicum* 634б + шестигодинний ексудат насіння сої, 4 – *A. chroococcum* T79 + *V.jaronicum* 604к, 5 – *A. chroococcum* T79 + *V. jaronicum* 604к + шестигодинний ексудат насіння сої

3.3 Особливості формування соєво-ризобіального симбіозу за дії ризосферних мікроорганізмів та ексудату насіння сої

Експериментальні дані показали (рис. 3.4), що ексудат насіння сої з вмістом білку 1 мг/мл у разі попереднього інкубування з ним ризобій сої *V.japonicum* 634б значно пригнічував процеси бульбочкоутворення. Насіннєві виділення сої мали

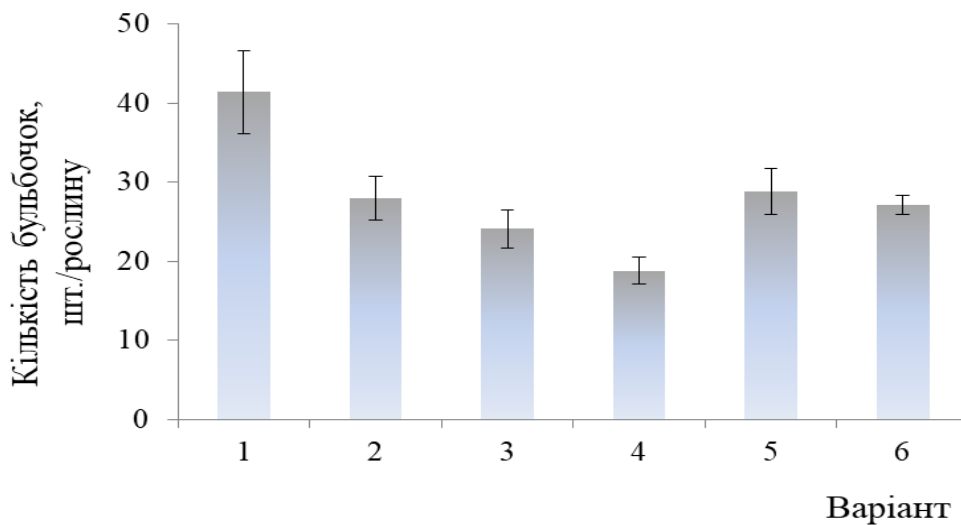


Рисунок 3.4 – Активність бульбочкоутворення *V. japonicum* 634б у симбіозі із рослинами сої за дії ризосферних мікроорганізмів і ексудату насіння сої. На рисунках 3.4 – 3.6: 1 – інокуляція *V. japonicum* 634б, 2 – інокуляція *V. japonicum* 634б з додаванням ексудату, 3 – інокуляція *V. japonicum* 634б + ізолят А20, 4 – інокуляція *V. japonicum* 634б + ризобактерії сої А20 з додаванням ексудату, 5 – інокуляція *V. japonicum* 634б + *A.chroococcum* Т79, 6 – інокуляція *V. japonicum* 634б + *A.chroococcum* Т79 з додаванням ексудату

негативний вплив також на формування бульбочкового апарату за інокуляції рослин змішаними бактеріальними культурами, до складу яких окрім ризобій входили ізолят ризосферних мікроорганізмів сої А20 або бактерії *A.chroococcum* Т79. Слід відзначити, що найменшою була кількість бульбочок у варіанті, де використовували композицію, що включала бульбочкові бактерії *V. japonicum*

6346, ризобактерії A20 і ексудат насіння сої. Ризосферні мікроорганізми за умови їх попереднього інкубування з ризобіями також сповільнювали процес бульбочкоутворення на коренях сої (рис. 3.4). Схожою була тенденція при дослідженні маси бульбочок (рис. 3.5). З іншого боку, шестигодинний ексудат насіння сої позитивно впливав на азотфіксувальну активність соєво-ризобіального симбіозу (рис. 3.6) незалежно від того, здійснювали інокуляцію рослин монокультурою бульбочкових бактерій чи бінарними бактеріальними композиціями на основі ризобій і ризосферних мікроорганізмів.

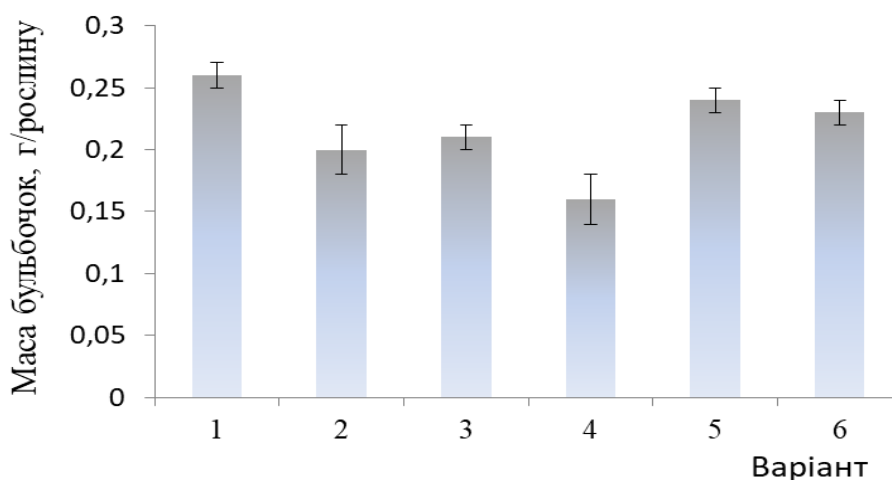


Рисунок 3.5 – Маса бульбочок, сформованих бактеріями *V. japonicum* 6346 на коренях рослин сої за участі ризобактерій сої A20, *A. chroococcum* T79 та ексудату насіння сої

Слід відзначити, що використання ризосферного ізоляту сої F1 у поєднанні з бульбочковими бактеріями і насінневими виділеннями сої мало схожий до дії ізоляту A20 ефект на формування і функціонування симбіотичної азотфіксувальної системи (рис. 3.7 і 3.8).

Внесення шестигодинного ексудату в суспензію бактерій, яка містила бактерії *V. japonicum* 6346 і азотобактер привело до активізації процесів, пов'язаних із функціонуванням нітрогеназного комплексу, що обумовлено не тільки масою бульбочок, а скоріше роботою низки ферментів та біологічно активних речовин із сигнальними властивостями, які забезпечують

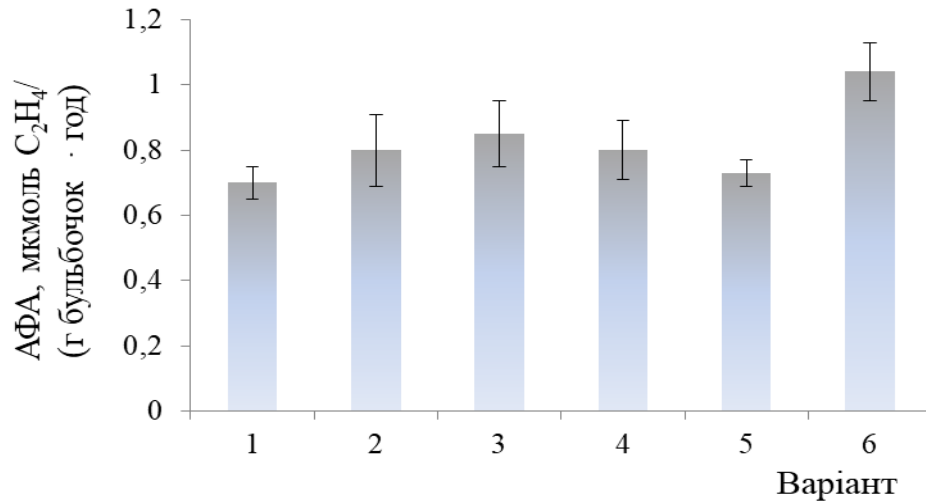


Рисунок 3.6 – Питома азотфіксувальна активність (АФА) соєво-ризобіального симбіозу за інокуляції рослин композиціями ризобій *V.jaronicum* 634б, ризосферних мікроорганізмів сої А20 і *A.chroococcum* Т79 та шестигодинного ексудату насіння сої

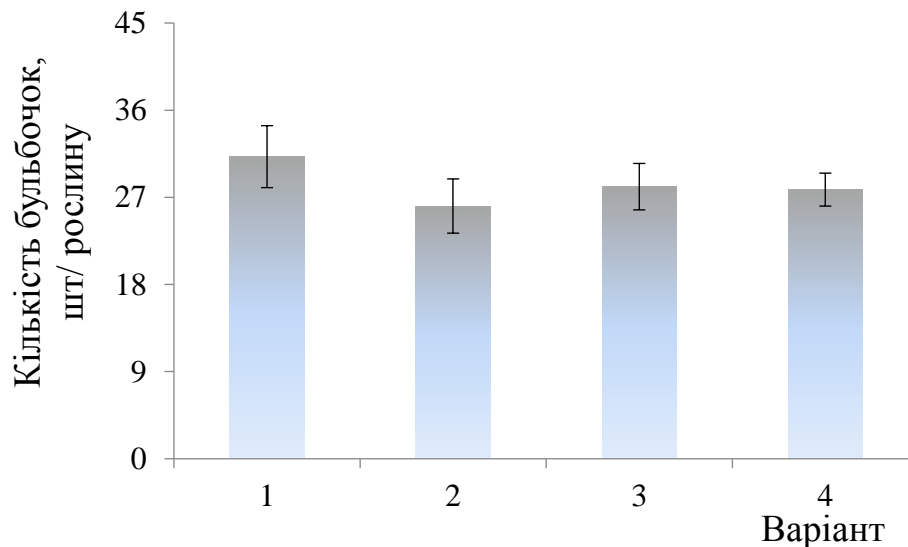


Рисунок 3.7 – Кількість бульбочок, сформованих *V.jaronicum* 634б у симбіозі із рослинами сої за дії ризосферних мікроорганізмів і ексудату насіння сої. На рисунках 3.7 і 3.8: 1 – інокуляція *V. jaronicum* 634б, 2 – інокуляція *V.jaronicum* 634б з додаванням ексудату, 3 – інокуляція *V. jaronicum* 634б + ізолят F1, 4 – інокуляція *V. jaronicum* 634б + ризобактерії сої F1 з додаванням ексудату

функціонування нітрогенази. Літературні дані дають підстави припустити, що між складом ліпополісахаридів ризобій і здатністю цих мікроорганізмів формувати азотфіксуючі бактероїди у бульбочках – спеціалізованих органах на коренях бобових – існує тісний зв'язок [27].

Нещодавні результати досліджень вказують на те, що екsudати деяких бобових рослин можуть викликати зміни у структурі ліпополісахаридів бульбочкових бактерій [166]. Ймовірно, що використання шестигодинного екsudату насіння сої в наших експериментах призвело до модифікації полісахаридної молекули у бактеріальних клітинах *V.japonicum* 634б і, таким чином, вплинуло на активність азотфіксації симбіотичної системи соя-*V.japonicum* 634б.

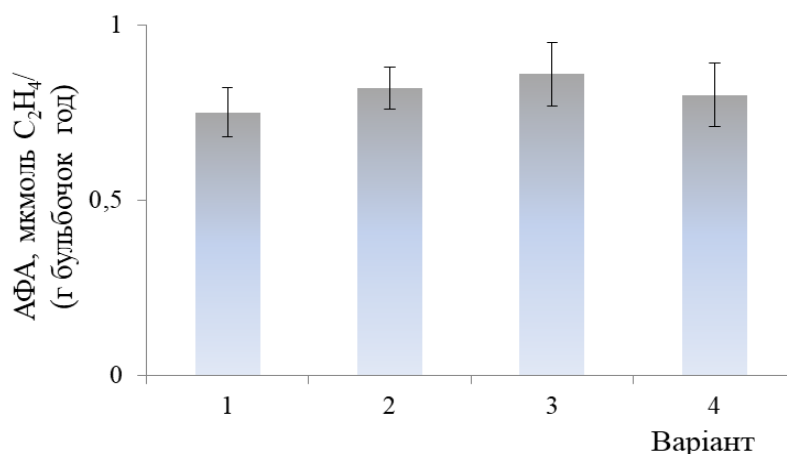


Рисунок 3.8 – Азотфіксувальна активність (АФА) бобово-ризобіального симбіозу за інокуляції рослин сої композиціями ризобій *V. japonicum* 634б, ризосферних мікроорганізмів сої F1 та шестигодинного екsudату насіння сої

Експериментальні дані показали, що шестигодинний насінневий екsudат не мав суттєвої інгібіторної дії на формування надземної частини рослин сої (рис. 3.9). Ризосферні ж мікроорганізми сприяли наростанню біомаси макросимбіонта (рис. 3.9). При цьому бактерії, ізольовані з прикореневої зони сої А20, і діазотроф *A.chroococcum* T79 за умов проведення досліджень впливали на розвиток надземної частини рослин схожим чином (рис.3.9).

Необхідно відзначити, що насіннєві виділення сої та досліджувані ризосферні мікроорганізми не мали суттєвого впливу на розвиток кореневої системи рослин сої у симбіозі з бульбочковими бактеріями *V.japonicum* 634б, про що свідчать показники маси кореня, представлені на рис. 3.10.

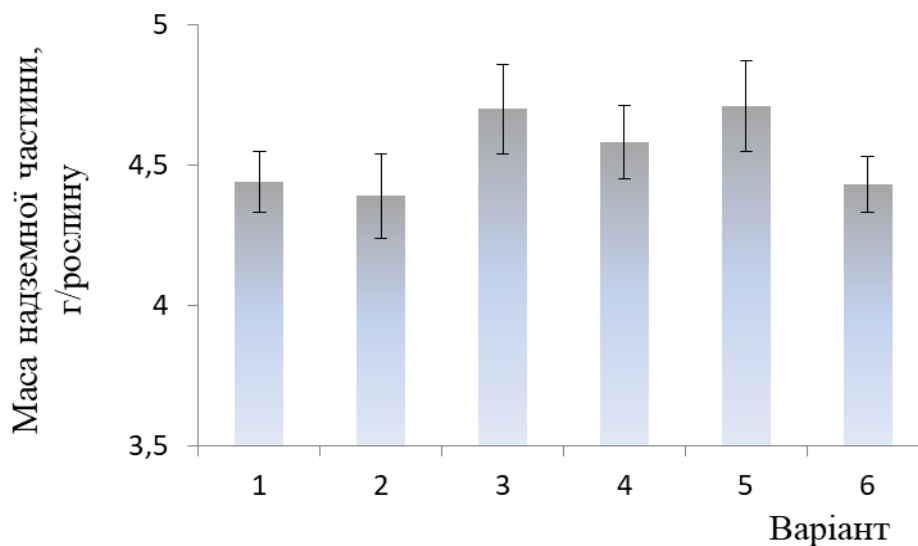


Рисунок 3.9 – Вплив ризосферних бактерій сої A20, *A.chroococcum* T79 і насіннєвого ексудату сої на масу надземної частини рослин сої, що сформували симбіоз з *V.japonicum* 634б. На рисунках 3.9 і 3.10: 1 – інокуляція *V. japonicum* 634б, 2 – інокуляція *V. japonicum* 634б з додаванням ексудату, 3 – інокуляція *V. japonicum* 634б + ізолят A20, 4 – інокуляція *V. japonicum* 634б + ризобактерії сої A20 з додаванням ексудату, 5 – інокуляція *V. japonicum* 634б + *A.chroococcum* T79, 6 – інокуляція *V. japonicum* 634б + *A.chroococcum* T79 з додаванням ексудату

Отже, при інокуляції сої змішаними бактеріальними композиціями на основі штаму бульбочкових бактерій 634б і ризосферних мікроорганізмів за обробки шестигодинним ексудатом насіння сої відбувається сповільнення процесу бульбочкоутворення на коренях рослин та підвищення азотфіксувальної активності соєво-ризобіального симбіозу.

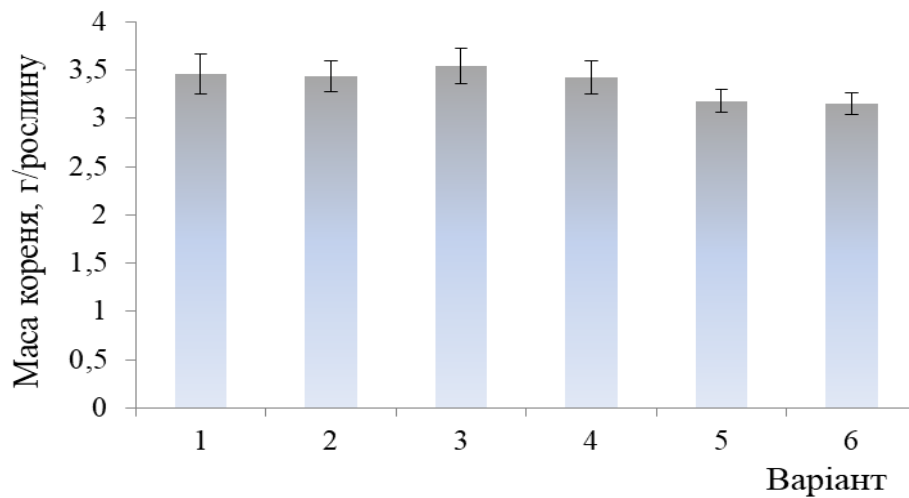


Рисунок 3.10 – Формування кореневої системи сої, інокульованої композиціями бульбочкових бактерій і ризосферних мікроорганізмів з додаванням ексудату насіння сої

3.4 Сумісна дія ексудатів насіння та коренів сої на утворення соєво-ризобіального симбіозу

Експериментальні дані показали (рис. 3.11, 3.12), що ексудат насіння сої з вмістом білку 1,0 мг/мл у разі попереднього інкубування з ним ризобій сої *V. jarrowicum* 634б пригнічував процеси бульбочкоутворення у фази примордіальних та двох справжніх листків порівняно до контролю. Навпаки, ексудат коренів сої у випадку інкубування з ним бактеріальної культури сприяв розвитку бульбочкового апарату за інокуляції рослин підготовленою таким чином мікробною суспензією. Слід відзначити, що активізація бульбочкоутворення за дії кореневого ексудату спостерігалась у фази двох трійчастих листків (рис. 3.12), тоді як у фази примордіальних листків було відзначено недостовірне сповільнення формування бульбочок у цьому варіанті (рис. 3.11).

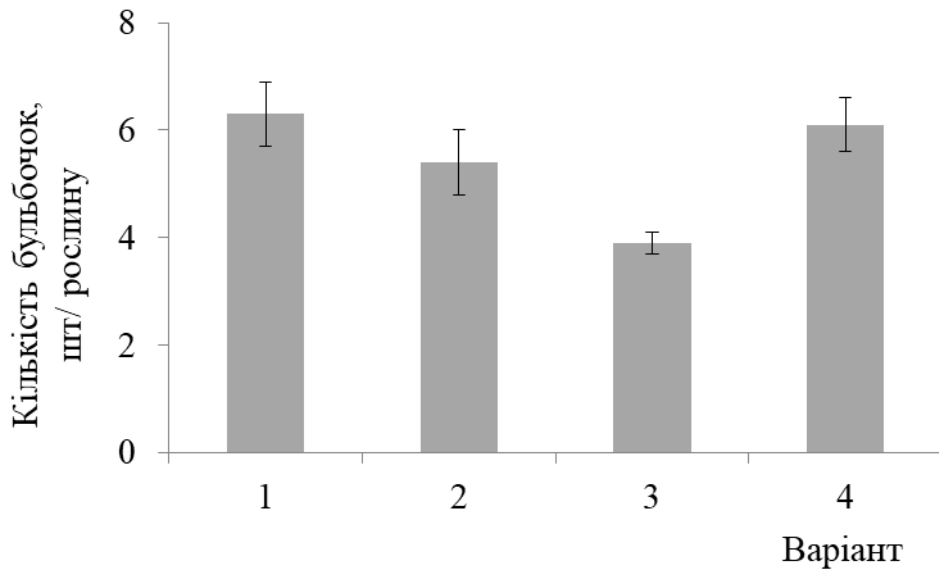


Рисунок 3.11 – Активність бульбочкоутворення *V. japonicum* 634б у симбіозі із рослинами сої за дії ексудатів насіння і коренів сої у фазу примордіальних листків. На рисунках 3.11 – 3.15: 1 – інокуляція *V. japonicum* 634б, 2 – інокуляція *V. japonicum* 634б з додаванням ексудату коренів, 3 – інокуляція *V. japonicum* 634б з додаванням ексудату насіння, 4 – інокуляція *V. japonicum* 634б за сумісного додавання кореневого і насінневого ексудатів

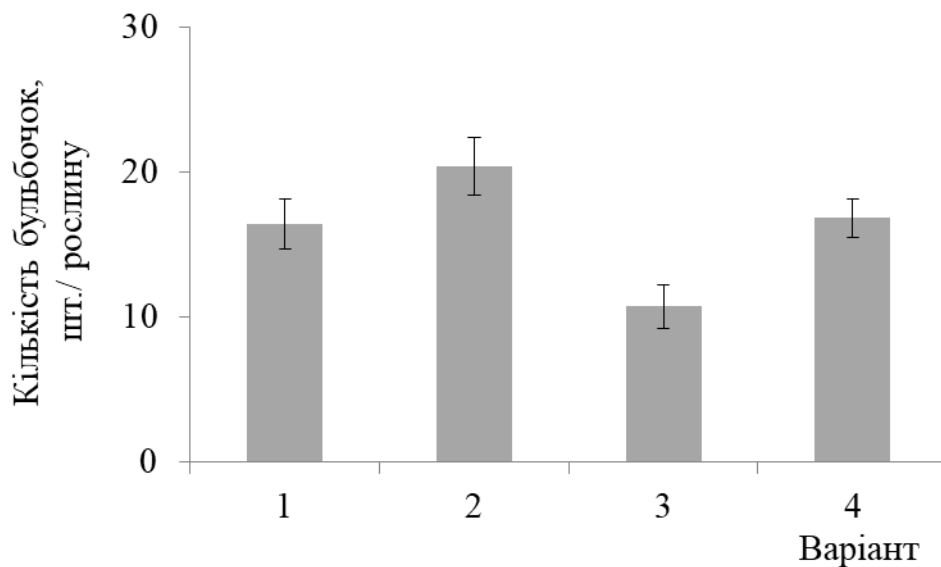


Рисунок 3.12 – Кількість бульбочок, сформованих бактеріями *V. japonicum* 634б на коренях рослин сої за участі ексудатів насіння та коренів сої у фазу двох трійчастих листків

При сумісному застосуванні ексудатів насіння та коренів сої кількість бульбочок була близькою до їх числа на коренях контрольних рослин протягом всього періоду проведення досліджень (рис. 3.11, 3.12). Насіннєві виділення сої знижували азотфіксувальну активність соєво-ризобіального симбіозу при використанні їх як монопрепарат і у поєднанні з кореневим ексудатом (рис. 3.13). У той же час ексудат коренів сої позитивно впливав на процес азотфіксації (рис. 3.13).

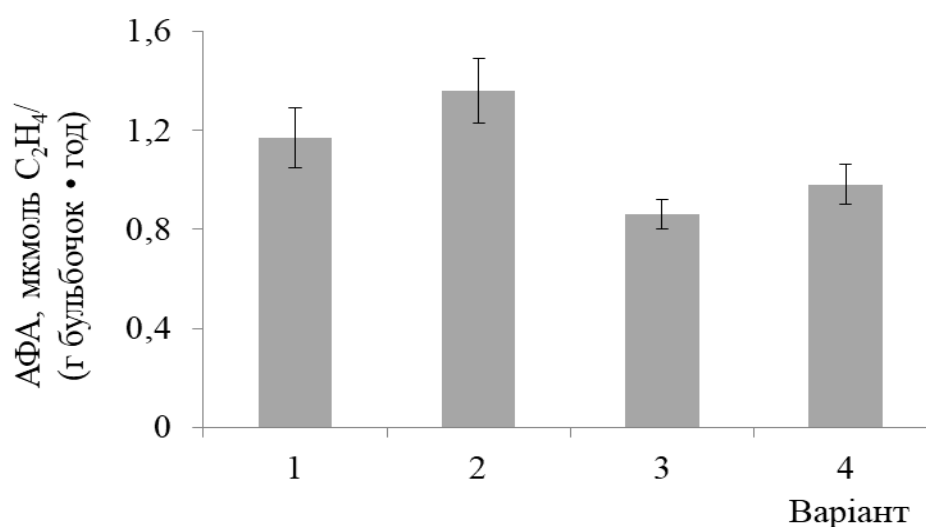


Рисунок 3.13 – Питома азотфіксувальна активність (АФА) соєво-ризобіального симбіозу за інокуляції рослин ризобіями *V. japonicum* 634б, інкубованими з ексудатами насіння і коренів сої у фазу двох справжніх листків

Ймовірно, що використання ексудатів насіння і коренів сої в наших експериментах призвело до модифікації полісахаридів бульбочкових бактерій сої і, таким чином, вплинуло на бульбочкоутворення і активність азотфіксації симбіотичної системи соя – *V. japonicum* 634б. Разом із тим, ексудати можуть впливати на активність експресії генів і синтезу білків у мікроорганізмів, задіяних у процесах, пов'язаних із розвитком рослинно-мікробної взаємодії, зокрема бобово-ризобіального симбіозу. Про це свідчать результати деяких наукових досліджень [167, 168], де було показано, що кореневі ексудати сої містять флавоноїди – сполуки фенольної природи, які індукують експресію нод

генів, що безпосередньо задіяні у розвитку симбіотичних взаємовідносин між бобовими рослинами та бульбочковими бактеріями [24].

Відмінність у дії ексудатів коренів і насіння сої на формування і функціонування симбіотичної азотфіксувальної системи соя – *V. japonicum* 6346 може бути пов'язана з кількісним і якісним складом ексудатів, адже літературні дані вказують на різницю у вмісті низки важливих для розвитку симбіотичних взаємовідносин біологічно активних речовин у ексудатах, одержаних з насіння і коренів бобових рослин [30, 31].

Експериментальні дані показали, що ексудат насіння сої при попередньому інкубуванні з ним бульбочкових бактерій *V. japonicum* 6346 сповільнював розвиток сої, інокульованих досліджуваними ризобіями, про що свідчить маса надземної частини рослин та маса коренів (рис. 3.14 і 3.15). При цьому, зменшення вегетативної маси рослини-хазяїна за дії ексудату насіння сої було відзначено протягом всього часу проведення експерименту, а саме у фази примордіальних (недостовірне) та двох трійчастих листків (достовірне).

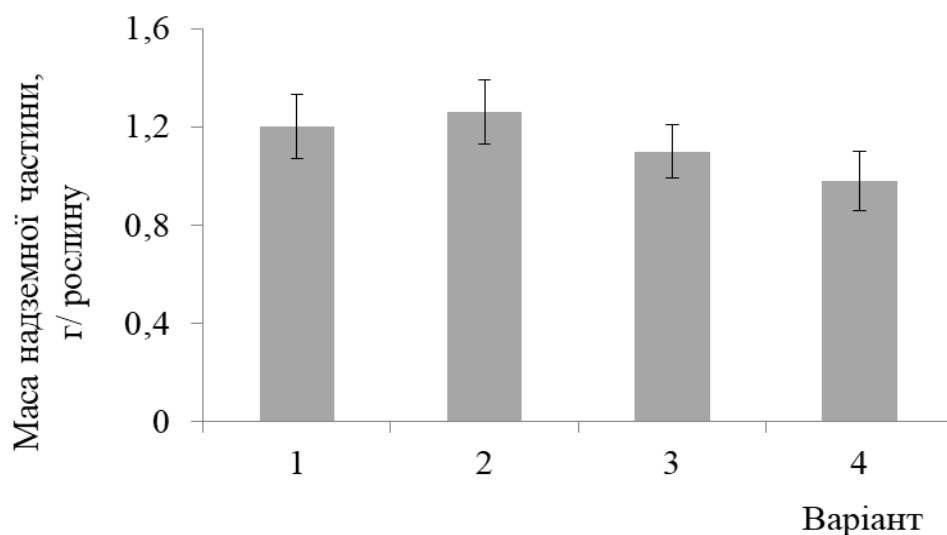


Рисунок 3.14 – Вплив насінневого і кореневого ексудатів сої на масу надземної частини рослин сої, що сформували симбіоз з *V. japonicum* 6346 у фази примордіальних листків

Ексудат коренів сої при внесенні його в суспензію бульбочкових бактерій, які використовували для інокуляції різною мірою покращував ріст і розвиток сої (рис. 3.14 і 3.15). У фазу примордіальних листків спостерігалась тенденція до збільшення ваги надземної частини рослин за дії кореневого ексудату, у фазу ж двох трійчастих листків різниця між вегетативними масами контрольних рослин і рослин, інокульованих попередньо інкубованими з ексудатом ризобіями була достовірною. Сумісне застосування ексудатів насіння і коренів сої не мало суттєвого впливу на формування маси надземної частини та маси коренів сої протягом всього періоду спостереження (рис. 3.14 і 3.15).

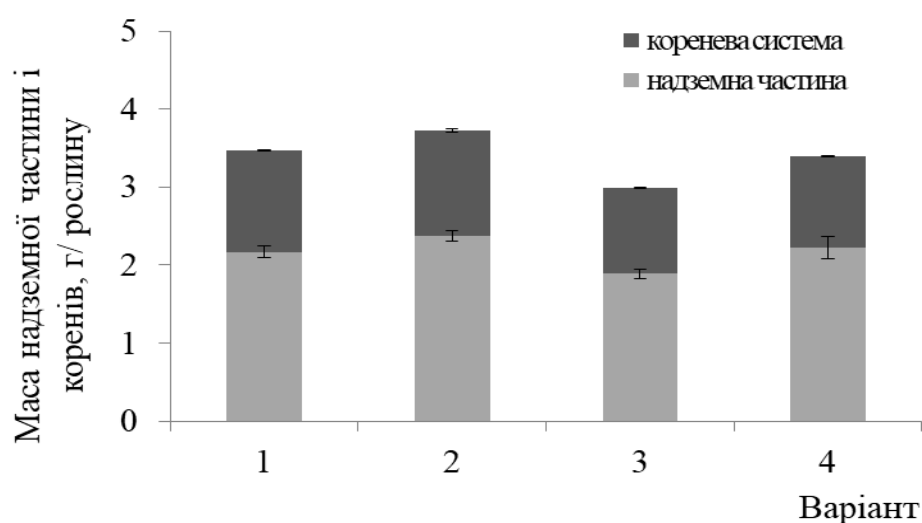


Рисунок 3.15 – Формування вегетативної маси сої, інокульованої бульбочковими бактеріями з додаванням ексудатів насіння і коренів сої (фаза двох трійчастих листків)

3.5 Формування соєво-ризобіального симбіозу під впливом ексудатів насіння сої, отриманих за різних умов його проростання

Експериментальні дані показали (рис. 3.16), що ексудат насіння сої, отриманий при додаванні стерильної водопровідної води (ВВ) у разі попереднього інкубування з ним бактерій *B. japonicum* 634б пригнічував процеси бульбочкоутворення на коренях сої у фазу бутонізації порівняно до варіанту, де

мікроорганізми не обробляли ексудатами. Водночас ризобії сої у поєднанні з ексудатом насіння сої, який було отримано за використання стерильної дистильованої води (ДВ), мали вищу нодулюючу активність, хоча відмінність у кількості сформованих бульбочок на коренях рослини-хазяїна між цим варіантом і контролем була недостовірною (рис. 3.16).

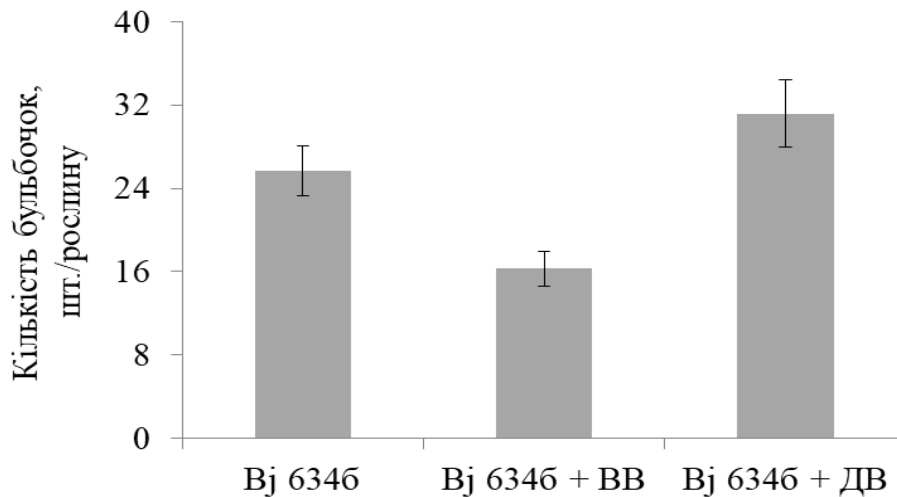


Рисунок 3.16 – Активність бульбочкоутворення *V. japonicum* 634б у симбіозі із рослинами сої у фазу бутонізації за дії ексудатів насіння сої. На рисунках 3.16 – 3.18: Vj 634б – інокуляція *V. japonicum* 634б, Vj 634б + ВВ – інокуляція *V. japonicum* 634б з додаванням ексудату насіння, отриманого при використанні стерильної водопровідної води, Vj 634б+ДВ – інокуляція *V. japonicum* 634б з додаванням ексудату насіння, отриманого при використанні стерильної дистильованої води

Можна припустити, що ексудати насіння сої, отримані нами при використанні стерильної водопровідної та дистильованої води різнилися щодо складу біологічно активних сполук, тому характер їх дії на розвиток соєво-ризобіальної симбіотичної системи був різноспрямованим (рис. 3.16).

Схожим, тобто, через зміну структури важливих для розвитку рослинно-мікробного симбіозу молекул, може бути вплив ексудатів на здатність корневих бульбочок фіксувати атмосферний азот. Ймовірно використання ексудатів

насіння сої, отриманих за різних умов його проростання, в наших експериментах призведе до модифікації полісахаридів бульбочкових бактерій сої і, таким чином, вплине на активність азотфіксації симбіотичної системи соя-*V.japonicum* 634б. Однак, експериментальні дані показали, що насіннєві виділення сої, отримані за допомогою стерильної водопровідної і дистильованої води, суттєво не впливали на азотфіксувальну активність соєво-ризобіального симбіозу (рис. 3.17). У випадку використання дистильованої води під час проростання насіння сої з наступною інкубацією ексудату з ризобіями спостерігалась тенденція до збільшення рівня азотфіксації корневими бульбочками (рис. 3.17). Отже, в ході проведення наших досліджень не відбувалось модифікації метаболічних процесів у клітинах ризобій, які призвели б до змін у активності азотфіксації (рис. 3.17).

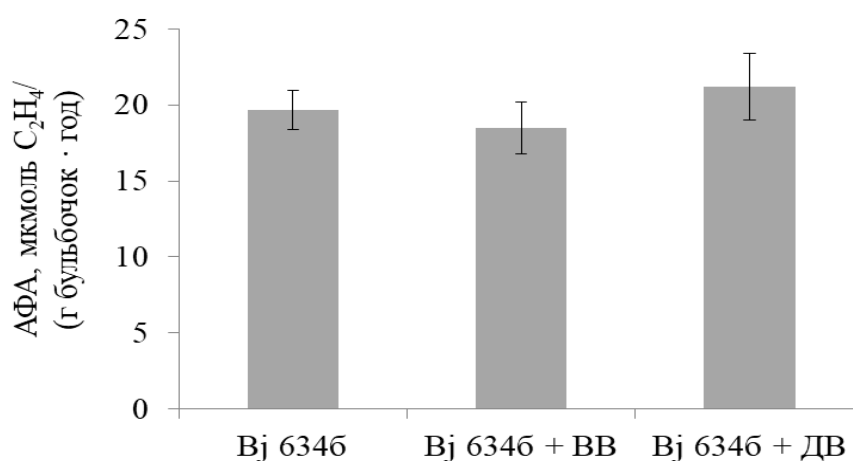


Рисунок 3.17 – Питома азотфіксувальна активність (АФА) соєво-ризобіального симбіозу у фазу бутонізації за інокуляції рослин ризобіями *V. japonicum* 634б інкубованими з ексудатами насіння, отриманими за різних умов його проростання

Як було показано, ексудат насіння сої, отриманий при використанні водопровідної води, у разі попередньої інкубації з ним бульбочкових бактерій *V.japonicum* 634б сповільнював розвиток рослин сої у фазу бутонізації, про що свідчить маса надземної частини рослин (рис. 3.18). Навпаки, ексудат насіння сої, отриманий за допомогою стерильної дистильованої води, при внесенні його

в суспензію бульбочкових бактерій, які використовували для інокуляції, сприяв росту і розвитку макросимбіонта (рис. 3.18). Відмінність у дії досліджуваних ексудатів насіння сої на формування вегетативної маси рослини-хазяїна може бути пов'язана з кількісним і якісним складом ексудатів, який, ймовірно, значною мірою залежить від умов набухання і проростання насіння.

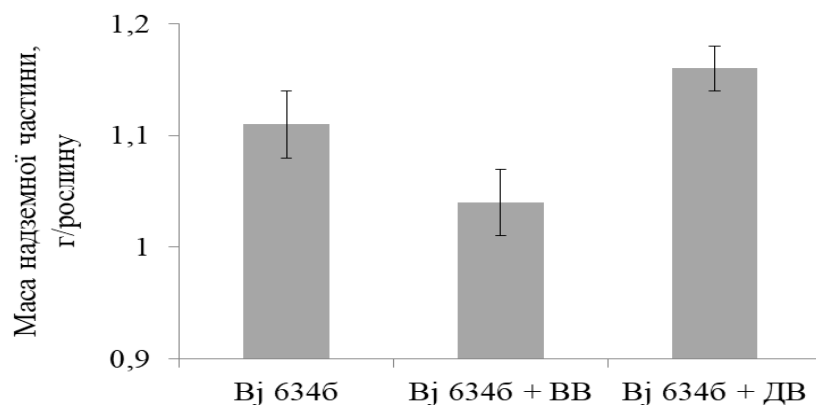


Рисунок 3.18 – Вплив насінневих виділень сої, утворених за різних умов проростання, на масу надземної частини рослин сої, що сформували симбіоз із *V.japonicum* 6346, у фазу бутонізації

3.6. Вплив цукрів, які є вуглеводними детермінантами лектину насіння сої та складають основну частку від суми вуглеводів, що входять до складу екзополісахаридів бульбочковиз бактерій сої, на ростову активність ризобій в умовах чистої культури

Встановлено, що при культивуванні ризобій протягом трьох тижнів спостерігалось накопичення бактеріальної біомаси, про що свідчить ущільнення оптичної густини суспензії в усіх варіантах дослідження та підвищення чисельності КУО бактерій (табл. 3.1). При цьому, за показником оптичної густини бактеріальної суспензії не виявлено суттєвих відмінностей у рості культури ризобій за наявності в середовищі росту мікромолярних концентрацій гексоз й

аміноцукрів, але встановлено динаміку ущільнення оптичної густини бактеріальної суспензії протягом досліджуваного періоду росту бактерій.

Суттєву активуючу дію на кількість КУО бактерій спричинив N-ацетил-D-галактозаміну (GalNAc): кількість бактеріальних клітин у шести- та тринадцятидобової культур (експоненціальна фаза росту) підвищилася в 4,1 та 7,2 рази відповідно відносно до контрольних значень. У меншій мірі (в 1,2 і 4,3 рази відповідно) активуючу дію мала і галактоза. Вуглеводи групи глюкози, здебільшого, не мали позитивного впливу на розвиток культури ризобій сої: кількість КУО у варіанті із додаванням глюкози знаходились у межах контролю, тоді як глюкозамін на початковому етапі культивування (шестидобова культура) навіть пригнічував розмноження бактерій і лише у період експоненціальної фази росту (тринадцятидобова культура) відзначено його активуючу дію (в 2,6 рази), яка, однак, була значно слабкішою, ніж у галактозовмісних вуглеводів.

За дії GalNAc у середовищі культивування ризобій сої шести- та тринадцятидобові культури бактерій характеризувалися найменшим терміном генерації (34 та 30 год відповідно порівняно до 65 і 42 год в контролі) та найвищими показниками швидкості розмноження клітин, які перевищували контрольні в 1,9 і 1,4 рази відповідно (табл. 3.1). При використанні галактози час генерації культури на 11% був коротший за контроль і на стільки ж більшою була швидкість розмноження бактерій у даному варіанті. За дії глюкозовмісних вуглеводів досліджувані показники знаходились у межах контрольних значень (глюкоза) або перевищували контроль: майже вдвічі (в 1,8 рази – час генерації) та в 1,2 рази (швидкість розмноження бактерій) для варіанту з N-ацетил-D-глюкозаміном (GlcNAc). У двадцятидобової культури (початок фази стаціонарного росту) як час генерації, так і швидкість розмноження бактерій у дослідних варіантах знаходились у межах контролю. При цьому, якщо за дії моноцукрів гексоз глюкози і галактози значення досліджуваних показників дорівнювали контрольним, то при застосуванні аміноцукрів спостерігали тенденцію до припинення активного розмноження бактерій, оскільки кількість

Таблиця 3.1 – Вплив моноцукрів гексоз (глюкози, галактози) й аміноцукрів (N-ацетил-D-глюкозаміну, N-ацетил-D-галактозаміну) у середовищі росту культури *B. japonicum* 634б на ростові показники бактерій

Варіант	Оптична густина, λ 560		Кількість КУО, кл / мл		Час генерації, г			Кількість поколінь на добу, N	
Посівна культура	1,739		$(67,2 \pm 4,0) \times 10^7$		-			-	
Вихідна культура (1:10)	0,174		$(67,2 \pm 4,0) \times 10^6$		-			-	
Варіант	λ 560	%	КУО, кл / мл	%	год	діб	%	шт.	%
<i>6-добова культура</i>									
Контроль (вода)	1,077 \pm 0,007	100	$(31,2 \pm 2,4) \times 10^7$	100	65,45	2,7	100	0,37	100
Glc	0,864 \pm 0,024	80	$(32,3 \pm 1,3) \times 10^7$	104	63,53	2,6	97	0,38	103
GlcNAc	1,034 \pm 0,094	96	$(16,0 \pm 1,2) \times 10^7$ [^]	51	116,76	4,9	178	0,21	57
Gal	1,082 \pm 0,027	101	$(37,2 \pm 1,6) \times 10^7$ [*]	119	58,38	2,4	89	0,41	111
GalNAc	1,050 \pm 0,025	98	$(127,0 \pm 21,2) \times 10^7$ [*]	407	34,02	1,4	52	0,71	192
<i>13-добова культура</i>									
Контроль (вода)	1,677 \pm 0,076	100	$(11,0 \pm 3,9) \times 10^9$	100	42,35	1,8	100	0,57	100
Glc	1,704 \pm 0,302	102	$(14,4 \pm 2,5) \times 10^9$	131	40,17	1,7	95	0,60	105
GlcNAc	1,942 \pm 0,057 [*]	116	$(27,6 \pm 7,7) \times 10^9$ [*]	251	35,86	1,5	85	0,67	118
Gal	1,646 \pm 0,125	98	$(47,0 \pm 3,0) \times 10^9$ [*]	427	32,96	1,4	78	0,73	128
GalNAc	1,571 \pm 0,094	94	$(78,9 \pm 1,1) \times 10^9$ [*]	717	30,49	1,3	72	0,79	139

продовження таблиці 3.1

20-добова культура

Контроль (вода)	2,683±0,126	100	$(22,0±6,1) \times 10^9$	100	57,37	2,4	100	0,42	100
Glc	2,709±0,023	101	$(21,5±5,6) \times 10^9$	98	57,60	2,4	100	0,42	100
GlcNAc	3,006±0,034*	112	$(11,5±3,5) \times 10^9$	52	64,57	2,7	113	0,37	88
Gal	2,694±0,160	100	$(21,5±2,5) \times 10^9$	98	57,60	2,4	100	0,42	100
GalNAc	2,778±0,111	104	$(16,5±6,6) \times 10^9$	75	60,25	2,5	105	0,40	95

Примітка. λ – довжина хвилі, КУО – колонієутворюючі одиниці бактерій; % - % до контролю; «-» - не визначали; * - позитивно достовірно, ^ - негативно достовірно ($P \leq 0,05$) відносно контролю

поколінь мікроорганізмів на добу знижувалася на 5 і 12 % порівняно до контрольного варіанту.

Із літератури відомо, що вуглевод, специфічний бактеріальному аглютиніну, при додаванні в середовище культивування мікроорганізмів активував розмноження, змінював метаболізм і функціональну активність бактеріальних клітин. Так, додавання лактози до культури бульбочкових бактерій сої, що синтезують лактозоспецифічний лектин, привело до 10-кратного збільшення чисельності бактеріальних клітин та їхньої здатності адсорбуватися на коренях рослин [169]. Внесення глюкози до середовища росту азоспірили максимально підвищувало число життєздатних клітин на всіх етапах росту культури і змінювало їх метаболізм: інтенсивно накопичувався полігідроксибутират із високим ступенем аморфності (61 % від маси сухих клітин), який характеризується більш високою швидкістю ферментативного гідролізу і у стресових умовах використовується бактеріями в першу чергу [49].

Згідно наших результатів, галактозовмісні вуглеводи (галактоза і галактозамін), з яких саме GalNAc проявляв максимальну стимулюючу дію на ризобіальні клітини в умовах чистої культури в період активного росту і розмноження бактерій (експоненціальна фаза росту) можна припустити наявність у штаму *B. japonicum* 634б бактеріальних аглютининів, специфічних до вуглеводів групи галактози, причому, у більшій мірі до GalNAc.

Досить вірогідно, що за рахунок лектин-вуглеводного зв'язування, яке є тригером біоінформаційного лектин-вуглеводного сигналінгу, і реалізується регуляторна функція галактозовмісних вуглеводів (галактозаміну та галактози) щодо розвитку ризобій сої в умовах чистої культури. Більше того, лектин сої (рослини-хазяїна бульбочкових бактерій сої) є також галактозоспецифічним і проявляє спорідненість до вуглеводних сполук, що містять галактозу і GalNAc [46].

Таким чином, за дії вуглеводів (глюкози, галактози, N-ацетил-D-глюкозаміну, N-ацетил-D-галактозаміну) у мікромольній концентрації, як сигнальних молекул у середовищі росту бульбочкових бактерій сої змінювався

ріст і розвиток мікроорганізмів в умовах чистої культури. Позитивним сигналінгом відносно ризобій сої характеризувались вуглеводи групи галактози. Максимальний ефект відмічено у N-ацетил-D-галактозаміну, що підтверджується результатами оцінки росту культури за показниками кількості життєздатних клітин мікроорганізмів, часом генерації культури та швидкістю її розмноження.

4 З'ЯСУВАТИ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ СОЇ ТА ЛЮЦЕРНИ, ІНОКУЛЬОВАНИХ РІЗНИМИ ЗА АКТИВНІСТЮ ШТАМАМИ РИЗОБІЙ, НА НЕДОСТАТНЄ ВОДОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

4.1. Вплив недостатнього водозабезпечення на формування та функціонування симбіотичної системи сої з бульбочковими бактеріями

Встановлено, що тривала 12-добова посуха суттєво не позначилась на кількості сформованих бульбочок на коренях рослин сої, інокульованої активним вірулентним штамом *B. japonicum* 646 (табл. 4.1). Однак, їх маса знижувалась на 36,7 % за помірної дії посухи (40 % ПВ) у фазу трьох справжніх листків та на 45,3 % за жорсткої дії посухи (30 % ПВ) у фазу бутонізації. Після відновлення поливу рослин, у цій симбіотичній системі, зафіксовано зниження кількості та маси бульбочок на коренях відповідно на 37,7 і 52,7 %, у порівнянні із цими показниками у рослин із оптимальним водозабезпеченням, що було обумовлено активним наростанням кількості та маси бульбочок на коренях рослин, які зростали за умов оптимального водозабезпечення.

У сої, інокульованої активним вірулентним Tn5-мутантом *B. japonicum* B1-20, за помірної дії посухи 40 % ПВ показники кількості та маси кореневих бульбочок знижувались на 22,2 та 49,1 %. За посилення дії зневоднення до 30 % ПВ, у цій симбіотичній системі, кількість кореневих бульбочок була на рівні рослин із оптимальним поливом, тоді як їх маса зменшувалась на 54,9 %. За відновленого поливу, зафіксовано зростання кількості сформованих бульбочок на коренях рослин на 32,8 %, однак їх маса залишалась на 46,7 % нижчою, у порівнянні із рослинами, що зростали за умов оптимальної вологи.

Найбільше пригнічення процесів нодуляції за впливу посухи, спостерігали у рослин сої в симбіозі із малоактивним вірулентним Tn5-мутантом 107. Це проявлялось у суттєвому зменшенні кількості та маси бульбочок на коренях

Таблиця 4.1 – Вплив посухи на нодуляційну здатність корневих бульбочок сої, інокульованої контрастними за симбіотичними властивостями штамами і Tn5-мутантами *B. japonicum* (середнє за три роки 2017–2019)

Варіант	Фаза онтогенезу					
	трьох справжніх листків		бутонізації		масового цвітіння	
	кількість, шт./рослину	маса, г/рослину	кількість, шт./рослину	маса, г/рослину	кількість, шт./рослину	маса, г/рослину
Оптимальне водозабезпечення (контроль – 60 % ПВ)						
Штам 646	26,9 ± 1,6	0,272 ± 0,017	29,3 ± 1,8	0,331 ± 0,027	53,8 ± 3,2	0,792 ± 0,047
Tn5-мутант В1-20	26,9 ± 1,6	0,293 ± 0,015	26,4 ± 1,5	0,351 ± 0,022	35,7 ± 2,2	0,561 ± 0,033
Tn5-мутант 107	4,5 ± 0,2	0,105 ± 0,005	4,1 ± 0,2	0,162 ± 0,007	6,7 ± 0,3	0,459 ± 0,017
Штам 604к	43,4 ± 2,6	0,121 ± 0,007	76,5 ± 4,7	0,445 ± 0,025	133,2 ± 8,1	0,472 ± 0,029
	Посуха – 40 % ПВ		Посуха – 30 % ПВ		Відновлення поливу – 60 % ПВ	
Штам 646	26,7 ± 1,6	0,172 ± 0,009	27,1 ± 1,6	0,181 ± 0,009	33,5 ± 2,0	0,374 ± 0,024
Tn5-мутант В1-20	20,9 ± 1,3	0,149 ± 0,007	29,0 ± 1,7	0,158 ± 0,008	47,4 ± 2,9	0,299 ± 0,021
Tn5-мутант 107	1,0 ± 0,06	0,0023 ± 0,0001	2,0 ± 0,1	0,016 ± 0,0008	2,0 ± 0,1	0,019 ± 0,001
Штам 604к	42,3 ± 2,5	0,039 ± 0,004	44,2 ± 2,7	0,065 ± 0,004	66,4 ± 4,0	0,207 ± 0,012

рослин за дії зневоднення та слабкому відновленні цих показників до оптимального рівня у післястресовий період. Так, за помірного дефіциту вологи, кількість бульбочок на коренях сої знижувалась на 77,8 %, а їх маса на 97,8 %, тоді як за жорсткої посухи – відповідно на 44,1 та 90,1 %.

Після відновлення поливу, кількість та маса кореневих бульбочок залишалась нижчою відповідно на 65,5 та 95,5 %, у порівнянні із цими показниками у рослин, які зростали за оптимального водозабезпечення.

Виявлено негативний вплив посухи на процеси бульбочкоутворення у неефективній симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та неактивного штаму *V. japonicum* 604к. Так, за помірного зневоднення не спостерігали зниження кількості бульбочок на коренях рослин, однак їх маса зменшувалась на 67,7 %, тоді як за посиленого дефіциту вологи значення зазначених показників знижувались на 42,1 та 85,3 % відповідно. У післястресовий період, у цій симбіотичній системі не зафіксовано відновлення процесів нодуляції до оптимального рівня, оскільки кількість бульбочок та їх маса були майже удвічі меншими за відповідні показники у рослин, які зростали за оптимального поливу.

Встановлено, що помірна дія посухи (40 % ПВ) у фазу трьох справжніх листків призводила до зниження загальної АФА кореневих бульбочок сої у симбіозах із активними вірулентними *V. japonicum* штамом 646 на 25,4 % та Tn5-мутантом В1-20 на 30,8 % (рис. 4.1). За посиленого впливу дефіциту вологи (30 % ПВ) у фазу бутонізації, загальна АФА кореневих бульбочок продовжувала знижуватись у цих симбіотичних системах і за інокуляції ризобіями штаму 646 і Tn5-мутантом В1-20 становила на 71,3 і 72,7 % нижче контрольного рівня – рослин, які зростали за оптимального поливу. У післястресовий період цей показник частково відновлювався до рівня контролю і був нижче на 58,3 і 53,9 % у кореневих бульбочках сої за інокуляції штамом 646 і Tn5-мутантом В1-20 відповідно.

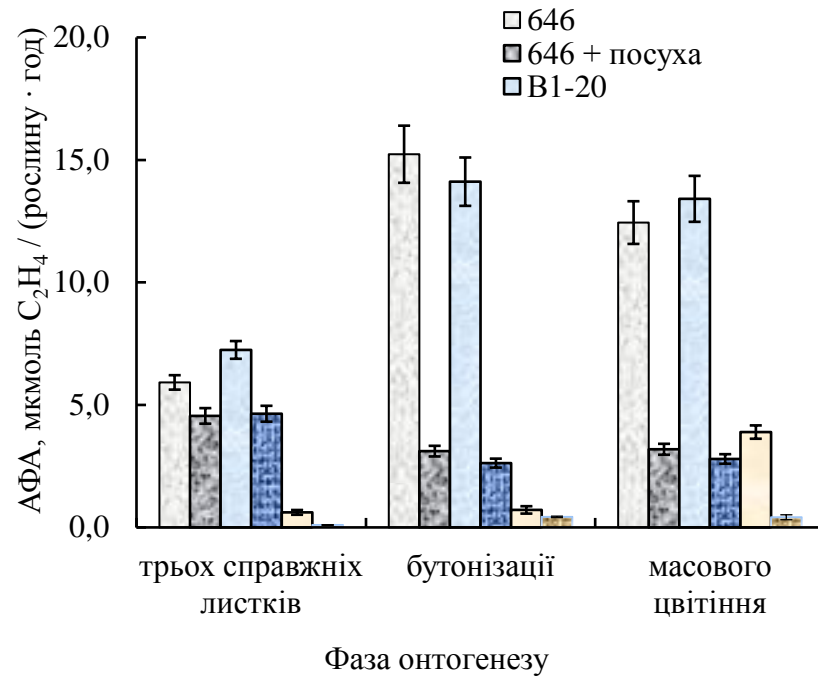


Рисунок 4.1 – Вплив посухи на загальну азотфіксувальну активність (АФА) корневих бульбочок сої, інокульованої контрастними за симбіотичними властивостями штамми і Tn5-мутантами *B. japonicum* (середнє за три роки 2017–2019)

За помірної дії посухи, питома АФА корневих бульбочок підвищувалась на 10,7 і 35,8 % відповідно в ефективних симбіотичних системах, утворених за участю штаму 646 і Tn5-мутанту B1-20 (рис. 4.2). Однак, за жорстких умов зневоднення цей показник знижувався відповідно на 23,5 і 27,5 % у корневих бульбочках сої за інокуляції штамом *B. japonicum* 646 і Tn5-мутантом B1-20. Після відновлення поливу, питома АФА корневих бульбочок сої підвищувалась відповідно за інокуляції ризобіями на 16,1 і 17,7 %, у порівнянні із контрольними рослинами, що зростали за оптимального поливу.

У малоефективній симбіотичній системі, сформованій за участю сої та малоактивного вірулентного Tn5-мутанта *B. japonicum* 107, показник загальної АФА у корневих бульбочках знижувався до 90 % впродовж дії посухи та залишався на такому ж рівні відносно контрольних рослин з оптимальним поливом у післястресовий період. При цьому питома АФА у цій симбіотичній

системі знижувалась на 61,6 % за тривалої дії посухи і теж не відновлювалась до контрольного рівня після дії стресу.

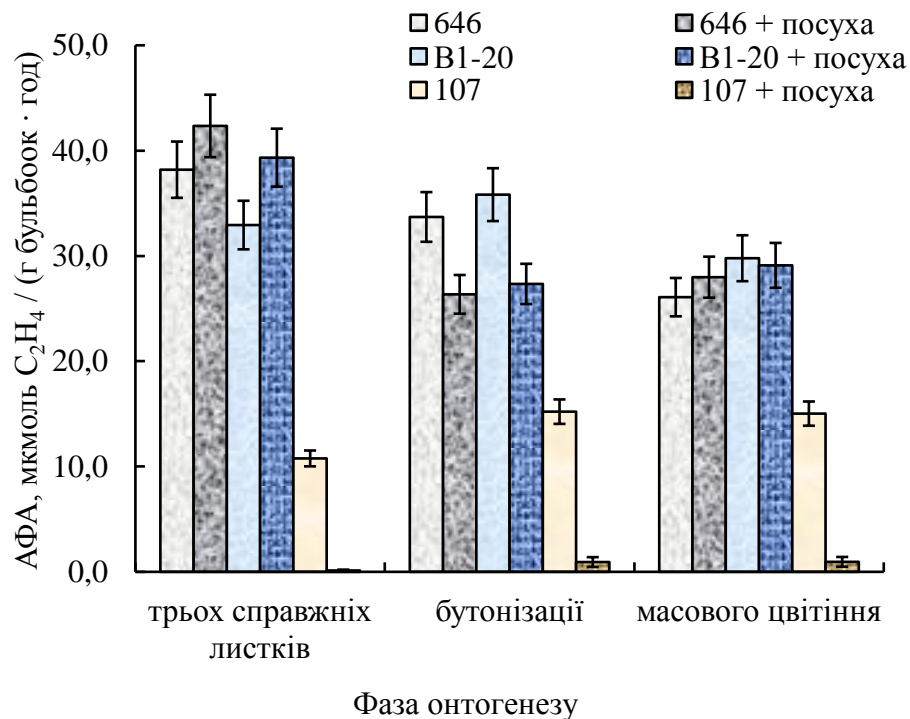


Рисунок 4.2 – Вплив посухи на питому азотфіксувальну активність (АФА) корневих бульбочок сої, інокульованої контрастними за симбіотичними властивостями штамми і Tn5-мутантами *B. japonicum* (середнє за три роки 2017–2019)

4.2 Ефективність інокуляції люцерни штамми *Sinorhizobium meliloti* за різного водозабезпечення

У результаті проведених досліджень відзначено, що штамми *S. meliloti* 441, 448a та СН по-різному впливали на формування симбіотичного апарату з люцерною (табл. 4.2). Так, на початку стеблуння за оптимального водозабезпечення найвищу нодуляційну активність проявив штам СН (2,5 бульбочки на рослину), при цьому відсоток нодульованих рослин був нижчим,

ніж на фоні інокуляції штамом 448а (64 % проти 91 %). Але останній, єдиний серед досліджуваних штамів, забезпечив у цей період формування гроноподібних бульбочок (рис. 4.3). Найнижчий відсоток нодульованих рослин – 58 % – відзначено на фоні інокуляції люцерни штамом 441.

За недостатнього водозабезпечення у цей період невеликі бульбочки (1–2 штуки) можна було побачити лише на окремих рослинах. Надалі, в період стеблуння, відсоток нодульованих рослин і кількість бульбочок на рослині за оптимального забезпечення залишалися найбільшими на фоні інокуляції штамом 448а, а найменшими – за використання штаму 441. При цьому з'явилися гроноподібні бульбочки на коренях люцерни, інокульованої штамом СН.

Таблиця 4.2 – Формування бульбочок на коренях люцерни за різного водозабезпечення на фоні інокуляції *S. meliloti*

Варіант	Фаза розвитку рослин		
	початку стеблуння	стеблуння	бутонізації
60 % ПВ			
<i>S. meliloti</i> 441	2,08/0 (58 %)*	2,6/0 (71%)	10/21(100 %)
<i>S. meliloti</i> 448а	1,8/5 (91 %)	6,1/22 (93 %)	15/27 (100 %)
<i>S. meliloti</i> СН	2,5/0 (64 %)	3,5/17 (82 %)	14/23 (100 %)
40 % ПВ			
<i>S. meliloti</i> 441	1-2 бульбочки на окремих рослинах	3/0 (36 %)	6/37 (82 %)
<i>S. meliloti</i> 448а	- -	2/0 (36 %)	5/36 (89 %)
<i>S. meliloti</i> СН	- -	1,5/0 (46 %)	6/25 (71 %)

Примітка. * Середня кількість бульбочок на рослину/з них грон (відсоток нодульованих рослин)

В умовах недостатнього водозабезпечення під час стеблуння найвища кількість нодульованих рослин формувалась за інокуляції штамом СН. Хоча кількість бульбочок на рослину при цьому залишалася найменшою.

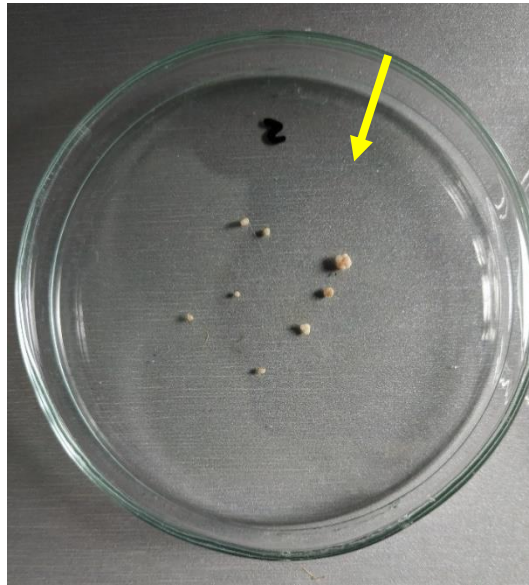


Рисунок 4.3 – Гроноподібні бульбочки, сформовані штамом *S. meliloti* 448a, на початку стеблуння за 60 % ПВ

Під час бутонізації за 60 % ПВ бульбочки утворились на всіх рослинах, на фоні інокуляції штамми СН та 448a – по 14 і 15 штук на рослину. У варіантах дії недостатнього водозабезпечення максимальна кількість нодульованих рослин (89 %) виявлена на фоні інокуляції штамом 448a, дещо менша (82 %) – штамом СН, 71 % – штамом 441. За кількістю сформованих бульбочок на цей період рослини різних варіантів суттєво не відрізнялись між собою, але бактерії штамів 441 та 448a сприяли формуванню більшої кількості гроноподібних бульбочок.

Таким чином, за оптимального водозабезпечення найефективнішим щодо формування бульбочок виявився штам 448a, тоді як в умовах недостатнього водозабезпечення бактерії штаму СН активніше колонізували рослини, порівняно до штамів 441 та 448a, хоч і утворювали меншу кількість бульбочок на рослині. На фоні поновлення поливу нодуляційна активність штамів 441 та

448а посилювалася, внаслідок чого вони випереджали штам СН за кількістю нодульованих рослин та відсотком гроноподібних бульбочок.

Дослідження активності відновлення молекулярного азоту симбіотичними системами люцерни, створеними за участю різних штамів синоризобій за оптимального та недостатнього водозабезпечення виявило (табл. 4.3), що на 23 добу після посіву (початок стеблуння) найбільш ефективний симбіоз із люцерною було утворено бульбочковими бактеріями штаму СН. При цьому за

Таблиця 4.3 – Азотфіксувальна активність (ммоль C_2H_4 /(год × рослину)) люцерни, інокульованої різними штамми *S. meliloti*

Варіант	Фаза розвитку рослин		
	початку стеблуння	стеблуння	бутонізації
60 % ПВ			
<i>S. meliloti</i> 441	7,66±0,66	15,24±0,12	261,99±23,62
<i>S. meliloti</i> 448а	8,78±0,78	103,60±13,2	1544,87±121,79
<i>S. meliloti</i> СН	20,19±1,46	45,68±4,21	1500,91±89,26
40 % ПВ			
<i>S. meliloti</i> 441	0	3,40±0,37	157,15±17,31
<i>S. meliloti</i> 448а	0	8,03±0,95	335,34±34,01
<i>S. meliloti</i> СН	3,33±0,20	8,08±0,87	298,95±19,75

оптимального водозабезпечення азотфіксувальна активність у перерахунку на рослину у варіанті з даним штамом перевищувала показники варіантів зі штамми 441 та 448а на 163,5 та 129,9 %, відповідно. АФА бульбочок, утворених *S. meliloti* 441 та 448а, суттєво не відрізнялися між собою. Проте у подальшому

інтенсивність засвоєння молекулярного азоту рослинами у симбіозі з синоризобіями виявилася найбільшою на фоні інокуляції штамом 448а. Даний показник перевищував такий у варіантах із *S. meliloti* 441 у 6,8–9,8 рази. У порівнянні ж зі штамом СН лише в період стеблуння штам 448 був суттєво ефективнішим і перевищував його за АФА у 2,3 рази. В період бутонізації симбіотичні системи, створені за участю цих двох штамів, суттєво не відрізнялися між собою за даним показником, але перевищували варіант із використанням штаму 441 майже вшестеро.

У варіантах, де проростання й початковий розвиток люцерни відбувалися за недостатнього водозабезпечення, на фоні інокуляції штамом СН відзначено найбільш раннє формування та функціонування симбіотичних систем люцерни, ще в період першого відбору. В цей час у рослин двох інших варіантів бульбочки на коренях не візуалізувались, не виявлено, відповідно, й азотфіксації. У період стеблуння фіксація молекулярного азоту відбувалася симбіотичними системами, створеними за участю всіх досліджуваних штамів, при цьому даний показник суттєво не відрізнявся у варіантах інокуляції *S. meliloti* СН та 448а, але перевищував у 2,4 рази АФА бульбочок рослин на фоні інокуляції штамом 441. Під час бутонізації найвища азотфіксувальна активність виявлена у симбіотичних системах люцерна–*S. meliloti* 448а, при цьому вона достовірно перевищувала лише показники варіанту, де використовували штам *S. meliloti* 441, – у 2,1 рази. Інокуляція люцерни штамом СН забезпечила зростання азотфіксувальної активності у порівнянні з варіантом використання штаму 441 у 1,9 рази.

Водночас аналіз питомої азотфіксувальної активності у період бутонізації показав (рис. 4.4), що досліджувані штами за ефективністю можна розташувати в порядку зростання наступним чином: за 60 % ПВ – 441, 448а, СН, а за дії нестачі вологи – 448а, 441 та СН.

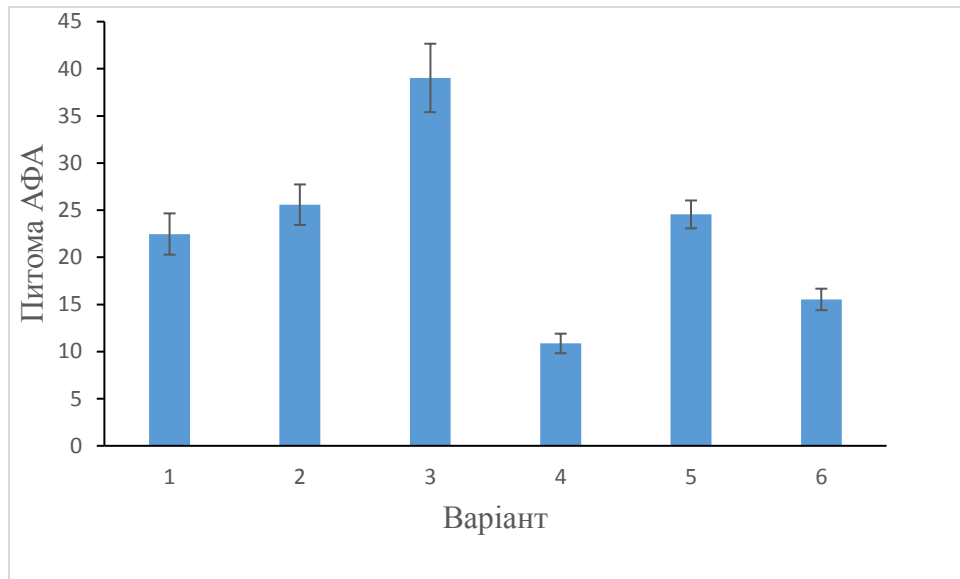


Рисунок 4.4 – Питома азотфіксувальна активність (питома АФА, ммоль C₂H₄/(год × мг бульбочок) симбіотичних систем люцерна– *S. meliloti* у період бутонізації за інокуляції різними штамми: 1 – 441, 60 % ПВ; 2 – 448а, 60 % ПВ; 3 – СН, 60 % ПВ; 4 – 441, 40 % ПВ; 5 – 448а, 40 % ПВ; 6 – СН, 40 % ПВ

Таким чином, на початковому етапі формування симбіозу (початок стеблуння) найбільш ефективним за загальною азотфіксувальною активністю (в перерахунку на рослину) за обох рівнів водозабезпечення виявився штам СН. У період стеблуння-бутонізації високі показники загальної азотфіксувальної активності забезпечили штамми 448 та СН, які суттєво не відрізнялись за даною характеристикою між собою. Водночас за показником питомої азотфіксувальної активності за 60 % ПВ штам СН суттєво випереджав інші, а в умовах попереднього впливу нестачі вологи найбільш ефективним виявився штам 448а.

У результаті спостереження за розвитком рослин та формуванням їх маси на фоні інокуляції різними штамми *S. meliloti* за оптимального та недостатнього водозабезпечення виявлено суттєвий вплив різних ризобій на проростання насіння за 40 % ПВ. Відзначено, що інокуляція люцерни *S. meliloti* СН сприяла появі більш ранніх і дружніх сходів (рис. 4.5). Проте рослини цього варіанту, так само як і рослини люцерни, інокульованої штамми 441 та 448а, дещо відставали у розвитку від тих, що проростали за оптимального водозабезпечення.

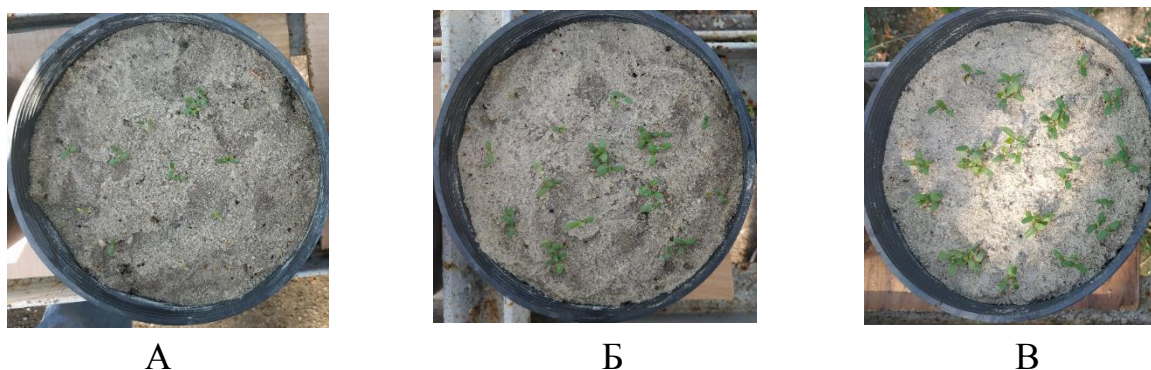


Рисунок 4.5 – Проростання насіння люцерни за 40 % ПВ на фоні інокуляції штамми *S. meliloti* 441 (А), 448а (Б), СН (В)

Дослідження впливу інокуляції люцерни різними штамми на показник надземної маси показало (табл. 4.4), що за оптимального водозабезпечення

Таблиця 4.4 – Надземна маса (мг/рослину) люцерни, інокульованої різними штамми *S. meliloti*, за різного водозабезпечення

Варіант	Фаза розвитку рослин		
	початку стеблуння	стеблуння	бутонізації
60 % ПВ			
<i>S. meliloti</i> 441	185,08±16,66	422,14±35,21	612,86±36,74
<i>S. meliloti</i> 448a	273,71±18,27	510,53±34,66	795,91±43,42
<i>S. meliloti</i> СН	197,43±14,55	476,12±31,75	789,05±40,18
40 % ПВ			
<i>S. meliloti</i> 441	50,18±3,54	233,64±13,96	551,11±35,20
<i>S. meliloti</i> 448a	74,72±3,49	240,92±18,83	557,67±23,34
<i>S. meliloti</i> СН	95,93±7,51	344,32±18,90	530,00±24,09

використання штаму 448а забезпечило на початку стеблуння суттєвий приріст надземної маси у порівнянні з варіантом інокуляції штамом 441 та СН – на 47,9 % та 38,6 %, відповідно. У подальшому, в період стеблуння-бутонізації, цей штам залишався найбільш ефективним, забезпечуючи найвищий приріст надземної маси люцерни, який був достовірним стосовно варіанту з інокуляцією штамом 441 – на 20,9–29,9 %, але в межах похибки стосовно варіанту інокуляції штамом СН (7,2 % у фазу стеблуння).

Недостатнє забезпечення вологою під час проростання насіння та в початковий період розвитку люцерни призвело до суттєвого відставання не лише в рості рослин (рис. 4.6, див. табл. 4.4), але й сповільнювало їх розвиток

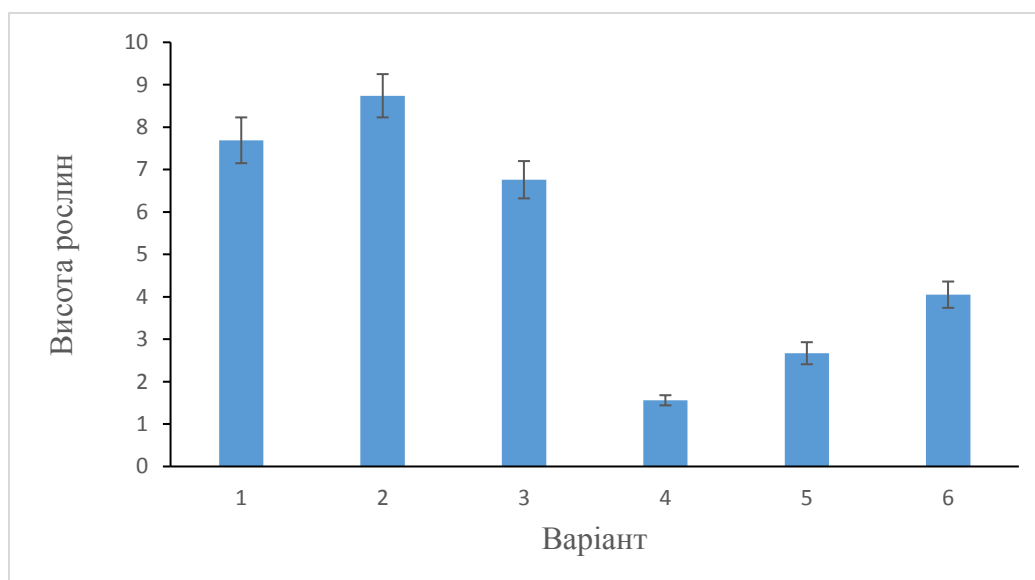


Рисунок 4.6 – Вплив інокуляції різними штамами ризобій на висоту рослин (см) люцерни на початку бутонізації: 1 – 441, 60 % ПВ; 2 – 448а, 60 % ПВ; 3 – СН, 60 % ПВ; 4 – 441, 40 % ПВ; 5 – 448а, 40 % ПВ; 6 – СН, 40 % ПВ

приблизно на 3–5 діб. Такий негативний вплив нестачі води дещо пом'якшувала інокуляція штамом СН. У результаті, під час першого відбору маса рослин люцерни, інокульованої штамом СН, перевищувала показники варіантів зі штамами 441 та 448 на 91,2 % та 28,4 %, відповідно. Найменша маса

рослин відзначена у варіанті інокуляції штамом 441. У період стеблуння даний показник зрівнявся у варіантах з інокуляцією штамми 441 та 448а, тоді як у варіанті інокуляції СН він залишався найбільшим і перевищував ці варіанти на 47,4 % та 42,9 %, відповідно. Під час бутонізації на фоні використання штаму СН рослини дещо відставали за наростанням надземної маси від рослин варіантів із інокуляцією штамми 441 та 448а, $-3,8\%$ та $5,0\%$, відповідно, але ця різниця була несуттєвою.

Відзначено, що інокуляція штамми 448а та СН сприяли формуванню потужної кореневої системи упродовж усього періоду досліджень (табл. 4.5), що

Таблиця 4.5 – Маса кореня (мг/рослину) люцерни, інокульованої різними штамми *S. meliloti*, за різного водозабезпечення

Варіант	Фаза розвитку рослин		
	початку стеблуння	стеблуння	бутонізації
60 % ПВ			
<i>S. meliloti</i> 441	57,60±5,77	223,16±21,13	622,11±54,42
<i>S. meliloti</i> 448а	119,89±11,44	346,67±30,79	808,64±56,72
<i>S. meliloti</i> СН	113,61±8,36	367,96±24,36	938,09±66,98
40 % ПВ			
<i>S. meliloti</i> 441	48,57±3,76	133,80±10,60	500,74±42,95
<i>S. meliloti</i> 448а	80,36±7,15	106,04±8,44	552,33±35,48
<i>S. meliloti</i> СН	61,22±5,21	200,00±19,05	508,93±43,06

суттєво перевищувала за масою показники варіанту, де використовували штам 441, – на 30,0–108,1 % та 50,79–97,23 %, відповідно. В умовах недостатнього водозабезпечення штам 448а та СН також стимулювали наростання маси коренів

– на 65,45 % та 26 % порівняно до штаму 441. Проте до фази бутонізації маса коренів у всіх рослинах, що зазнали дії нестачі вологи, суттєво не відрізнялась між собою, не залежно від використаного штаму-інокулянта.

Таким чином, виявлено, що за оптимального водозабезпечення найбільш ефективними щодо впливу на наростання надземної маси у період бутонізації є штами 448а та СН. У випадку проростання і початкового розвитку люцерни за нестачі вологи до фази стеблуння найкращий ріст надземної маси забезпечує інокуляція штамом СН, тоді як у фазу бутонізації – штамми 448а та 441.

5 ВИВЧИТИ АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У РОСЛИН СОЇ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ ШТАМАМИ РІЗНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ, ЗА СТРЕСОВИХ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ

У ефективному соєво-ризобіальному симбіозі, утвореному за участю сої та активного штаму ризобій 646, зафіксовано підвищення вмісту МДА у корневих бульбочках вже за помірнього впливу зневоднення на 42,4 %, тоді як за тривалого дефіциту вологи його рівень зростав на 95,1 % (рис. 5.1).

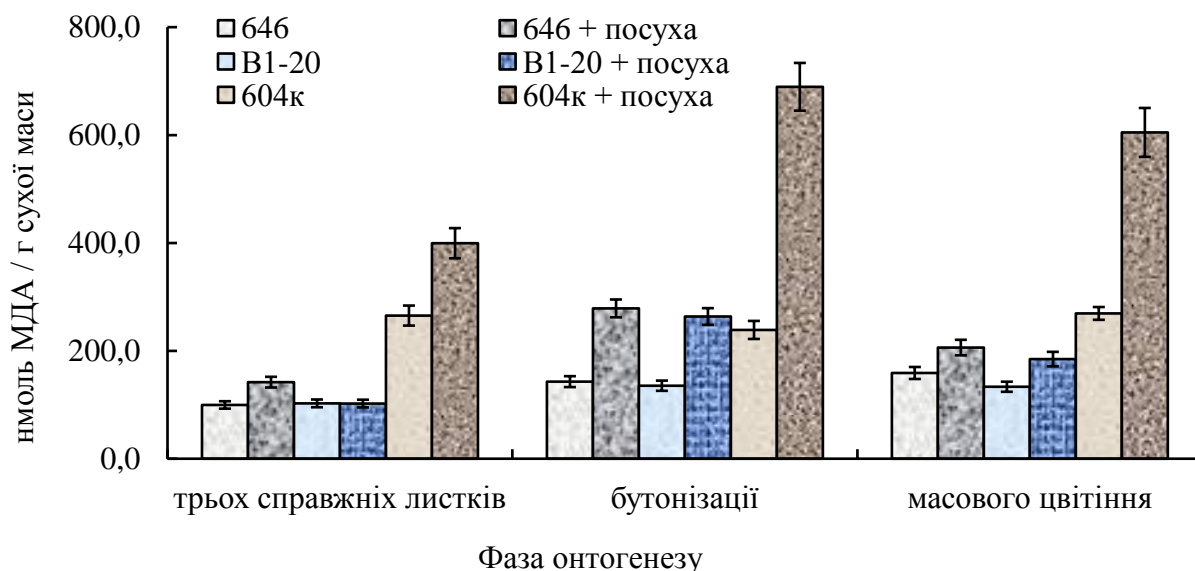


Рисунок 5.1 – Вплив посухи на вміст ТБК-активних продуктів у корневих бульбочках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* (за відсутності достатньої кількості досліджуваного матеріалу не представлено даних щодо варіанту з інокуляцією ризобіями Tn-5 мутанта 107)

У симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та активного Tn5-мутанту *B. japonicum* B1-20, не виявлено помітних змін у процесах ліпопероксидації у корневих бульбочках на початкових етапах зневоднення рослин. За посилення дефіциту вологи відбувалось підвищення вмісту МДА на 94,8 %, у порівнянні із контрольними рослинами, що зростали за оптимального

поливу. У післястресовий період спостерігали відновлення процесів ліпопероксидації до оптимального рівня (60 % ПВ) у цих симбіотичних системах, про що свідчить незначне підвищення вмісту МДА у бульбочках на 29,6 і 38,4% відповідно за інокуляції ризобіями штаму 646 та Tn5-мутанту В1-20.

Посуха індукувала підвищення вмісту МДА у корневих бульбочках сої, інокульованої неактивним штамом *V. japonicum* 604к за помірних умов зневоднення на 50,6%, а за жорсткого дефіциту вологи – на 188,8%. Після відновлення поливу рослин його вміст у бульбочках залишався на 124,6% вищим, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним поливом.

Аналізу впливу водного стресу на зміни вмісту МДА у корневих бульбочках сої за інокуляції малоактивним Tn5-мутантом 107 не проведено, оскільки відбувалось суттєве інгібування процесів бульбочкоутворення, що обмежувало збір достатньої кількості досліджуваного матеріалу.

У ефективних симбіотичних системах, утворених за участю активних штаму *V. japonicum* 646 і Tn5-мутанту В1-20, спостерігали незначне зростання інтенсивності процесів ПОЛ у коренях за умов посухи (рис. 5.2). Зокрема, вміст МДА у коренях сої, інокульованої штамом 646, підвищувався на 68,1 % за помірної дії зневоднення та на 53,7 % за посиленого впливу стресора.

У сої, інокульованої Tn5-мутантом В1-20, не спостерігали суттєвого зростання вмісту МДА у коренях за помірної дії посухи, тоді як за тривалого зневоднення його рівень підвищувався на 49,9 %. У післястресовий період процеси ліпопероксидації у коренях цих симбіотичних систем відновлювались до рівня контрольних рослин з оптимальним поливом.

Неефективна симбіотична система, утворена за участю рослин сої та неактивного штаму *V. japonicum* 604к, відрізнялась підвищеним вмістом МДА у коренях відповідно на 67,7 і 106,3 % впродовж дії посухи. Після відновлення поливу рослин його вміст у коренях був на 168,0 % вищим від контрольного – рослини з оптимальним водозабезпеченням.

На початкових етапах зневоднення відмічене зростання вмісту МДА на 81,7 % у коренях сої, інокульованої малоактивним Tn5-мутантом 107, який

залишався практично незмінним за подальшого впливу дефіциту вологи та не відновлювався до оптимального рівня (60 % ПВ) після дії стресу.

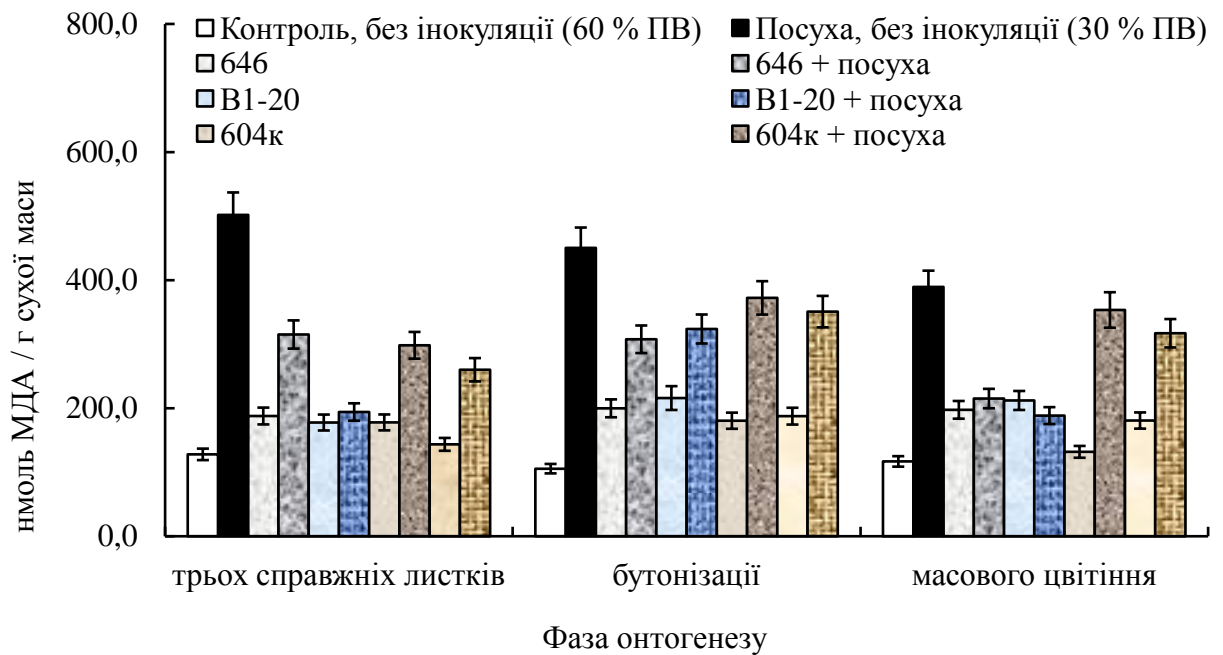


Рисунок 5.2 – Вплив посухи на вміст ТБК-активних продуктів у коренях сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *V. japonicum*

У ефективній симбіотичній системі, утвореній за участю ризобій штаму 646, вміст МДА у листках зростав на 60,9 і 50,5 % за помірного та тривалого дефіциту вологи (рис. 5.3). Тоді як у симбіотичній системі, утвореній за участю Tn5-мутанта B1-20, спостерігали інтенсифікацію процесів ПОЛ у листках на 43,9 % за тривалої дії посухи. У післястресовий період зафіксовано відновлення процесів ПОЛ до рівня контрольних рослин з оптимальним поливом у цих симбіотичних системах.

Помірна посуха у фазу трьох справжніх листків індукувала незначну інтенсифікацію процесів ПОЛ у листках сої за інокуляції малоактивним Tn5-мутантом 107 на 32,1 %, а за інокуляції неактивним штамом 604к на 51,9 %. За тривалого впливу зневоднення у фазу бутонізації виявлено суттєве підвищення інтенсивності процесів ліпопероксидації у нефективних симбіотичних системах.

За таких умов вміст МДА у листках зростав на 83,8 і 96,3 % відповідно за інокуляції Tn5-мутантом 107 і штамом 604к. Після відновлення поливу рослин його вміст у листках залишався на досить високому рівні та був на 68,3 % (Tn5-мутант 107) і 117,2 % (штам 604к) вище, у порівнянні із рослинами з оптимальним поливом.

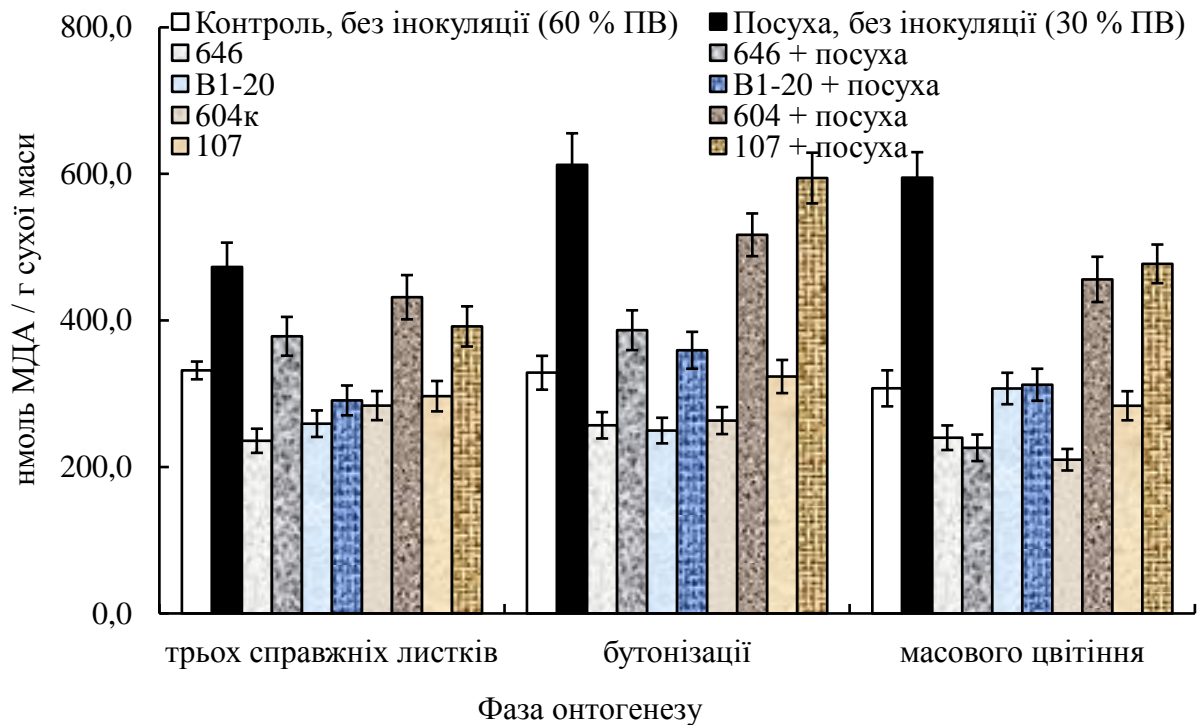


Рисунок 5.3 – Вплив посухи на вміст ТБК-активних продуктів у листках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum*

У симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та активного штаму ризобій 646, відбувалось підвищення вмісту пероксидів у корневих бульбочках за дії посухи у фазі трьох справжніх листків і бутонізації відповідно на 73,4 і 61,5 %, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним водозабезпеченням (рис.5.4). У симбіотичній системі, утвореній за участю активного Tn5-мутанту B1-20, зафіксовано несуттєве підвищення вмісту пероксидів у корневих бульбочках сої впродовж дії посухи, що становило на 26,9 і 16,2 % вище рівня контрольних рослин з оптимальним поливом відповідно.

У післястресовий період їх рівень у корневих бульбочках обох ефективних симбіотичних систем відновлювався до контрольного.

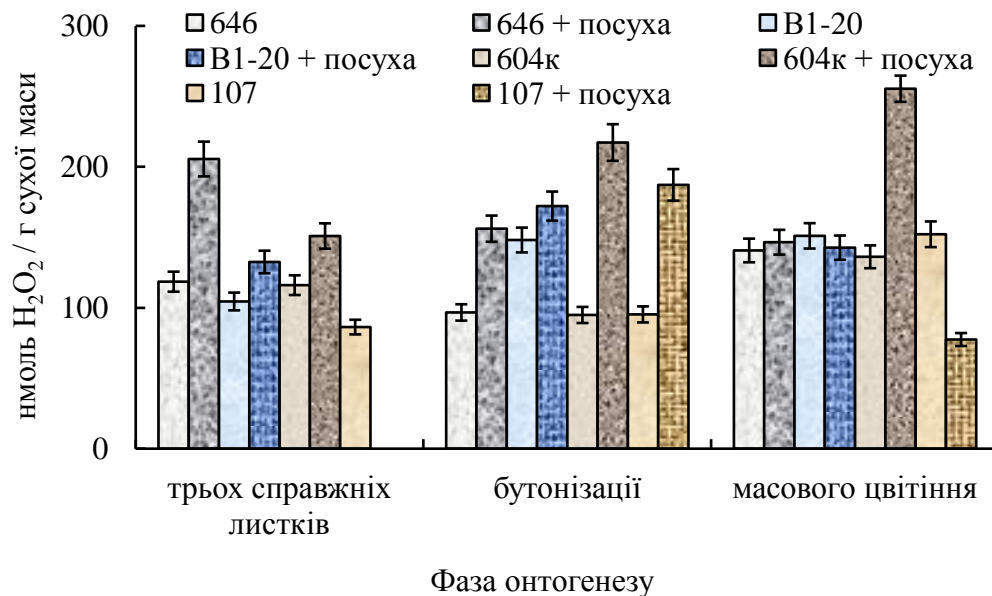


Рисунок 5.4 – Вплив посухи на вміст пероксидів у корневих бульбочках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum*

У сої, інокульованої неактивним штамом ризобій 604к, а також малоактивним Tn5-мутантом 107, виявлено підвищення вмісту пероксидів у корневих бульбочках за тривалої дії посухи відповідно на 128,8 96,4 %. У післястресовий період, їх вміст не відновлювався до рівня контрольних рослин з оптимальним поливом у цих симбіотичних системах. Зокрема, підвищувався на 87,5 % у корневих бульбочках сої за інокуляції ризобіями штаму 604к та знижувався 49,1 % за інокуляції Tn5-мутантом 107.

Показано, що вже на початкових етапах зневоднення у симбіотичній системі, утвореній за участю сої та активного штаму ризобій 646 вміст пероксидів у коренях зростав на 34,2 % і залишався на такому ж рівні за тривалого дефіциту вологи та після відновлення поливу рослин (рис. 5.5). У сої, інокульованої Tn5-мутантом B1-20, за помірної дії посухи спостерігали підвищення рівня пероксиду водню у коренях на 45,1 %, а за тривалого дефіциту

вологи – на 34,4 %, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним поливом. У післястресовий період його вміст у коренях сої практично відновлювався до контрольного рівня.

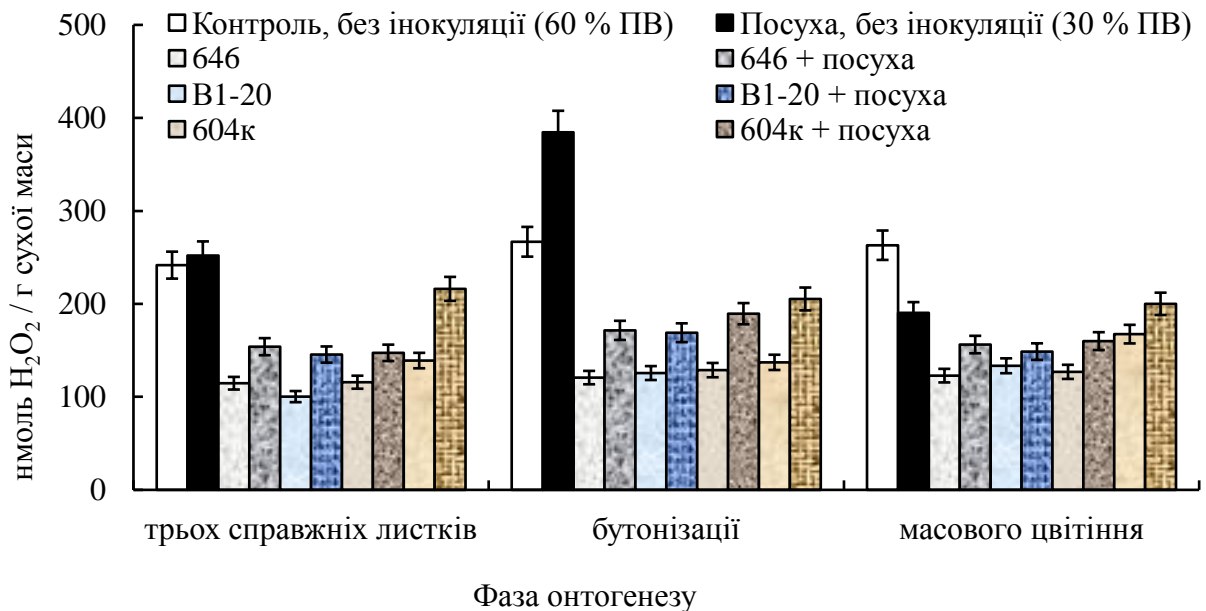


Рисунок 5.5 – Вплив посухи на вміст пероксидів у коренях сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *V. jarrowicum*

У симбіотичних системах, утворених за участю рослин сої та неактивного штаму ризобій 604к, а також малоактивного Tn5-мутанту 107, вміст пероксиду водню у коренях підвищувався на 50 % за тривалої дії посухи. Однак, після відновлення поливу рослин, його вміст практично відновлювався і зростав лише на 19,4 (штам 604к) і 26,0 % (Tn5-мутант 107) від рівня контрольних рослин із оптимальним поливом.

У сої, інокульованої активними штамом *V. jarrowicum* 646 та Tn5-мутантом B1-20, вміст пероксиду водню у листках незначно підвищувався впродовж дії посухи – на 28,9 і 17,7 % відповідно у фазу трьох справжніх листків та на 48,2 і 27,3 % у фазу бутонізації, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним поливом (рис. 5.6). У післястресовий період, його рівень у листках обох симбіотичних систем досягав контрольних рослин.

У симбіотичних системах, утворених за участю неактивного штаму ризобій 604к і малоактивного Tn5-мутанту 107, на початкових етапах зневоднення накопичення пероксиду водню у листках становило відповідно на 27,1 і 46,3 % вище рівня контрольних рослин з оптимальним водозабезпеченням. З посиленням дії водного стресу його вміст зростав, у порівнянні із контролем, на 73,9 % за інокуляції штамом 604к та на 79,1 % за інокуляції Tn5-мутантом 107. Після дії водного стресу, вміст пероксиду водню у листках цих симбіотичних систем був на 47,0 (штам 604к) і 64,5 % (Tn5-мутант 107) вище контролю.

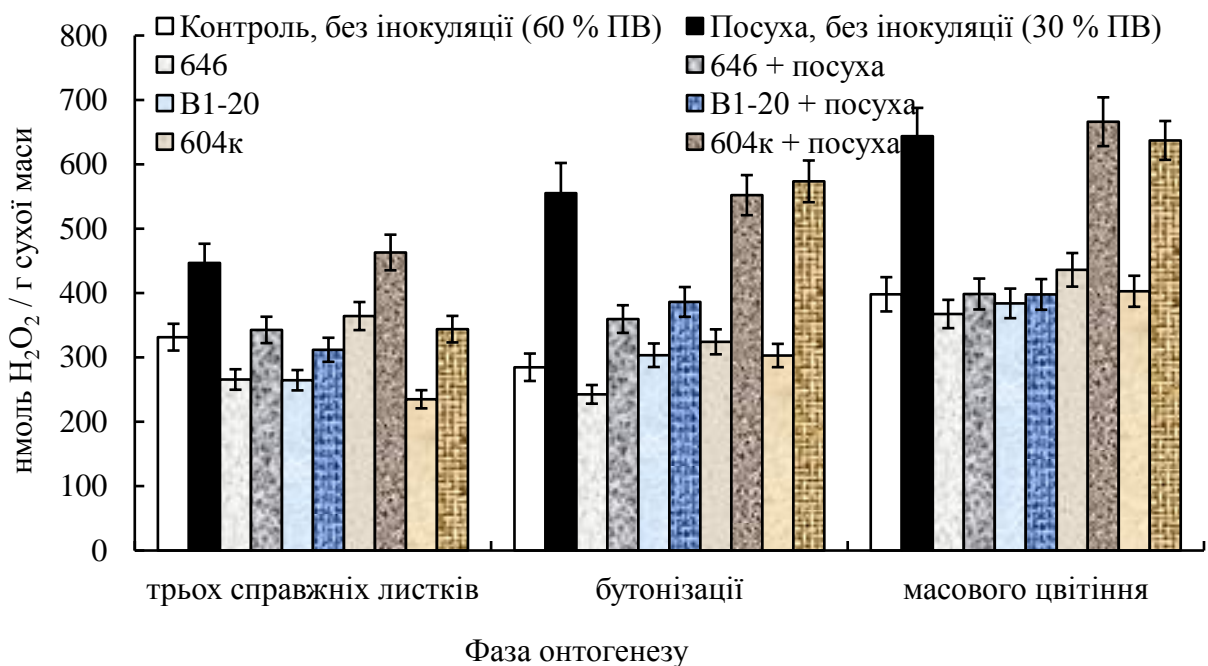


Рисунок 5.6 – Вплив посухи на вміст пероксидів у листках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *V. jarrowicum*

У симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та активного штаму *V. jarrowicum* 646 активність СОД у корневих бульбочках знижувалась на 51,2 % за помірної дії посухи у фазу трьох справжніх листків (рис. 5.7). За посилення водного стресу у фазу бутонізації активність ферменту зростала на 19,5 %, у порівнянні із контрольними рослинами, що зростали за оптимальних умов водозабезпечення. Після відновлення поливу рослин у фазу масового

цвітіння, активність СОД у корневих бульбочках досягала рівня контрольних рослин.

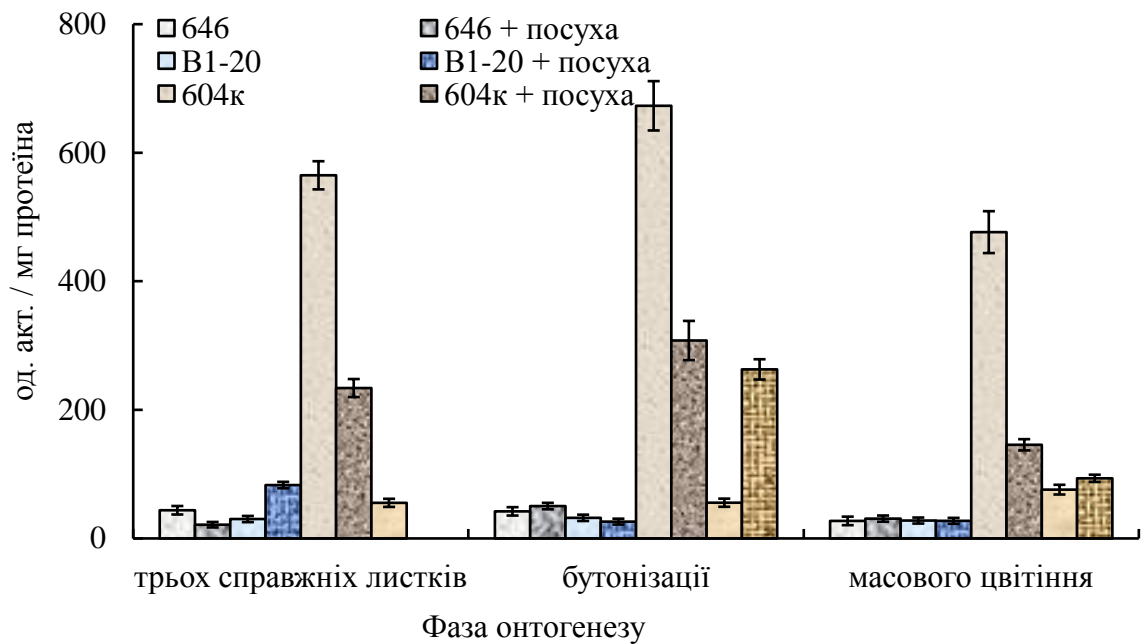


Рисунок 5.7 – Вплив посухи на активність СОД у корневих бульбочках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum*

У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та активного Tn5-мутанту B1-20, активність СОД у корневих бульбочках зростала на початкових етапах зневоднення на 174,9 % від рівня контрольних рослин з оптимальним поливом. За тривалої посухи її активність знижувалась на 18,4 %, а у післястресовий період відновлювалась до рівня рослин з оптимальним поливом.

У сої, інокульованої неактивним штамом ризобій 604к, спостерігали пригнічення активності ферменту впродовж посухи та після припинення її дії. Зокрема, впродовж дії водного стресу активність СОД у корневих бульбочках знижувалась на 58,6 і 54,2 %, тоді як у післястресовий період була на 69,4 % нижче за рівень контрольних рослин з оптимальним поливом.

За інокуляції сої ризобіями малоактивного Tn5-мутанта 107, виявлено підвищення активності СОД у корневих бульбочках на 373,0 % за тривалої дії посухи, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним поливом. Однак

у післястресовий період спостерігали відновлення його роботи до рівня рослин з оптимальним поливом.

Показано, що в ефективних симбіотичних системах, утворених за участю активних штаму ризобій 646 і Tn5-мутанту В1-20, активність СОД у коренях підвищувалась з наростанням дії посухи відповідно на 227,6 і 141,1 % вище рівня контрольних рослин з оптимальним поливом (рис. 5.8). У післястресовий період активність СОД у коренях сої незначно зростала на 26,2 % за інокуляції ризобіями штаму 646 та на 63,6 % Tn5-мутантом В1-20 у порівнянні із рослинами, які зростали за оптимального поливу.

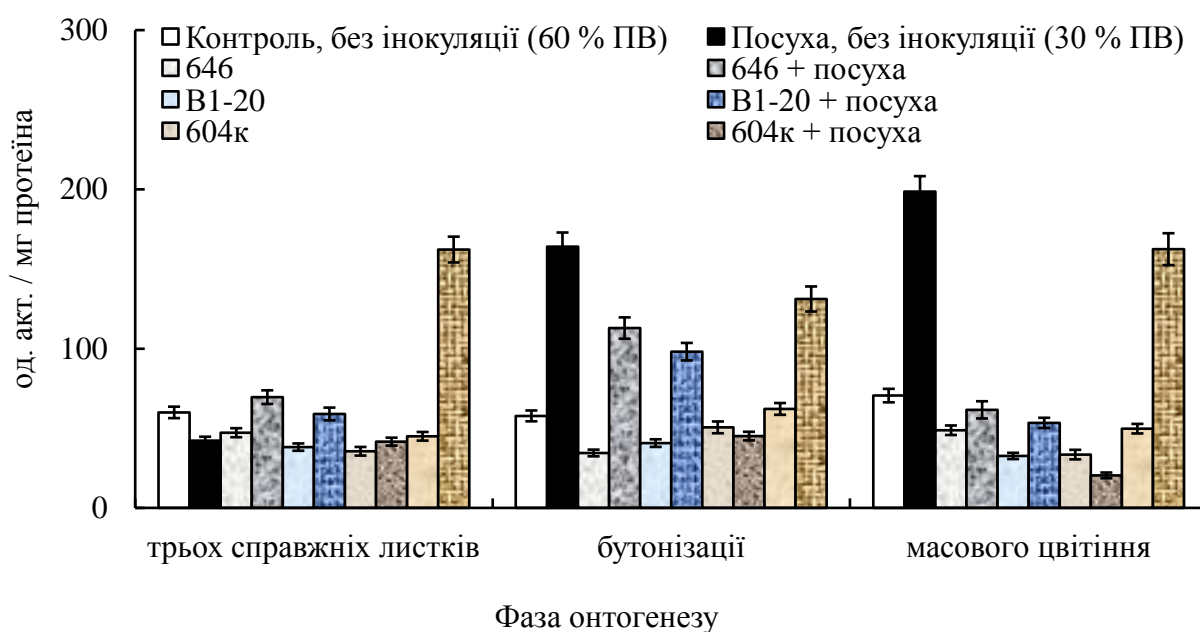


Рисунок 5.8 – Вплив посухи на активність СОД у коренях сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *V. jarrowii*

У неефективній симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та неактивного штаму ризобій 604к не зафіксовано суттєвих змін активності ферменту у коренях за помірної дії посухи та незначне зниження його активності на 10,8 %, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним водозабезпеченням. Після відновлення поливу рослин, активність ферменту

знижувалась на 39,0 %, у порівнянні із контрольними рослинами, що зростали за оптимальних умов водозабезпечення.

За помірної дії посухи виявлено різку інтенсифікацію активності СОД у коренях сої, інокульованої малоактивним Tn5-мутанта *B. japonicum* 107, яка зростала на 251,6 %, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним поливом. За тривалого зневоднення активність ферменту підвищувалась на 111,1 %, а після відновлення поливу рослин – на 226,6 %.

У ефективній симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та активного штаму ризобій 646, активність СОД у листках зростала впродовж дії посухи (рис. 5.9). Зокрема, на початкових етапах зневоднення її активність була на 78,3 % вищою за рівень контрольних рослин з оптимальним поливом. За тривалого водного стресу – на 58,5 %.

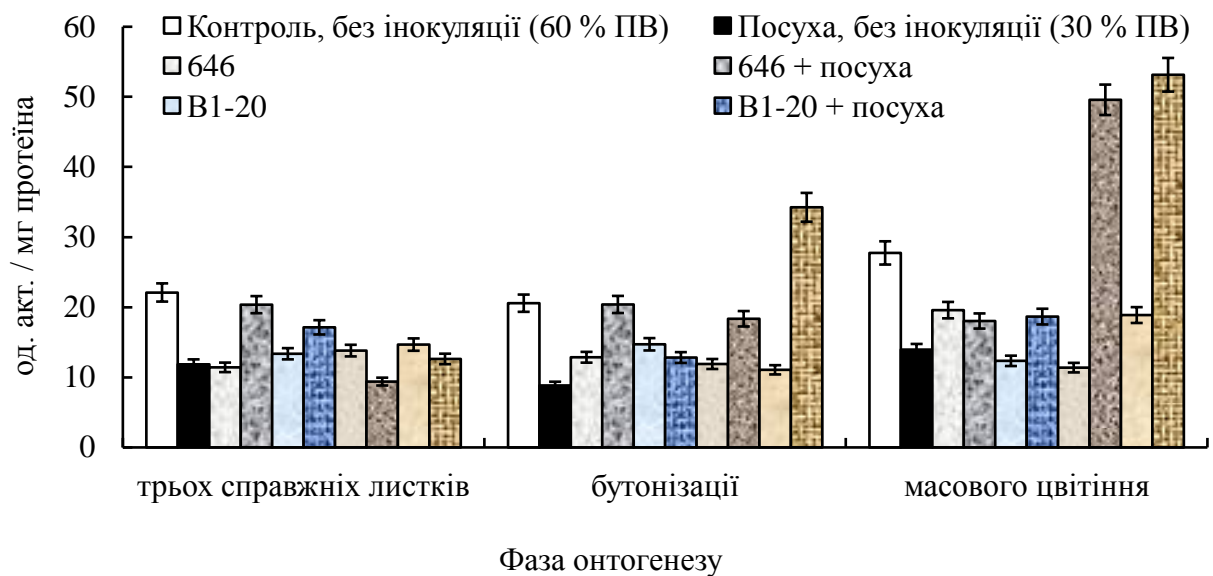


Рисунок 5.9 – Вплив посухи на активність СОД у листках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*

У симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та активного Tn5-мутанту B1-20, зафіксовано незначне зростання активності СОД у листках на 28,2 % за помірної дії посухи та зниження її активності на 12,8 % за жорсткого дефіциту вологи. Після відновлення поливу рослин, активність ферменту в обох

симбіотичних системах досягала рівня контрольних рослин з оптимальним поливом.

У неефективних симбіотичних системах, за помірної дії посухи зафіксовано зниження активності СОД на 32,0 % у листках сої, інокульованої неактивним штамом ризобій 604к та на 13,9 % за інокуляції малоактивним Tn5-мутантом 107. За посилення зневоднення, активність ферменту у листках підвищувалась відповідно на 54,1 і 209,3 %, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним поливом. Після відновлення поливу рослин, його активність зростала на 169,7 (штам 604к) та 181,5 % (Tn5-мутант 107).

Досліджено, що у симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та активного штаму ризобій 646, відбувалось незначне зниження активності КАТ у корневих бульбочках впродовж дії посухи на 15,5 % відносно контрольних рослин з оптимальним поливом (рис. 5.10). У післястресовий період зафіксовано підвищення її активності на 32,2 %, у порівнянні із контролем.

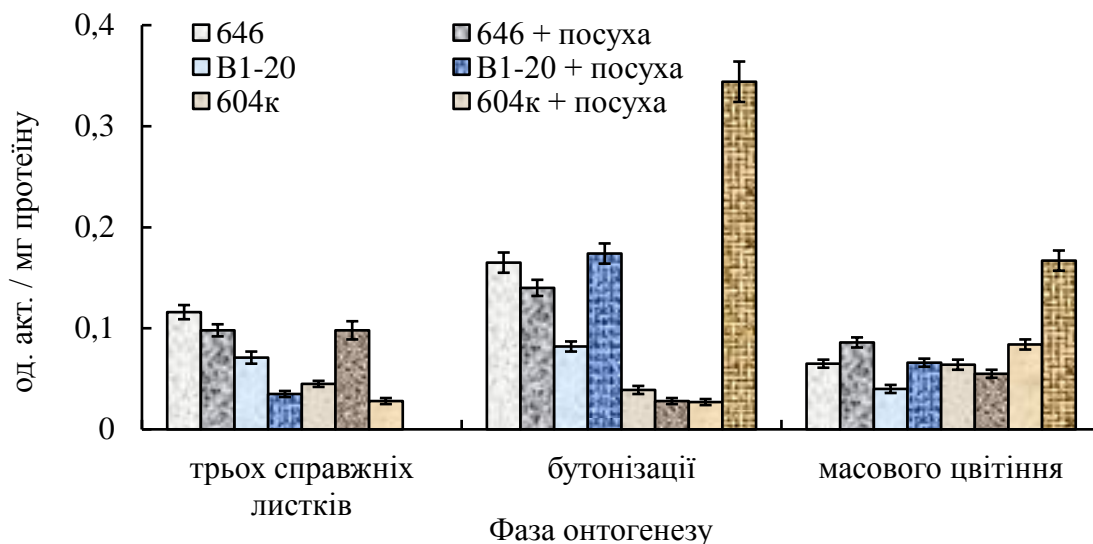


Рисунок 5.10 – Вплив посухи на активність КАТ у корневих бульбочках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum*

За помірної дії посухи у фазу трьох справжніх листків у рослин сої, інокульованої активним Tn5-мутантом B1-20 активність КАТ у корневих

бульбочках знижувалась на 50,7 %. За тривалого дефіциту вологи у фазу бутонізації активність ензиму зростала на 112,2 %, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним поливом. Після відновлення поливу рослин активність ферменту у корневих бульбочках зростала на 65,0 %.

У симбіотичній системі утвореній за участю сої та неактивного штаму ризобій 604к виявлено підвищення активності КАТ на 117,7 % у корневих бульбочках сої за помірної дії посухи у фазу трьох справжніх листків та зниження на 30 % за тривалої дії посухи у фазу бутонізації. У післястресовий період, у фазу масового цвітіння, активність КАТ залишалась на 14,1 % нижче рівня контрольних рослин із оптимальним поливом.

Зафіксовано різке зростання активності КАТ у 12,7 разів у корневих бульбочках сої, інокульованої малоактивним Tn5-мутантом 107 за тривалої дії посухи. У післястресовий період активність КАТ залишалась на підвищеному рівні і була на 98,8 % вище контрольних рослин з оптимальним поливом.

Інокуляція сої за участю активного штаму ризобій 646 спричиняла до активації захисних систем в умовах посухи. Зокрема, активність КАТ у коренях зростала на 72,0 % за помірної дії посухи та на 19,1 % за жорстких умов зневоднення (рис. 5.11). У післястресовий період активність ферменту незначно зростала на 38,4 %, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним водозабезпеченням.

У рослин, інокульованих активним Tn5-мутантом В1-20 активність КАТ у коренях зростала на 137,5 % за помірної дії посухи у фазу трьох справжніх листків та знижувалась на 24,0 % за тривалого дефіциту вологи у фазу бутонізації. Однак у післястресовий період її активність досягала рівня контрольних рослин з оптимальним поливом.

За дії посухи також спостерігали підвищення активності КАТ на 68,8 % у коренях рослин, інокульованих неактивним штамом ризобій 604к у фазу трьох справжніх листків та зниження її активності на 64 % у фазу бутонізації. У симбіотичній системі, утвореній за участю малоактивного Tn5-мутанта 107 виявлено зростання активності КАТ на 278,4 % у коренях за помірної дії стресу

та зниження активності ферменту на 20,7 % за тривалого дефіциту вологи. Після відновлення поливу рослин рівень активності КАТ у коренях сої, інокульованої неактивним штамом ризобій 604к залишався на досить низькому рівні на 44,0 % відносно контрольних рослин з оптимальним поливом. За таких умов у коренях сої, інокульованої Tn5-мутантом 107 її активність підвищувалась на 28,1 %.

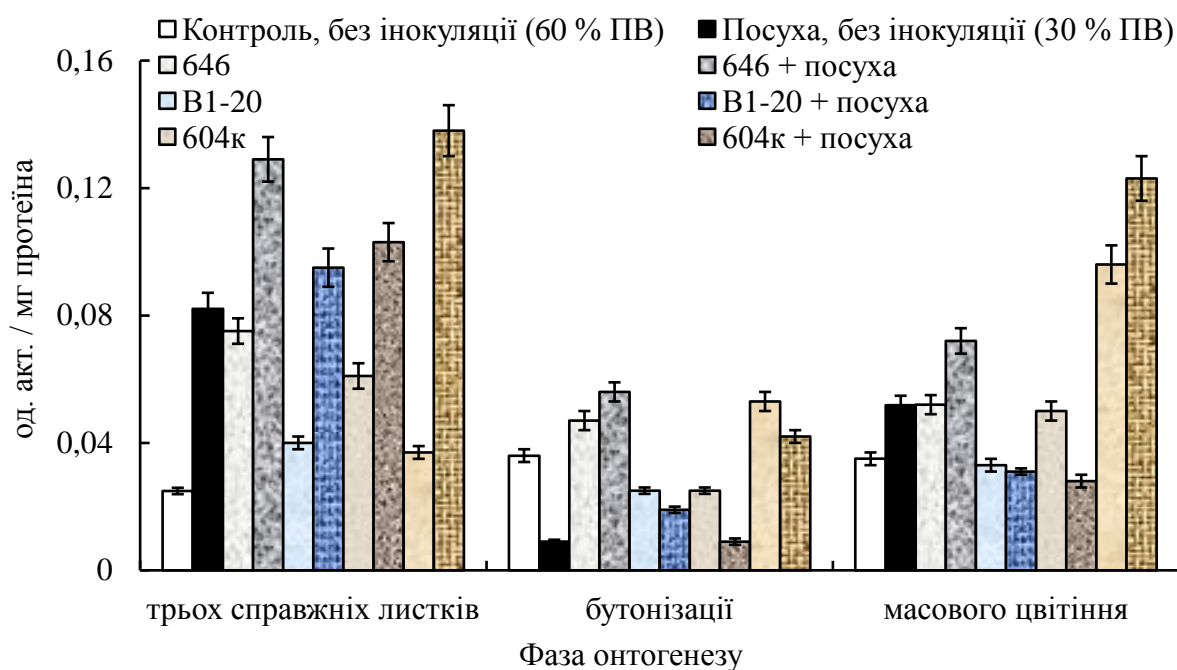


Рисунок 5.11 – Вплив посухи на активність КАТ у коренях сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *V. jarrowicum*

Виявлено, що в ефективних симбіотичних системах активність АПО у кореневих бульбочках сої помітно зростала вже за помірної дії посухи у фазу трьох справжніх листків. Зокрема, за інокуляції сої активним штамом ризобій 646 активність ферменту збільшувалась на 350,0 %, а за інокуляції активним Tn5-мутантом В1-20 на 301,9 %, у порівнянні із контрольними рослинами, що зростали за оптимальних умов водозабезпечення (рис. 5.12).

За жорстких умов дефіциту вологи у фазу бутонізації активність ферменту в кореневих бульбочках підвищувалась на 279,9 і 107,7 % відповідно за інокуляції ризобіями штамом 646 та Tn5-мутантом В1-20. У післястресовий

період активність АПО відновлювалась до рівня контрольних рослин з оптимальним поливом в обох ефективних симбіотичних системах.

У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та неактивного штаму *V. japonicum* 604к, виявлено зростання активності ферменту за тривалого дефіциту вологи у фазу бутонізації на 68,2 %, у порівнянні із контрольними рослинами, що зростали за оптимальних умов поливу. Після поновлення поливу рослин у фазу масового цвітіння, спостерігали пригнічення роботи ферменту – зниження на 47,7 % від контролю.

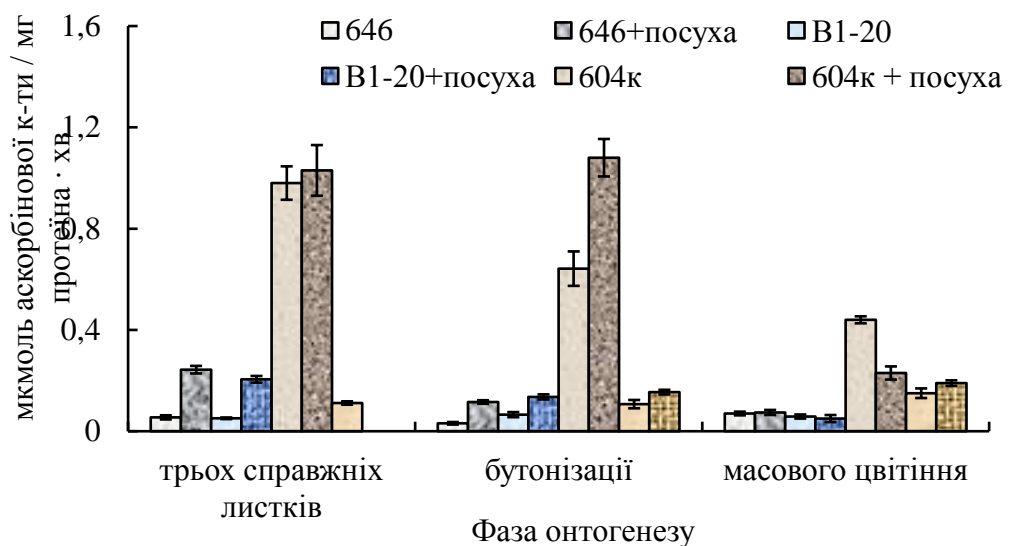


Рисунок 5.12 – Вплив посухи на активність АПО у корневих бульбочках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *V. japonicum*

У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та малоактивного Tn5-мутанта *V. japonicum* 107 відзначено несуттєве підвищення активності АПО у корневих бульбочках за тривалого зневоднення на 43,9 % та після відновлення поливу рослин на 47,7 %.

В ефективній симбіотичній системі, утвореній за участю рослин сої та штаму ризобій 646, активність АПО у листках зростала на 42,8 % за помірної дії посухи у фазу трьох справжніх листків та на 60,6 % за тривалої дії посухи у фазу бутонізації (рис. 5.13). Після поновлення поливу рослин активність ферменту

знижувалась на 26,2 %, у порівнянні із контрольними рослинами з оптимальним поливом.

У сої, інокульованої активним Tn5-мутантом B1-20, активність АПО у листках суттєво зростала на початкових етапах зневоднення, що становила на 114,2 % вище рівня контрольних рослин із оптимальним поливом. За посиленого впливу водного стресу активність ферменту не значно підвищувлась і лише на 15,6 % перевищувала рівень контрольних рослин. У післястресовий період активність АПО у листках цієї симбіотичної системи зростала на 235,9 %.

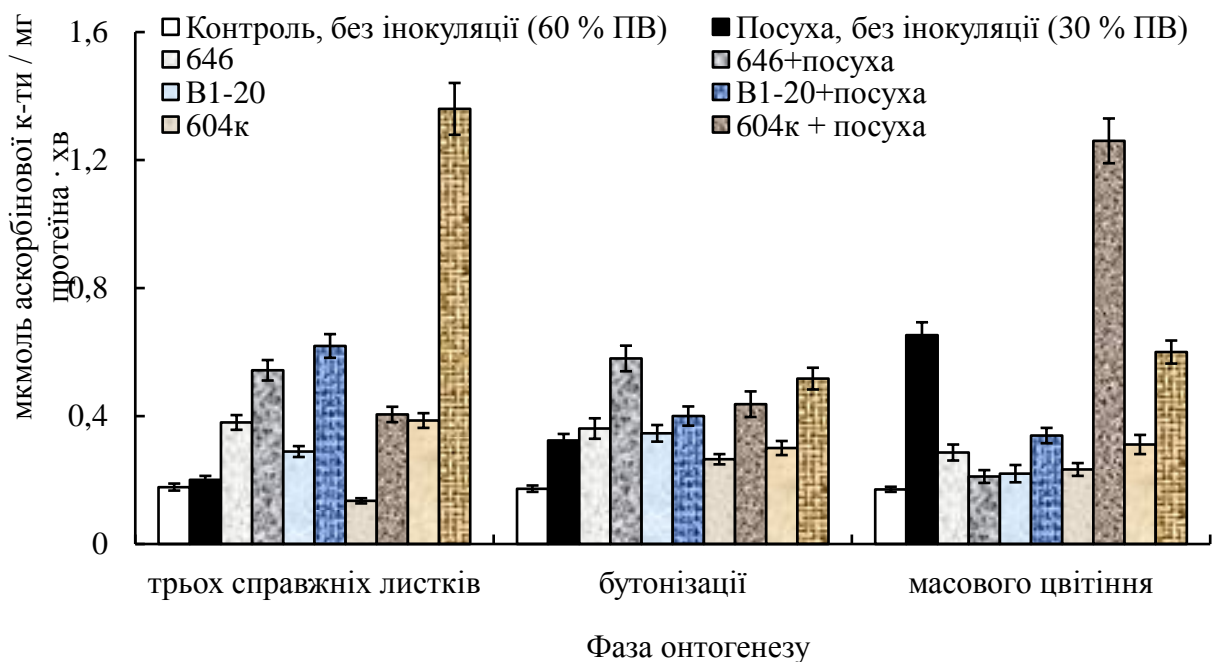


Рисунок 5.13 – Вплив посухи на активність АПО у листках сої, інокульованої різними за симбіотичними властивостями штамми та Tn5-мутантами *V. japonicum*

За інокуляції сої неактивним штамом ризобій 604к, а також малоактивним Tn5-мутантом 107, активність АПО у листках різко інтенсифікувала за помірної дії посухи у фазу бутонізації, зокрема на 200,0 і 252,3 % відповідно. За посиленої дії посухи у фазу бутонізації, не так сильно зростала у листках сої і була вищою за рівень контрольних рослин з оптимальним поливом на 64,9 % за інокуляції штамом 604к та на 88,3 % за інокуляції Tn5-мутантом 107. Після відновлення

поливу рослин, активність АПО різко зростала – на 440,7 % у неефективній симбіотичній системі та на 93,6 % у малоефективному соєво-ризобіальному симбіозі.

Аналіз отриманих результатів показав, що ефективні симбіотичні системи утворені за участю рослин сої та активних штаму *B. japonicum* 646 і Tn5-мутанту В1-20 відрізняються незначним зростанням вмісту МДА у бульбочках, коренях та листках впродовж посухи та швидким відновленням його рівня до оптимального після припинення дії водного стресу. Такі зміни процесів ліпопероксидації в обох симбіотичних системах супроводжувались збереженням роботи їх симбіотичного апарату. При цьому відбувалися адаптаційні зміни активності антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, каталази та аскорбатпероксидази) за дії зневоднення, що призводило до регуляції вмісту пероксиду водню у бульбочках, коренях та листках.

У симбіотичних системах, утворених за участю сої та малоактивного Tn5-мутанта 107 і неактивного штаму *B. japonicum* 604к, виявлено інтенсифікацію процесів ПОЛ та підвищення вмісту пероксидів у кореневих бульбочках, коренях та листках, а також нестабільну роботу активності антиоксидантних ензимів за дії водного стресу та слабе відновлення їх рівня до оптимального у післястресовий період.

6 ОТРИМАТИ ВИСОКОЕФЕКТИВНІ КОНКУРЕНТОЗДАТНІ ШТАМИ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ МЕТОДАМИ ТРАДИЦІЙНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ТА ТРАНСПОЗОНОВОГО МУТАГЕНЕЗУ

6.1 Первинний скринінг Tn5-мутантів повільнорослих бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum*, отриманих при використанні плазмідного вектора pSUP5011::Tn5mob за симбіотичними властивостями

Симбіотичні показники: нодуляція (кількість утворених корневих бульбочок), азотфіксувальна активність (відновлення ацетилену до етилену за участю ферменту нітрогенази бульбочкових бактерій) та ефективність (стимуляція росту вегетативної маси рослин) 42 Tn5-мутантів *B. japonicum* вивчали в порівнянні зі штамом-стандартом 634б. Отримані результати розподілені за групами: – показник менше контролю, на рівні контролю (± 5 –10%), більше контролю на 20% та понад 50% і представлені на гістограмах і в таблиці.

За формуванням біомаси бульбочок на коренях рослин сої визначені перспективними 9 мутантів (Д37, Д87, В78, В94, В130, В131, В140, В143, В157), які переважали контроль (штам-стандарт 634б) на 21,1–75,7% та – 4 мутанти – на 10,5–19,2% (рис. 6.1 і 6.2).

Інші 9 мутантів *B. japonicum* з урахуванням похибки досліду були подібними за формуванням симбіотичного апарату до виробничого штаму або зі суттєво зниженою нодуляційною активністю (7+11 культур) та 2 мутанти утворювали поодинокі бульбочки (Д34, В159), маса яких поступалась на 80% відповідному контролю.

Із літературних джерел відомо, що симбіотичні системи можуть проявляти різну динаміку азотфіксувальної активності й мати двовершинний характер піків активності у різні фази вегетації [170], що нами і враховано при селекції ризобій. За отриманими показниками сумарної азотфіксації симбіотичних систем сої (за

Маса корневих бульбочок на на сої сорту Лісабон за інокуляції Tn5-мутантами *B. japonicum*

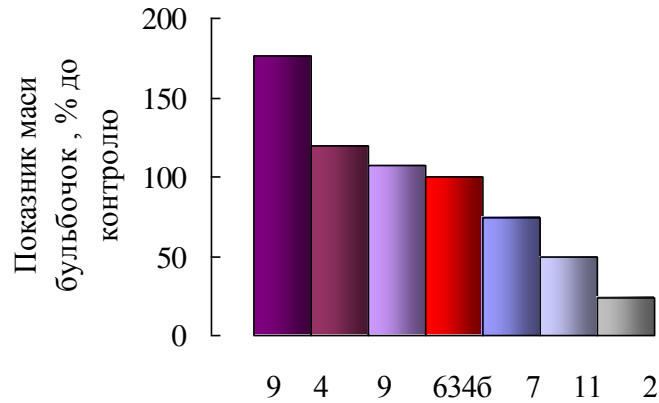


Рисунок 6.1 – Гістограма розподілу Tn5-мутантів *B. japonicum* за показником «маса корневих бульбочок на 1 рослині», фаза – бутонізація-початок цвітіння

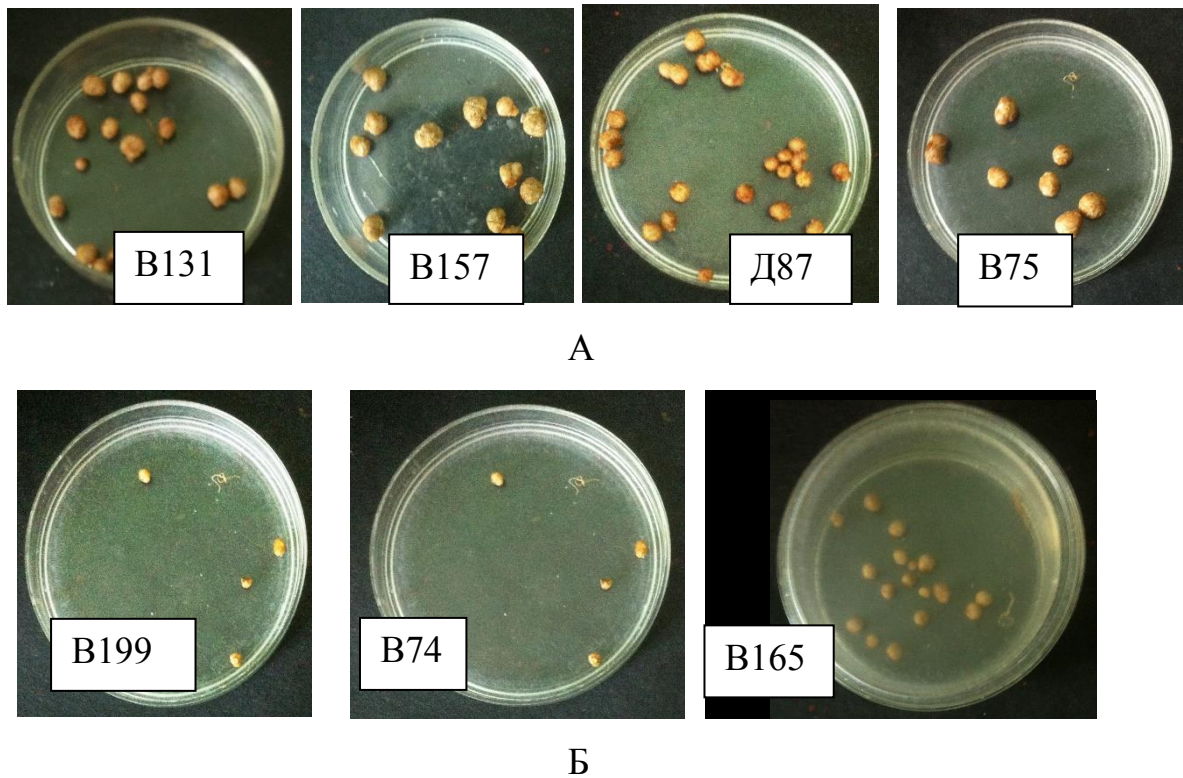


Рисунок 6.2 – Бульбочки, відокремлені від кореня: А – утворені за інокуляції активними Tn5-мутантами, Б – утворені за інокуляції малоактивними Tn5-мутантами (фаза – бутонізація-початок цвітіння)

період визначення (I та II відбори рослин)) відібрані кращі 7 Tn5-мутантів *V. japonicum* (Д87, В75, В154, В130, В131, В144) показник яких збільшився на 64,5–122,5 % (рис. 6.3).

У результаті ступеневого скринінгу за здатністю формувати більшу масу корневих бульбочок відібрано п'ять Tn5-мутантів – В75, Д87, В94, В131, В157.

У інших п'яťох мутантів показник зріс на 14,7%, у шістьох – на рівні контролю, у чотирнадцяти мутантів – знизився на 20%. Вкрай низька інтенсивність асиміляції N₂ була притаманна трьом мутантам В129 – 0,199 мкмоль, Д34–0,131 мкмоль і Д38 – 0,225 мкмоль С₂Н₄/(рослину×годину) (сумарна за 2 відбори рослин) (рис. 6.3).

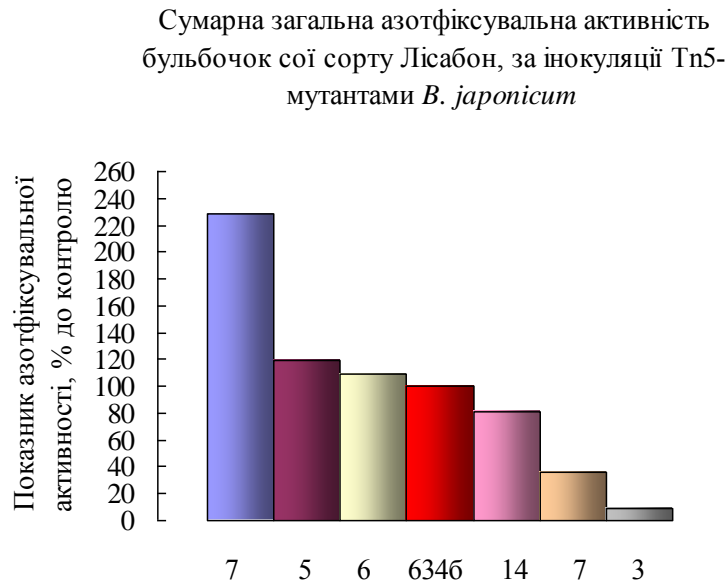


Рисунок 6.3. – Гістограма розподілу Tn5-мутантів за показником «сумарна загальна азотфіксувальна активність бульбочок на 1 рослині за період визначення» за інокуляції Tn5-мутантами *V. japonicum*

За інокуляції насіння сої сорту Лісабон культурами Д37, В81, В154, В155, В130, В131, В144 (7 мутантів, серед яких є й ті, що були кращими за АФА), приріст надземної маси становив 19,7–31,3%, застосування 4 культур приводило до збільшення показника на 12,2–18,8% (рис. 6.4).

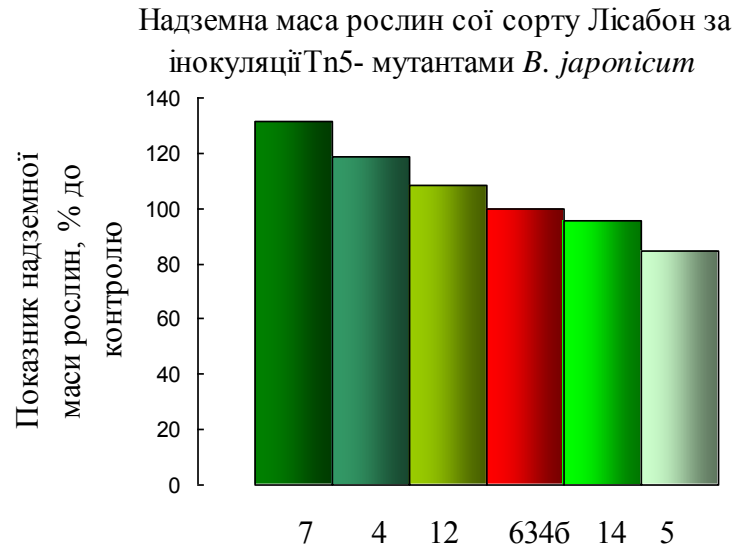


Рисунок 6.4 – Гістограма розподілу Tn5-мутантів за показником «Eff⁺-фенотип – ефективність» за інокуляції Tn5-мутантами *B. japonicum* (фаза – бутонізація-початок цвітіння)

Транспозонові мутанти *B. japonicum*, які були вірулентними, проявляли підвищену азотфіксувальну активність та збільшували надземну масу рослин понад 20% порівняно з контрольним варіантом (штам 6346), відмічено як «Eff⁺⁺» інокулянти та відібрано для подальшого вивчення (табл. 6.1).

Таблиця 6.1 – Симбіотичні показники Tn5-мутантів *B. japonicum*, відібраних для подальшої селекції

Варіант	Кількість бульбочок		Прибавка більше 20 % до штаму 6346							Надземна маса
			Маса бульбочок		АФА			II		
	I*	II**	I	II	I	II	Сумарна			
Tn5-мутанти штаму <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 6346										
Д87		66,6	64,38	49,7		16,0	199,3	84,0	122,5	
Д37		179		39,7						30,0
Д36						19,1				18,8

<i>продовження табл. 6.1</i>										
Tn5-мутанти штаму <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 646										
B75	25		60,3			18,6	146,3		25,2	
B78				25,5		16,0		54,5		
B79		125						47,9		
B81			12,3			65,4	50,9			
B82		87						18,6		
B94		116	31,5	29,8			79,1			17,3
B128			89,0							
B130		45,8		75,0				66,1	38,1	25,7
B131		100	23,3	24,2			48,1		19,0	28,0
B137		33,3	37,0			22,0	34,8			
B139			15,1							
B140		150		73,3				31,2	18,8	27,3
B144		25				27,6	103,8	44,7	64,5	31,3
B154		12,5					124,0		33,5	24,4
B157		83,7		54,65		69,23	23,4	175,8	128,8	
B163		50				51,3		28,9		
B166		37,5		17,4		52,8		77,0	20,3	
Всього досліджено у вегетаційних умовах						42 Tn5-мутанта <i>B. japonicum</i>				
Відібрано			20 транспозантів							

Примітка. * – фаза трьох справжніх листків, ** – фаза бутонізації-початку цвітіння

6.2 Селекція Tn5-мутантів (pSUP5011::Tn5mob) *Bradyrhizobium japonicum* за симбіотичними властивостями на підвищеному фоні мінерального азоту

Утворення на коренях сої бульбочок за участю Tn5-мутантів *B. japonicum* на фоні 0,75 норми азоту свідчить про їх рухливість, агресивність (ступінь

проникнення до корневих волосків рослин), толерантність до мінерального азоту та ін. Відмінності між досліджуваними Tn5-мутантами *V. japonicum* за їх вірулентністю, розташуванням бульбочок на коренях рослин та наростанням їх маси відзначено протягом вегетаційного періоду рослин на фоні 0,75 норми азоту (рис. 6.5).

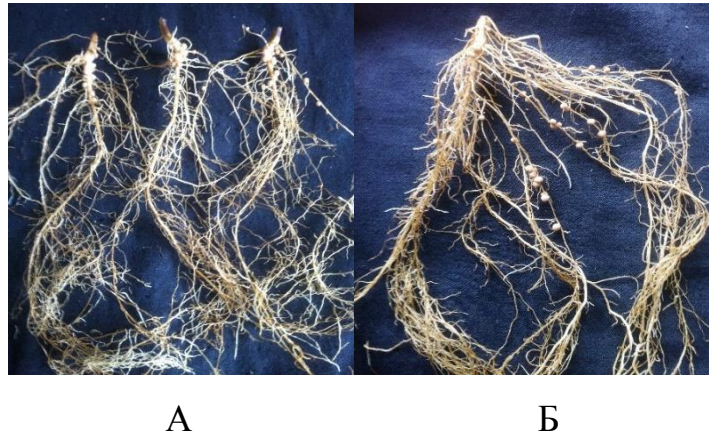


Рисунок 6.5 – Корені сої, інокульованої Tn5-мутантами: А – активними (бульбочки на головному корені), Б – малоактивними (бульбочки – на бічних коренях), фаза розвитку – утворення третього справжнього листка

Найбільшу масу корневих бульбочок у сої формували Tn5-мутанти штаму *V. japonicum* 634 (Д37, Д87) та штаму 646 (В78, В157) протягом вегетаційного періоду рослин (рис. 6.6).

Попри деякі розбіжності нам вдалося відібрати чотири мутанти *V. japonicum*, (Д37, Д87, В78 та В157), які здатні до активної асиміляції атмосферного азоту в симбіозі з соєю на фоні 0,75 норми мінерального азоту. Інтенсивність азотфіксації сформованих за їх участю бульбочок стабільно домінує над контролем у 1,6–2,3 рази у фази бутонізації та бутонізація-цвітіння (рис. 6.7).

Наростання надземної маси у більшості дослідних рослин суттєво контроль не перевищує. Із цього випливає, що підвищення ефективності симбіотрофного азотного живлення рослин стримують фізіологічні і генетичні фактори, які обмежують використання фіксованого ризобіями азоту для

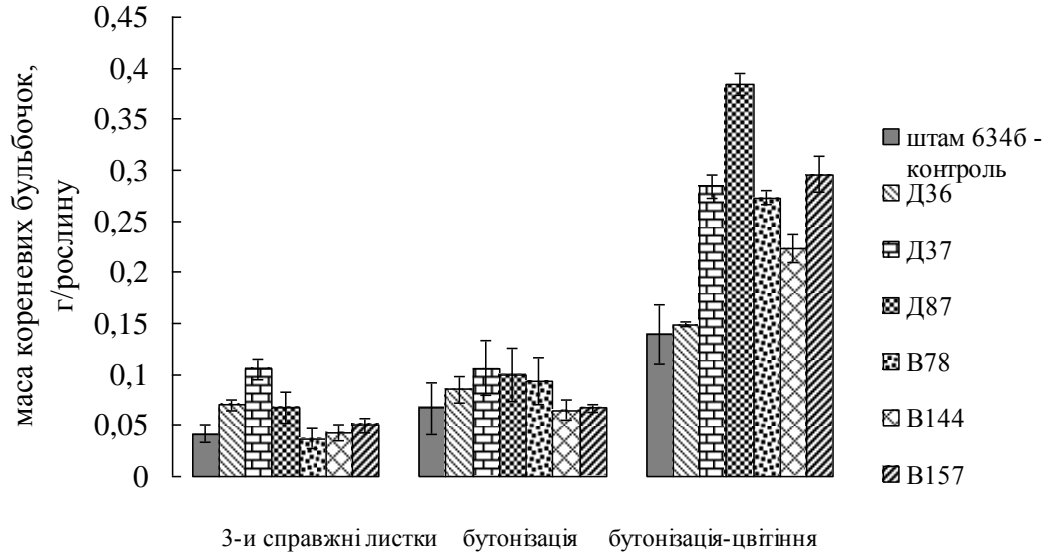


Рисунок 6.6 – Динаміка наростання маси кореневих бульбочок сої, інокульованої найбільш активними Tn5-мутантами *V. jarrowicum*, на фоні 0,75 норми азоту

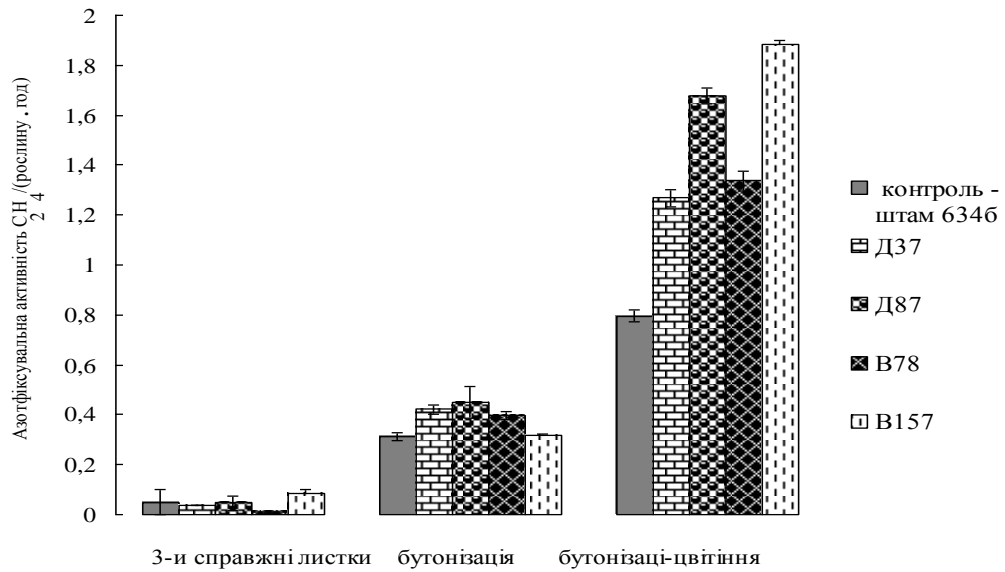


Рисунок 6.7 – Динаміка азотфіксувальної активності бульбочок сої, інокульованої найбільш активними Tn5-мутантами *V. jarrowicum*, на фоні 0,75 норми азоту

формування додаткової біомаси. Наприклад, у фазу бутонізації-цвітіння АФА збільшилася в 1,6–2,3 рази, а показник надземної маси в цей період зріс у 1,3–1,4 рази.

Відомо, що азотфіксувальна активність і здатність збільшувати масу рослин (ефективність симбіозу) контролюється різними генами ризобіопартнера [118] і, як наслідок, корелятивний зв'язок між азотфіксувальною активністю бульбочок і величиною надземної маси фітосимбіонта не завжди присутній. Саїмназаров [171] зазначає, що причина обмеження адекватного до збільшення АФА, наростання зеленої маси інокульованих рослин полягає в тому, що значна частина фіксованого бактеріями азоту затримується в коренях і витрачається не на формування біомаси рослин, а на її збагачення азотом. У роботах Онищук зі співавт. [172, 173] було також показано, що симбіотична ефективність рекомбінантних штамів бульбочкових бактерій люцерни обмежена нездатністю рослин до повного залучення біологічного азоту в ростові процеси і, зокрема, до передачі в надземні органи транспортних форм азоту, накопичення яких у коренях і бульбочках інгібує надходження енергії до бактероїдів. За результатами аналізу *eff*-генів авторами показано, що жодний із них не пов'язаний безпосередньо з роботою нітрогенази [173, 174].

За результатами досліджень відібрані найбільш активні за симбіотичним фенотипом Tn5-мутанти штамів 6346 та 646 *V. japonicum* – Д37, Д87, В78 і В157, які за показником «надземна маса» перевищували контрольний штам 6346 на 23,9–38,7 % на фоні 0,75 норми мінерального азоту (рис. 6.8).

На рис. 6.9 представлено гістограму, зведену за симбіотичними показниками (вірулентність (кількість бульбочок), нодуляція (маса бульбочок), азотфіксація (азотфіксувальна активність бульбочок), ефективність (надземна маса рослин) найбільш активних Tn5-мутантів бульбочкових бактерій сої Д37, Д87, В78 і В157, які пропонуються для подальшого вивчення з метою створення за їх участю ефективних бобово-ризобіальних симбіозів, толерантних до негативних факторів навколишнього середовища.

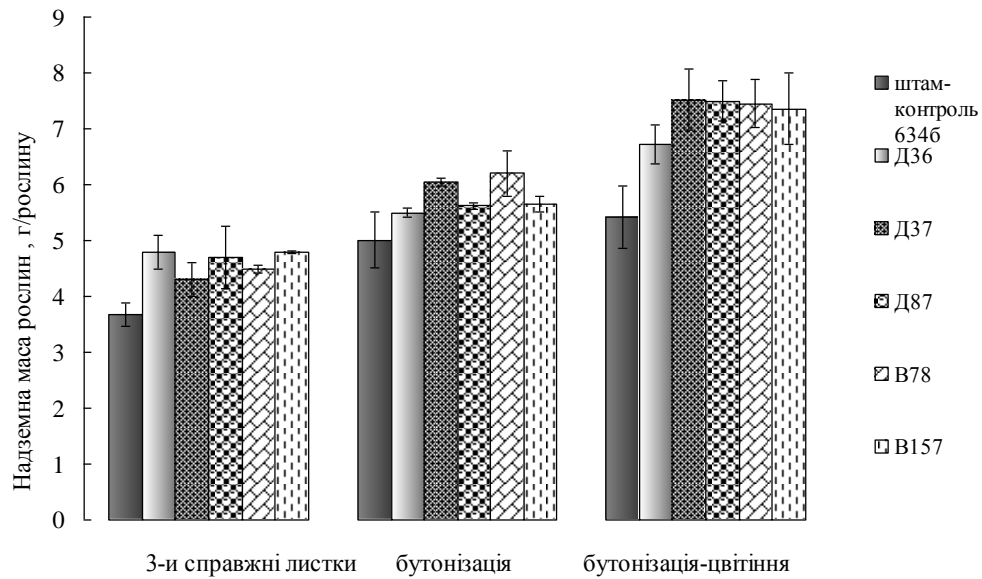


Рисунок 6.8 – Динаміка надземної маси рослин сої, за інокуляції Tn5-мутантами *V. japonicum*, які відібрані за показником «ефективність» на фоні 0,75 норми азоту

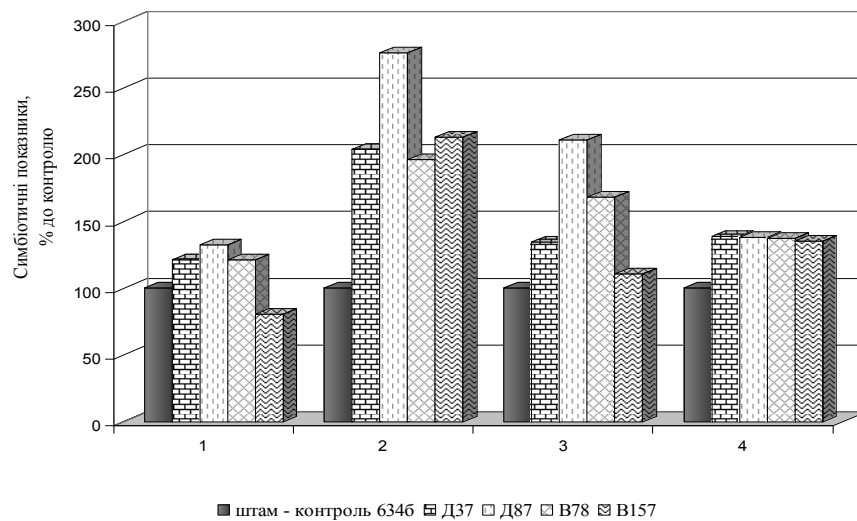


Рисунок 6.9 – Гістограма розподілу Tn5-мутантів *V. japonicum* за симбіотичними показниками на фоні 0,75 норми мінерального азоту у фазу бутонізації-цвітіння: 1 – вірулентність, 2 – нодуляція, 3 – азотфіксація, 4 – ефективність

Таким чином, генетичне конструювання та селекція високоактивних симбіотичних азотфіксаторів *V. japonicum* є раціональним підходом до створення систем адаптивного землеробства і рослинництва, заснованого на екологічно

безпечних і ресурсозберігаючих технологіях. Проте застосування цієї стратегії обтяжена рядом обмежень у реалізації симбіотичної активності бактерій, які зумовлені нездатністю рослин повністю використовувати асимільований бактеріями молекулярний азот атмосфери і низькою відтворюваністю симбіотичного фенотипу бактерій. Перший фактор пов'язаний із фізіологічними обмеженнями у використанні фіксованого азоту рослинами, що потребує їх можливо генетичної модифікації, включаючи зміну балансу в сторону симбіотрофного живлення.

6.3 Реалізація симбіотичних властивостей, конкурентоздатність та ефективність азотостійких Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* залежно від тривалості періоду від обробки насіння сої бульбочковими бактеріями до посіву

Удосконалення біопрепаратів бульбочкових бактерій під сою у напрямку підвищення допустимих часових термінів між інокуляцією насіння і його посівом значно підвищить їх ефективність та привабливість як інструменту отримання біологічного азоту.

Метою роботи було вивчити ефективність нодуляції та функціонування симбіотичного апарату, ріст і розвиток рослин в залежності від тривалості періоду від інокуляції насіння бульбочковими бактеріями *B. japonicum* до посіву (інокуляція в день посіву та завчасна інокуляція за 7 діб) без застосування допоміжних речовин (екстендерів) у мікробних препаратах.

Інокуляцію насіння сої сорту Алмаз здійснювали рідкофазним препаратом, виготовленим на основі відібраних активних штамів бульбочкових бактерій *B. japonicum* В78, В157, Д37, Д87.

В умовах вегетаційного дослідження виявлено відмінності за формуванням та функціонуванням симбіотичного апарату, показниками надземної та кореневої

маси рослин сої залежно від тривалості періоду від обробки насіння до посіву та фази розвитку рослин.

За інокуляції насіння в день посіву сої утворюється більша кількість корневих бульбочок (табл. 6.2).

Таблиця 6.2 – Кількість корневих бульбочок (шт./рослину) у сої сорту Алмаз залежно від тривалості періоду від обробки насіння до посіву

Штам-інокулянт	Фаза розвитку рослин			
	початку утворення 3-го справжнього листка		бутонізації-початку цвітіння	
	за 7 діб	у день посіву	за 7 діб	у день посіву
Д37	29,0±0,3	36,3±3,5	36,5±3,4	39,7±1,7
Д87	21,6±3,3	27,0±3,4	30,0±2,0	32,0±3,8
В78	14,0±0,6	22,6±2,2	28,0±1,6	30,0±2,8
В157	17,0±0,3	39,0±1,3	29,5±2,5	45,0±3,3

Однак, маса бульбочок та інтенсивність азотфіксації домінувала у варіантах із інокуляцією насіння за 7 діб до посіву сої у фазу початку утворення третього справжнього трійчастого листка (табл. 6.3).

Наприклад, у фазу початку утворення третього справжнього листка АФА бульбочок була інтенсивнішою в 1,7, 6,6, 4,5 і 1,8 разів у рослин сої, інокульованої відповідно *V. japonicum* Д37, Д87, В78 та В157 за 7 діб до посіву, порівняно з варіантами (інокуляція в день посіву аналогічними препаратами). При цьому застосування препарату на основі *V. japonicum* Д87 забезпечило найвищий рівень азотфіксації у цей період завдяки формуванню найбільшої маси бульбочок на коренях рослин (табл. 6.4).

У фазу бутонізації-початку цвітіння різниця за симбіотичними показниками істотно зменшилася між варіантами з різними термінами між інокуляцією та посівом насіння *Glycine max* L. та зафіксована тенденція до посилення

інтенсивності азотфіксації корневих бульбочок сої у варіантах із інокуляцією насіння в день посіву.

Таблиця 6.3 – Маса корневих бульбочок (г/рослину) сої сорту Алмаз у залежності від тривалості періоду від інокуляції насіння до посіву

Штам-інокулянт	Фаза розвитку рослин, проведення інокуляції			
	початку утворення 3-го справжнього листка		бутонізації-початку цвітіння	
	за 7 діб	у день посіву	за 7 діб	у день посіву
Д37	0,152±0,004	0,122±0,03	0,23±0,01	0,21±0,02
Д87	0,200±0,004	0,101±0,006	0,31±0,06	0,24±0,02
В78	0,097±0,003	0,063±0,001	0,22±0,00	0,137±0,01
В157	0,198±0,016	0,113±0,018	0,30±0,05	0,29±0,01

У фазу початку утворення третього справжнього листка надземна фітомаса та маса коренів рослин інокульованих завчасно (за 7 діб) здебільшого переважала відповідні показники рослин бактеризованих у день посіву.

Таблиця 6.4 – Азотфіксувальна активність (мкМоль C_2H_4 /(рослину×год) корневих бульбочок сої сорту Алмаз у залежності від тривалості періоду від інокуляції насіння до посіву

Штам-інокулянт	Фаза розвитку рослин, проведення інокуляції			
	початку утворення 3-го справжнього листка		бутонізації-цвітіння	
	за 7 днів	у день посіву	за 7 днів	у день посіву
Д37	1,34±0,08	0,76±0,02	2,86±0,34	2,71±0,17
Д87	4,85±1,06	0,73±0,03	3,64±0,46	3,79±0,28
В78	2,50±0,30	0,55±0,02	3,83±0,21	2,87±0,19
В157	1,65±0,42	0,91±0,01	3,22±0,22	3,72±0,13

У процесі вегетації сої різниця за масою коренів між рослинами варіантів із різними інтервалами між інокуляцією та посівом насіння мала тенденцію до зменшення та у фазу бутонізації-початку цвітіння виявилася не істотною (табл. 6.5).

Таблиця 6.5 – Надземна та маса кореня (г/рослину) сої сорту Алмаз за інокуляції бульбочковими бактеріями *V. japonicum*, фаза бутонізації-початку цвітіння

Штам-інокулянт	Надземна маса		Маса кореня	
	за 7 діб	у день посіву	за 7 діб	у день посіву
D37	3,86±0,23	4,23±0,13	3,35±0,26	3,08±0,23
D87	4,06±0,28	4,60±0,32	3,33±0,22	3,44±0,20
B78	3,77±0,12	4,08±0,30	3,18±0,25	2,97±0,21
B157	3,70±0,24	4,24±0,32	3,12±0,19	2,84±0,18

У той же час, надземна маса рослин у варіантах із бактеризацією насіння в день посіву дещо домінувала на 9,6, 13,3, 8,2 та 14,5% над аналогічним показником рослин бактеризованих завчасно до посіву (за 7 діб) відповідно штамми *V. japonicum* Д37, Д87, В78 та В157 (табл. 6.5).

Це розкриває можливість ефективного застосування завчасної (за 7 діб) бактеризації насіння сої препаратами на основі активних штамів бульбочкових бактерій *V. japonicum* Д37, Д87, В78, В157 без застосування екстендерів.

Очевидно, часовий інтервал у 7 діб між інокуляцією насіння та посівом є допустимим у випадку застосування препаратів, основою яких є зазначені активні штами бульбочкових бактерій *V. japonicum* із високим рівнем продукування екзополісахаридів, оскільки останні можуть слугувати природними заміниками синтетичних прилипачів-екстендерів, які застосовуються в сучасних пре-інокулянтах. Відомо, що екзополісахариди бактерій, утворюючи біоплівку навколо ризобіальних клітин, забезпечують їх

адсорбцію на поверхні насінини та захисну функцію, сприяючи тим самим збереженню їх на насінні певний проміжок часу та відновленню фізіологічних та симбіотичних властивостей.

6.4 Конкуレントоздатність активних азотостійких Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* в залежності від терміну обробки бактеріальним препаратом (в день обробки та за 7 діб до посіву)

У якості агресивного штама-конкурента використали неактивний штам *B. japonicum* 604к. Інокуляція сої сумішшю бульбочкових бактерій (Tn5-мутант+604к) приводила до незначного збільшення загальної кількості бульбочок та в більшості випадків дещо зменшувала наростання їх маси порівняно до моноінокуляції відповідним активним штамом (рис. 6.10). Зазначені процеси свідчать про послаблення активними Tn5-мутантами агресивної дії (впливу) високонкурентного неактивного штаму 604к *B. japonicum* при формуванні та функціонуванні симбіотичних органів рослин за обох використаних способів обробки насіння сої.

За показниками азотфіксувальної активності найбільш ефективні є Tn5-мутанти Д87 та В78 *B. japonicum* як за моноінокуляції так і за сумісної (активний+604к), як при завчасній так і інокуляції сої бульбочковими бактеріями в день посіву (табл. 6.6). Із цього випливає, що у процесах інвазії, формуванні та функціонуванні бактероїдів генетичний фактор мікросимбіонта відіграє домінуючу роль.

Інокуляція насіння неактивним штамом 604к або сумішами (активний штам+604к) за різних термінів призводило до сповільненого росту надземної маси рослин сої та до стимулювання ризогенезу (табл. 6.6). Але різниця між рослинами за зеленою масою за моно- і бінарної інокуляції була несуттєвою. Це може свідчити про те, що частка бульбочок утворених активним штамом у

загальній кількості утворених симбіотичних органів на рослині є домінуючою, що забезпечує оптимальну азотфіксацію навіть за депресивного впливу штаму 604.

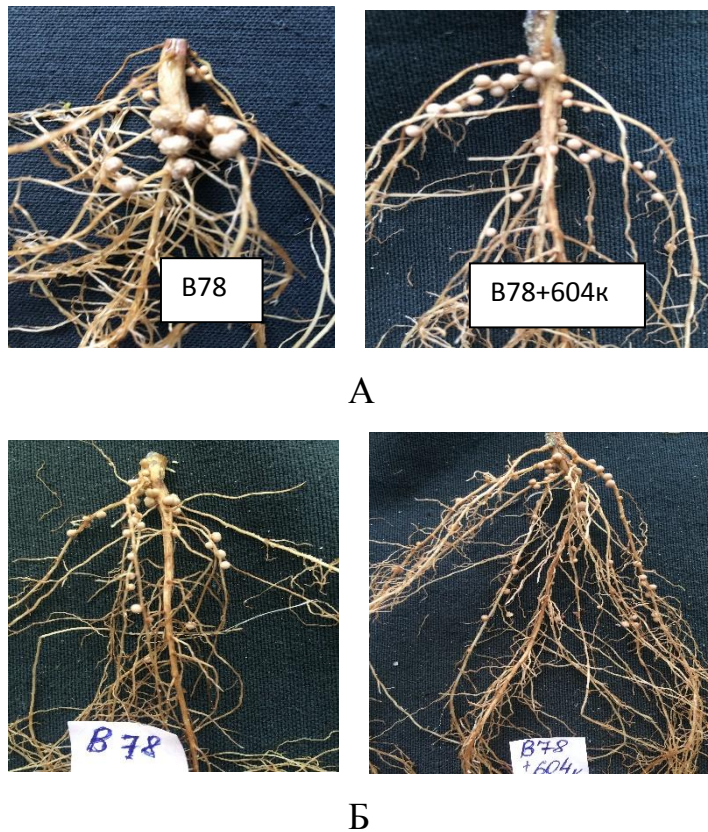


Рисунок 6.10 – Кількість бульбочок на коренях сої, бактеризованої моно- та бінарними суспензіями *B. japonicum*: А – завчасна (за 7 діб) інокуляція, Б – інокуляція в день посіву

Рекомбінантні штами бульбочкових бактерій сої характеризуються високою конкурентоздатністю на сої сорту Алмаз відповідно 73,0–77,0% за завчасної інокуляції та 80–83% – за інокуляції в день посіву – однією із провідних ознак при формуванні ефективних симбіозів із високим продукційним потенціалом (табл. 6.7).

Перспективним за господарсько-корисними властивостями, зокрема конкурентоздатністю, інтенсивністю фіксації азоту бульбочками та ефективністю симбіозу можна вважати всі використанні у дослідженні транспозонові мутанти, проте серед них найкращими є *B. japonicum* B78 та Д87.

Таблиця 6.6 – Азотфіксувальна активність бульбочок сої сорту Алмаз за інокуляції моно- та бінарними суспензіями на основі активного і неактивного штамів *B. japonicum* (фаза утворення третього справжнього листка)

Інокулянт	АФА, мкМоль C ₂ H ₄ /(рослину × год)		Маса кореня, г/рослину	
	за 7 діб	у день посіву	за 7 діб	у день посіву
604к	0,0093±0,0	0,0067±0,0	2,93±0,65	2,66±0,16
Д87	4,85±1,06	0,726±0,03	2,44±0,35	1,98±0,14
Д87+ 604к	3,81±1,62	0,810±0,06	2,97±0,30	2,19±0,31
В78	2,50±0,30	0,546±0,02	1,75±0,16	2,0±0,21
В78+ 604к	2,41±0,28	0,74±0,02	2,22±0,24	2,26±0,32

Таблиця 6.7 – Конкурентоздатність та надземна маса рослин сої сорту Алмаз, за інокуляції моно- та бінарними суспензіями на основі активного і неактивного штамів бульбочкових бактерій *B. japonicum* (вегетаційний дослід, 2018 р., фаза утворення третього справжнього листка)

Інокулянт	Надземна маса, г/рослину	Конкуренто- здатність, %	Надземна маса, г/рослину	Конкуренто- здатність, %
	за 7 діб		у день посіву	
Без інокуляції	3,42±0,30		3,12±0,33	
604к	3,57±0,23		3,26±0,30	
Д87	4,10±0,28	77	3,73±0,25	80
Д87+ 604к	3,98±0,30		3,64±0,20	
В78	3,87±0,21	73	3,85±0,36	83
В78+ 604к	3,79±0,12		3,75±0,39	

В умовах польового дослідження проведено випробування рідкофазних препаратів (виготовлені на основі перспективних штамів бульбочкових бактерій, отриманих різними методами селекції *B. japonicum* PC07 та В78) за різних

часових термінів їх застосування до посіву насіння в ґрунт (передпосівна інокуляція насіння сої в день посіву та завчасна інокуляція за 14 діб до посіву).

Присутність та «агресивність» місцевих рас ризобій дослідної ділянки підтверджується кількістю сформованих бульбочок на коренях сої у варіанті без інокуляції, проте накопичення маси бульбочок в 2,1–2,7 разів є меншою проти показників варіантів із інокуляцією препаратами. Рівень азотфіксації інокульованих рослин перевищує в 3,7–4,8 разів варіанти без інокуляції. На фоні місцевих рас бульбочкових бактерій інокуляція препаратами була ефективнішою, а прибавка зібраного насіння сої дорівнювала 11,14–11,20% за інокуляції насіння штамом PC07, отриманим внаслідок аналітичної селекції, та 22,3–26,7% – за інокуляції штамом B78, отриманим у результаті застосування генетичної модифікації.

Значних відмінностей у формуванні симбіотичного апарату між варіантами з різними термінами інокуляції не виявлено. У фазу бутонізація-початок цвітіння відзначено неістотне збільшення кількості бульбочок на коренях рослин у варіантах із інокуляцією в день посіву, проте маса бульбочок та АФА домінувала у варіантах із завчасною (за 14 діб) інокуляцією (зокрема, збільшення маси бульбочок на 13,1% за передчасної (за 14 діб) інокуляції насіння ризобіями штаму B78 проти варіанту з інокуляцією в день посіву). Азотфіксувальна активність була вищою у варіантах із завчасною інокуляцією (за 14 діб) насіння препаратами на основі B78 та PC07 відповідно на 7,6% та 14,8% проти варіантів із інокуляцією в день посіву (табл. 6.8).

Середній урожай зерна сої варіантів із різними термінами між інокуляцією та посівом насіння в ґрунт істотно не відрізнявся. Наприклад, збільшення урожаю на 3,5% у варіанті B78 (за 14 днів) порівняно з варіантом B78(ДП), а також зменшення урожаю зерна на 0,3% у варіанті PC07 (за 14 діб) порівняно з варіантом PC07 (ДП) не має істотної різниці. Отже, застосування завчасної (за 7–14 діб) інокуляції насіння активними азотостійкими штамми *B. japonicum* B78 та PC07 є доцільним (виправданим) заходом у технологіях вирощування сої. При

Таблиця 6.8 – Симбіотичні властивості та ефективність нових селекціонованих азотостійких штамів *V. japonicum*

Штам-інокулянт	Фаза бутонізації-початку цвітіння			Урожай за повторностями, ц / га				Середній урожай зерна, ц/га		
	Кількість бульбочок, шт./рослину	Маса бульбочок, г/рослину	АФА, мкмоль C ₂ H ₄ / (рослину×год)	I	II	III	IV	ц/га	± до варіанту, %	
									без інокуляції	ДП
Без інокуляції	11,33±0,9	0,07±0,00	1,79±0,18	31,0	33,0	32,0	33,1	32,2±0,05	100	
В78 (ДП)	13,3±1,7	0,149±0,03	6,67±1,5	39,8	34,9	38,4	44,6	39,4±0,20	+ 22,3	100
В78 (за 14 діб)	12,0±1,5	0,169±0,46	7,18±0,50	40,8	35,5	39,8	46,9	40,8±0,23	+ 26,7	+ 3,5
РС07 (ДП)	16,3±1,8	0,190±0,03	6,67±0,32	38,9	39,1	34,1	31,7	35,9±0,18	+ 11,14	100
РС07 (за 14 діб)	16,0±1,2	0,197±0,02	7,66±0,70	34,5	36,4	37,0	35,3	35,8±0,06	+ 11,20	- 0,3

Примітка: ДП – інокуляція насіння сої в день посіву

цьому рекомендовано збільшити інокуляційне навантаження при бактеризації посівного матеріалу.

6.5 Тривалість життєздатності селекціонованих штамів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* на насінні сої, обробленому фунгіцидами, в залежності від терміну його зберігання

Вибір штамів *B. japonicum* PC07 та B78 для визначення їх життєздатності на насінні був обумовлений їх високою симбіотичною активністю, а отже перспективою використання у якості бактеріальної основи біопрепаратів для інокуляції сої з метою підвищення її продуктивності.

Визначення кількості життєздатних клітин ризобій на поверхні насіння проводили через 2 год та 7, 14, 21, 28, 35 діб після його бактеризації, на фоні завчасного протруєння (за 2 год до інокуляції) фунгіцидами Февер та Максим. Контролем слугували варіанти без обробки насіння фунгіцидами, а лише з інокуляцією бульбочковими бактеріями. Бактеріальний титр суспензії, яку використовували для інокуляції (кількість КУО) – $5,0 \times 10^9/1$ мл.

Активні та стійкі до фунгіцидів штами *B. japonicum* PC07 та B78 мають різне походження. Штам PC07 виділений із бульбочок рослин сої сорту Київська 27 (Україна, Черкаська обл., Уманський р-н), а штам B78 отриманий на основі виробничого штаму *B. japonicum* 646 унаслідок застосування транспозонового мутагенезу pSUP5011::Tn5. За результатами лабораторних досліджень обидва штами в чистій культурі були малочутливі до фунгіцидів февер та максим [146], однак унаслідок перебування на обробленому засобами захисту рослин насінні тривалість їх життєздатності виявилась різною.

Через дві год після інокуляції насіння (без обробки фунгіцидами) кількість КУО штамів PC07 та B78 зменшилася відповідно на 18,7% та 14,6%, через 7 діб – на 91,2% та 84,4% і становила відповідно 81,3%, 85,4% та 8,8% та 15,6% від початкової їх кількості. За період з 7 по 14 добу кількість їх зменшилася в

середньому ще на 10% і на 14 добу складала 1,2 та 1,3% від початкової кількості бактерій, які потрапили на насінину (табл. 6.9). Це свідчить про те, що препарати повинні бути з відповідно високим бактеріальним титром, для того, щоб кількість ризобій, яка залишилась життєздатною, була достатньою для оптимального інфікування коренів рослини-хазяїна.

За впливу несприятливих факторів (зокрема засобів захисту рослин (ЗЗР)) ситуація погіршується. Тому дуже важливо селекціонувати штами за стійкістю до найбільш поширених негативних факторів – підвищений рівень мінерального азоту, зниження вологозабезпечення, вплив ЗЗР та ін. Життєздатність ризобій на насінні сої обробленому ЗЗР (Февер та Максим) поступалась бактеріям у контрольних варіантах. На насінні, обробленому Февер+PC07 кількість життєздатних ризобій зменшилася в 1,7, 235,0 та 439 разів відповідно через 2 години, 7 та 14 діб зберігання насіння при кімнатній температурі й становила 59%, 0,42% та 0,23 % від початкової кількості. Наприклад, на 7 добу кількість ризобій штаму PC07 на насінні, обробленому Февер, дорівнювала 200 000 /1 насінину (рис. 6.11, А).

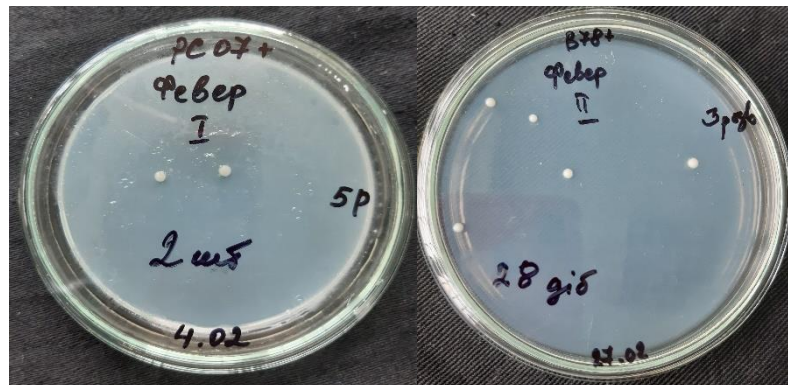
Аналогічна динаміка життєздатності ризобій виявлена на насінні, обробленому Февер+V78. Кількість ризобій з часом зменшилася в 1,6 разів, в 113 разів та в 216 разів відповідно через 2 год, 7 та 14 діб його зберігання і складала 61%, 1,13% та 0,46% від початкової кількості. З'ясовано, що на фоні протруєння насіння фунгіцидами бульбочкові бактерії штаму V78 були більш життєздатними, про що свідчить кількість КУО на насінні на 28 добу зберігання інокульованого насіння (6500 КУО та 5000 КУО відповідно у варіантах V78 та Февер+V78) (рис. 6.11, Б).

На насінні сої, яке було оброблене фунгіцидом Максим, кількість життєздатних ризобій на 14 добу була значно меншою порівняно з іншими варіантами (табл. 6.9) і практично наблизилася до критично нульового значення на 21 та 28 добу зберігання. Незначна кількість ризобій на насінні зафіксована

Таблиця 6.9 – Визначення життєздатності нових штамів *B. japonicum* на поверхні насіння сої обробленого фунгіцидами в залежності від терміну його зберігання

Варіант (бактеризація <i>B. japonicum</i>)	Бактеріальний титр вихідної суспензії	Початкова кількість КУО /на 1 насінині	Термін зберігання інокульованого насіння					
			2 год	доба після інокуляції				
				7	14	21	28	35
Штам аналітичної селекції								
PC07	5,6 × 10 ⁹ /1 мл	59 000 000	48 000 000	5 200 000	690 000	12 000	300	20
Февер +PC07		47 000 000	28 000 000	200 000	107 000	2 000	110	0
Максим+PC07		40 000 000	2 500 000	16 000	900	0	0	0
Штам генетично трансформований (pSUP5011::Tn5)								
B78	5,1 × 10 ⁹ /1 мл	48 000 000	41 000 000	7 500 000	630 000	210 000	6 500	470
Февер+B78		52 000 000	32 000 000	590 000	240 000	10 500	5 000	300
Максим+B78		45 000 000	4 000 000	230 000	1 000	103	0	0

також і в інших варіантах досліду на 28 та 35 добу його зберігання, але вона була недостатня для формування активного сово-ризобіального симбіозу.



А

Б

Рисунок 6.11 – Кількість КУО бульбочкових бактерій на насінні: А – обробка PC07+февер (7 доба зберігання насіння (2×10^5 КУО), Б – обробка B78+февер; 28 доба зберігання насіння сої (5×10^3 КУО)

Враховуючи вихідну концентрацію бактеріальних клітин, яка застосовувалась в наших експериментах і потрапила на насіння внаслідок інокуляції, в результаті забезпечувала на 7 та 14 добу достатню кількість життєздатних клітин у залежності від штаму та використаного фунгіциду.

Зберігання насіння, інокульованого бульбочковими бактеріями на фоні обробки фунгіцидами понад 14 діб є недоцільним, оскільки. призводить до зниження життєздатності та критично малої кількості ризобій. Відтермінування часу посіву такого насіння в ґрунт стане потреба повторної його інокуляції бульбочковими бактеріями.

Збільшення часу зберігання інокульованого на фоні обробки фунгіцидами насінні супроводжується зменшенням їх кількості. З-поміж досліджуваних ризобій більш життєздатними на фоні обробленогоо фунгіцидами насіння сої при його тривалому зберіганні виявились бульбочкові бактерії штаму B78 *B. japonicum*, а PC07 їм дещо поступались. У свою чергу серед протруювачів у даному випадку менш токсичним для ризобій був фунгіцид Февер.

Отримані результати важливі з точки зору перспективності використання селекціонованих різними методами нових штамів *B. japonicum* у якості бактеріальної основи в біологічних препаратах для інокуляції сої та запровадження нових елементів технології їх застосування. Зокрема, пропонується впровадження завчасної бактеризації насіння сої препаратами, виготовленими на основі нових активних конкурентоздатних штамів *B. japonicum* В78, Д87 та РС07.

7 СТВОРИТИ КОМПЛЕКСНІ МІКРОБНІ ПРЕПАРАТИ З НАНОКАРБОКСИЛАТАМИ ТА РОЗРОБИТИ МЕТОДИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ У СУЧАСНИХ АГРОТЕХНОЛОГІЯХ ВИРОЩУВАННЯ СОЇ. РОЗРОБИТИ ЗАХОДИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АЗОТФІКСАЦІЇ У БОБОВИХ

7.1 Вплив нанокарбоксилатів мікроелементів на ріст бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 634б в умовах чистої культури

У результаті проведених досліджень встановлено, що більшість використаних нами нанокарбоксилатів мікроелементів, не залежно від їх концентрації (1:500, 1:1000, 1:5000) та способу стерилізації, проявляли стимулюючий вплив на ріст бактеріальної культури. У таблицях 7.1 і 7.2 зображено результати, що стосуються концентрації 1:1000, яка виявилася оптимальною для вивчення впливу цих речовин на процеси формування та функціонування симбіотичного апарату сої.

Інгібуючий ефект на приріст біомаси клітин *B. japonicum* 634б спостерігали лише за додавання в середовище росту нанокарбоксилату цинку.

Германій при окремій від середовища стерилізації забезпечував найвищі темпи приросту біомаси. При цьому, в спільно стерилізованому ростовому субстраті спостерігали такі ж тенденції, проте показники були нижчими, ніж в окремо автоклавованому середовищі.

Нанокарбоксилат заліза також сприяв кращому росту мікроорганізмів. Суттєвого впливу спільної стерилізації на дію цього мікроелемента на ростові процеси мікроорганізмів у нашому експерименті не було виявлено. Що стосується впливу молібдену на ріст штаму *B. japonicum* 634б, то наявність його у середовищі культивування ризобій сприяла підвищенню даного показника, але ефект від застосування молібдену був слабшим, аніж у нанокарбоксилатів заліза та германію.

Таблиця 7.1 – Відносний приріст біомаси клітин *B. japonicum* 634б за росту культури на середовищі, що містить нанокарбоксилати мікроелементів у концентрації 1:1000 (окремо стерилізоване середовище)

Мікроелемент	Третя доба культивування		Четверта доба культивування	
	концентрація, кл/мл $\times 10^8$	% до контролю	концентрація, кл/мл $\times 10^8$	% до контролю
Контроль	3,99 \pm 0,01	–	6,84 \pm 0,07	–
Mo	4,65 \pm 0,14	+17	8,42 \pm 0,27	+24
V	4,40 \pm 0,31	+10	7,78 \pm 0,4	+14
Zn	2,76 \pm 0,07	–31	4,70 \pm 0,38	–31
Co	4,51 \pm 0,09	+13	8,30 \pm 0,16	+21
Fe	5,43 \pm 0,23	+36	10,55 \pm 0,63	+54
Cu	4,80 \pm 0,05	+20	8,37 \pm 0,63	+22
Ge	5,84 \pm 1,06	+46	9,52 \pm 0,96	+39

Внесення у середовище культивування мікроорганізмів нанокарбоксилатів ванадію, кобальту та міді мало незначний та нестабільний стимулюючий ефект на приріст біомаси *B. japonicum* 634б.

Таким чином, аналіз результатів досліджень дозволив виявити, що найбільш позитивний вплив на наростання біомаси ризобіальних клітин здійснювали нанокарбоксилати заліза, германію та молібдену. Ці сполуки, на нашу думку, є перспективними (при додаванні у середовище культивування бульбочкових бактерій у концентрації 1:1000) для вивчення їх впливу на процеси формування і функціонування бобово-ризобіальних симбіотичних систем. З огляду на отримані результати нами було проведено ряд досліджень у вегетаційних умовах.

Таблиця 7.2 – Відносний приріст біомаси клітин *B. japonicum* 634б за росту культури на середовищі, що містить нанокарбоксилати мікроелементів у концентрації 1:1000 (спільно стерилізоване середовище)

Мікроелемент	Третя доба культивування		Четверта доба культивування	
	концентрація, кл/мл $\times 10^8$	% до контролю	концентрація, кл/мл $\times 10^8$	% до контролю
Контроль	3,99 \pm 0,01	–	6,84 \pm 0,07	–
Mo	4,81 \pm 0,18	+21	8,47 \pm 0,22	+24
V	4,67 \pm 0,09	+17	8,23 \pm 0,12	+20
Zn	2,97 \pm 0,13	–26	5,70 \pm 0,07	–17
Co	4,66 \pm 0,13	+17	8,46 \pm 0,26	+24
Fe	5,40 \pm 0,52	+35	10,55 \pm 0,78	+54
Cu	5,01 \pm 0,01	+26	9,18 \pm 0,50	+34
Ge	4,68 \pm 0,18	+17	8,28 \pm 0,28	+21

7.2 Функціонування симбіотичного апарату рослин сої за дії нанокарбоксилатів Ge, Mo та Fe

Оцінка впливу нанокарбоксилатів заліза, германію та молібдену на азотфіксувальну активність соєво-ризобіальних систем показала, що усі досліджувані нами мікроелементи сприяли підвищенню цього показника у порівнянні із рослинами сої у контрольному варіанті протягом всього вегетаційного періоду (рис. 7.1).

У фазі трьох справжніх листків максимальним зростанням (на 42 %) АФА характеризувались рослини варіанту із застосуванням нанокарбоксилату заліза. Інокуляція ризобіями, вирощеними на середовищі із молібденом та германієм,

спричинила збільшення АФА порівняно із рослинами того ж контролю на 29 та 33 % відповідно.

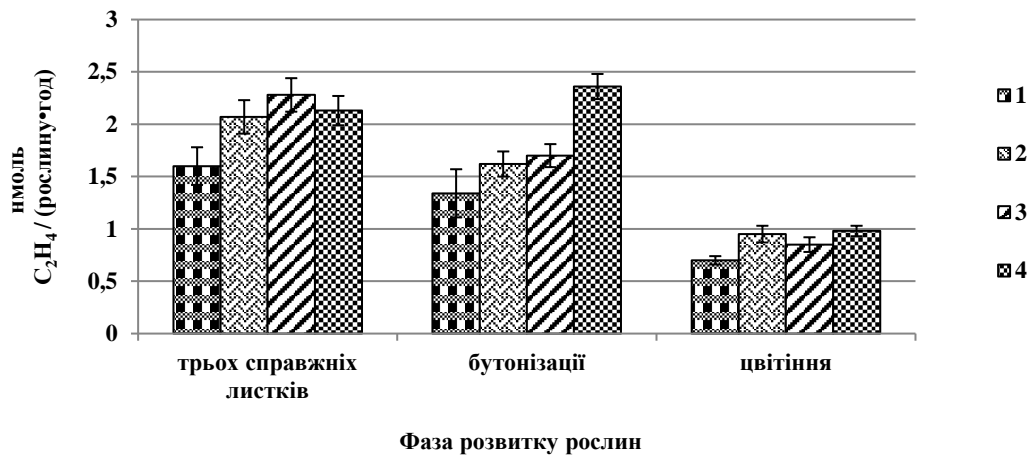


Рисунок 7.1 – Вплив карбоксилатів Mo, Fe, Ge на азотфіксувальну активність (АФА) корневих бульбочок сої, інокульованої штамом *V. japonicum* 634б: 1 – *V. japonicum* 634б (контроль), 2 – *V. japonicum* 634б + Mo, 3 – *V. japonicum* 634б + Fe, 4 – *V. japonicum* 634б + Ge

У фазу цвітіння, у зв'язку з погодними умовами (значне зростання температури повітря), нами зафіксовано різке зниження АФА відносно попередніх фаз розвитку рослин у всіх досліджуваних варіантах. При цьому, навіть за таких стресових умов рослини у варіантах із застосуванням нанокорбоксилатів металів характеризувались вищими показниками АФА відносно рослин контролю. Так, симбіотичні системи, що зазнали впливу нанокорбоксилату молібдену, перевищували контрольні на 36 %, при використанні нанокорбоксилату заліза – 21 % та нанокорбоксилату германію – 40 %. У симбіотичних системах, утворених за участю неактивного штаму ризобій 604к, азотфіксувальна активність була відсутня в усі досліджені фази розвитку рослин сої.

Аналіз нодуляційної активності ризобій активного штаму дозволив виявити, що лише нанокорбоксилат германію стимулював процеси бульбочкоутворення на коренях сої протягом усього вегетаційного періоду. Зокрема, за кількістю та масою сформованих корневих бульбочок рослини цього варіанту перевищували

контрольні (контроль 1) у фазу трьох справжніх листків на 38 та 28 %, у фазу бутонізації – на 50 та 28 %, у фазу цвітіння – на 33 та 14 % відповідно (рис. 7.2).

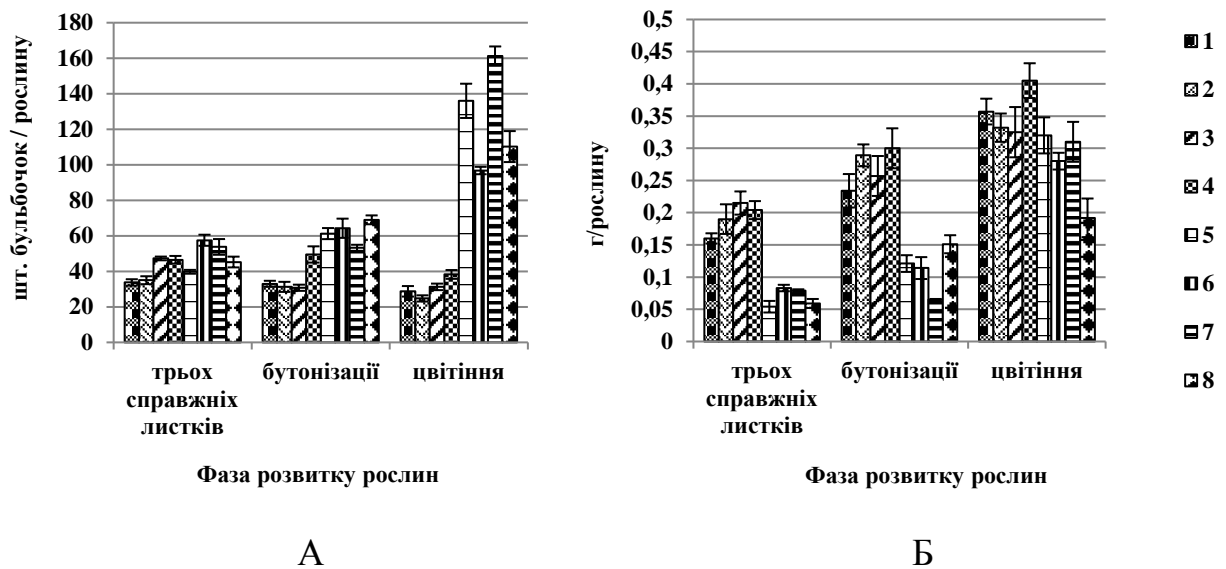


Рисунок 7.2 – Вплив карбоксилатів Мо, Fe, Ge на кількість (А) та масу (Б) корневих бульбочок сої, інокульованої контрастними за активністю штамами *V. japonicum*: 1 – *V. japonicum* 634б (контроль 1), 2 – *V. japonicum* 634б + Мо, 3 – *V. japonicum* 634б + Fe, 4 – *V. japonicum* 634б + Ge, 5 – *V. japonicum* 604к (контроль 2), 6 – *V. japonicum* 604к + Мо, 7 – *V. japonicum* 604к + Fe, 8 – *V. japonicum* 604к + Ge

Наші дослідження показали, що поєднання ризобій із нанокарбоксилатом заліза привело до зростання досліджуваних показників у рослин сої відносно контрольних (контроль 1) лише у фазу трьох справжніх листків, а саме: кількості бульбочок – на 40 % та їх маси – на 34 %. У фазах бутонізації та цвітіння нодуляційна активність ризобій була на рівні рослин у контрольному варіанті 1. Що стосується рослин, насіння яких інокулювали *V. japonicum* 634б, вирощеними на середовищі із додаванням нанокарбоксилату молібдену, то всі зміни кількості та маси корневих бульбочок були в межах похибки за винятком маси бульбочок у фазу бутонізації, яка зросла на 24 % порівняно із рослинами контролю 1.

Оцінка нодуляційної активності ризобій неактивного штаму 604к показала, що використання нанокарбоксилату молібдену підвищувало кількість (45 %) та масу

(54 %) корневих бульбочок у рослин сої порівняно із рослинами контролю 2 у фазу трьох справжніх листків і не впливало на ці показники у фазу бутонізації (рис. 7.2). Тоді як у фазу цвітіння ці сполуки викликали зниження кількості бульбочок на 29 % у порівнянні із рослинами того ж контролю.

Застосування нанокарбоксилату заліза приводило до збільшення кількості та маси корневих бульбочок у фазу трьох справжніх листків у порівнянні з рослинами сої контролю 2 на 35 і 46 % відповідно. У фазу бутонізації у рослин цього варіанту зафіксовано зниження кількості (13 %) та маси (46 %) бульбочок відносно того ж контролю. Також виявлено зростання кількості бульбочок (на 19 %) у фазу цвітіння.

Нанокарбоксилат германію у фазу цвітіння сприяв підвищенню кількості бульбочок на 12 % у порівнянні із контролем 2. У фазу бутонізації зростала і кількість і маса корневих бульбочок відносно того ж контролю на 13 та 25 % відповідно. У період цвітіння зафіксовано зниження кількості бульбочок на 19 %.

Отже, нами встановлено, що використання нанокарбоксилату Ge у комплексі із бульбочковими бактеріями штаму *B. japonicum* 634б сприяє збільшенню утворених на коренях сої бульбочок до 50 % порівняно із інокуляцією без мікроелементів та приводить до максимального серед усіх досліджуваних мікроелементів зростання АФА.

7.3 Інтенсивність фотосинтезу листків сої на фоні застосування нанокарбоксилатів металів та інокуляції ризобіями

При дослідженні фотосинтетичної активності у листках сої сорту Васильківська, інокульованої ризобіями контрастних за активністю штамів, що зазнали впливу нанокарбоксилатів металів, встановлено наступне (рис. 7.3). У фазу трьох справжніх листків інокуляція ризобіями активного штаму, вирощеними із нанокарбоксилатом молібдену, привела до стимуляції фотосинтетичної активності

рослин сої та спричинила зростання даного показника на 22 % відносно контролю 1 (К 1). Застосування нанокарбоксилату Ge як компонента середовища вирощування бульбочкових бактерій дозволило збільшити інтенсивність фотосинтезу в листках сої на 37 % порівняно із тим же контролем. Що стосується варіанту із використанням нанокарбоксилату Fe, то фотосинтетична активність даних рослин була на рівні контрольного варіанту 1.

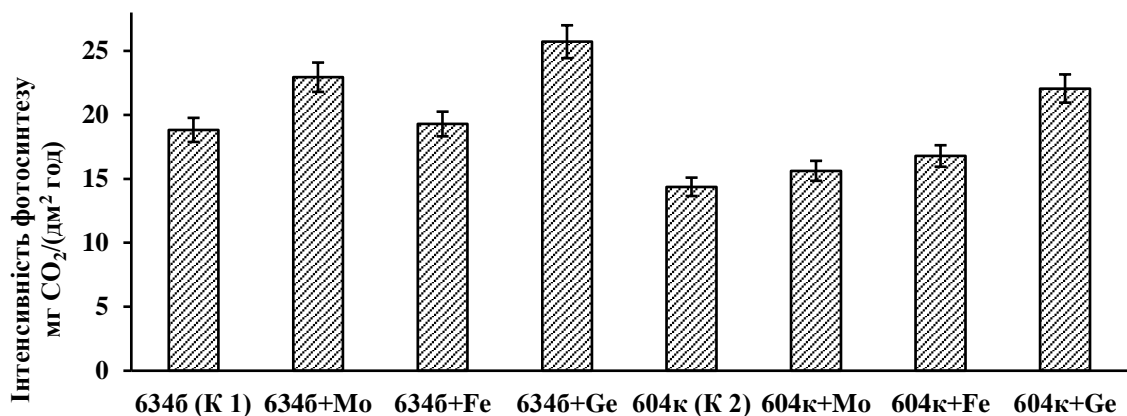


Рисунок 7.3 – Вплив нанокарбоксилатів металів на інтенсивність фотосинтезу в листках сої, інокульованої *V. japonicum* 634б та 604к (фаза трьох справжніх листків)

У варіантах із інокуляцією насіння неактивним штамом ризобій інтенсивність фотосинтезу була значно нижчою від рослин, насіння яких було проінокульоване активним штамом бульбочкових бактерій (див. рис. 7.3). Виняток становив варіант із застосуванням нанокарбоксилату Ge, який за даним показником перевищував не лише контроль 2 (К 2) (на 53 %), а і контроль 1. Нанокарбоксилати Mo й Fe також приводили до підвищення фотосинтетичної активності рослин, проте, лише відносно контролю 2 на 8 та 17 % відповідно.

Використання нанокарбоксилатів Mo, Fe, Ge як компонентів поживного середовища для ризобій сприяло активізації інтенсивності фотосинтезу в листках сої і у фазу бутонізації (рис. 7.4). Зокрема, інокуляція бактеріями, вирощеними із нанокарбоксилатом Mo, підвищувала даний показник на 20 % відносно контролю 1

(інокуляція активним штамом) та на 37 % відносно контролю 2 (інокуляція неактивним штамом).

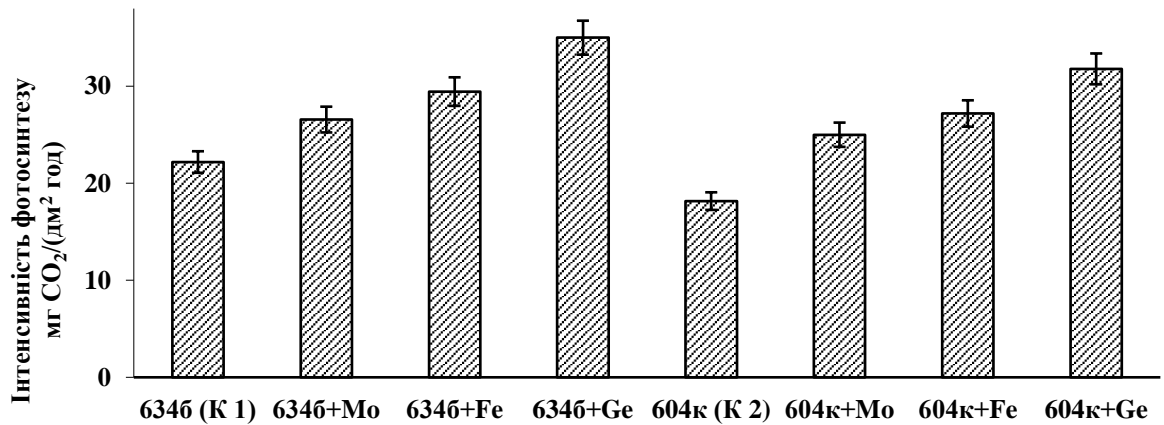


Рисунок 7.4 – Вплив нанокарбоксилатів металів на інтенсивність фотосинтезу в листках сої, інокульованої *B. japonicum* 634б та 604к (фаза бутонізації)

У рослин, що зазнали впливу нанокарбоксилату Fe, фотосинтетична активність зростала на 32 % порівняно із рослинами контрольного варіанту 1 (К 1) (інокуляція активним штамом) та 49 % порівняно із рослинами контрольного варіанту 2 (К 2) (інокуляція неактивним штамом) (див. рис. 7.4). Максимальні показники інтенсивності фотосинтезу були у рослин, насіння яких інокульовали ризобіями із нанокарбоксилатом Ge. Так, комбінація активного штаму із германієм збільшувала досліджуваний показник відносно контролю 1 на 58 %, а неактивного штаму – на 75 % відносно контролю 2.

Наші дослідження показали, що інокуляція насіння сої ризобіями, вирощеними на середовищі із нанокарбоксилатами металів, здійснювала значний вплив на інтенсивність фотосинтезу у листках сої. Відзначено, що максимально стимулюючий ефект на досліджуваний процес здійснюють комплекси ризобій із нанокарбоксилатом Ge. Встановлено, що фотосинтетична активність у сої за впливу нанокарбоксилатів Ge зростала на 75% у порівнянні із рослинами, інокульованими стандартним штамом.

7.4 Вивчення впливу комплексів найбільш ефективних нанокарбоксилатів мікроелементів на формування та функціонування симбіотичного апарату та продуктивність сої

Аналіз результатів наших досліджень дозволив виявити позитивний вплив сумішей нанокарбоксилатів металів на азотфіксувальну активність симбіотичних систем сої (табл. 7.3). Встановлено, що найбільший стимулюючий ефект чинив комплекс із нанокарбоксилатів Ge та Mo. АФА у симбіотичних системах даного варіанту перевищувала контрольні рослини на 64 % – у фазу трьох справжніх листків, 51 % – у фазу бутонізації та на 23 % – у фазу цвітіння.

Таблиця 7.3 – Азотфіксувальна активність (мкмоль C_2H_4 /(рослину×год)) симбіотичних систем *Glycine max* – *V. japonicum* 634б за впливу комплексів нанокарбоксилатів Ge, Mo, Fe

Варіант	Фаза розвитку рослин		
	трьох справжніх листоків	бутонізації	цвітіння
<i>V. japonicum</i> 634б	4,29±0,32	3,38±0,52	17,08±0,65
<i>V. japonicum</i> 634б+Ge	5,30±0,44	4,68±0,14	16,67±1,01
<i>V. japonicum</i> 634б+Ge+Mo	7,02±0,61	5,12±0,21	21,02±1,99
<i>V. japonicum</i> 634б+Ge+Fe	5,22±0,35	3,87±0,42	17,02±1,84

Нанокарбоксилат Ge як компонент бактеріальної суспензії виявився менш ефективними, але також стимулював бобово-ризобіальний симбіотичний апарат і приводив до підвищення АФА відносно контрольного варіанту на 23 та 38 % у фази трьох справжніх листків та бутонізації відповідно. У фазу цвітіння відзначено несуттєве зниження активності симбіотичного апарату рослин сої цього ж варіанту в порівнянні із контролем. Комплекс із нанокарбоксилатів Ge

та Fe збільшував АФА симбіотичних систем у фазу трьох справжніх листків на 22 %, у фазу бутонізації зафіксовано лише тенденцію до зростання цього показника.

Не менш важливим показником ефективного симбіозу є нодуляційна активність ризобій. У процесі досліджень встановлено, що комплекс із нанокарбоксилатів Ge та Mo здійснював найбільшу позитивну дію і у даному випадку (табл. 7.4 і 7.5). Так, у фазу трьох справжніх листків за кількістю

Таблиця 7.4 – Вплив комплексів нанокарбоксилатів Ge, Mo, Fe на кількість (шт. бульбочок / рослину) корневих бульбочок сої, утворених штамом *V. jarrowii* 6346

Варіант	Фаза розвитку рослин		
	трьох справжніх листоків	бутонізації	цвітіння
<i>V. jarrowii</i> 6346	26,5±1,07	27,7±1,04	34,2±1,57
<i>V. jarrowii</i> 6346+Ge	29,0±1,43	30,7±1,34	37,5±1,09
<i>V. jarrowii</i> 6346+Ge+Mo	26,5±2,72	34,5±1,82	40,5±2,73
<i>V. jarrowii</i> 6346+Ge+Fe	27,5±2,69	24,0±1,41	20,2±2,63

корневих бульбочок рослини даного варіанту не відрізнялись від контрольних, але перевищували їх на 60 % за масою. У фазу бутонізації за впливу цього комплексу мікроелементів відбулося зростання як кількості, так і маси бульбочок відповідно на 24 та 20 % у порівнянні із контрольними рослинами, а у фазу цвітіння – на 18 та 27 %.

Додавання чистого нанокарбоксилату Ge у ризобіальну суспензію, хоч і меншою мірою, але стимулювало процес бульбочкоутворення і приводило до формування більшої кількості корневих бульбочок протягом усіх досліджуваних фаз розвитку. Зокрема, у фазу трьох справжніх листків рослини

даного варіанту перевищували за цим показником контрольні на 9 %, у фазу бутонізації – на 11 %, а у фазу цвітіння – на 10 %. При цьому, маса бульбочок залишалась на рівні контролю. Слід зауважити, що за впливу чистого нанокарбоксилату Ge та нанокарбоксилату Ge в комплексі із Mo наростання кількості корневих бульбочок відбувалося протягом усього вегетаційного періоду рослин сої.

Таблиця 7.5 – Вплив комплексів нанокарбоксилатів Ge, Mo, Fe на масу (г / рослину) корневих бульбочок сої, утворених штамом *V. japonicum* 6346

Варіант	Фаза розвитку рослин		
	трьох справжніх листіків	бутонізації	цвітіння
<i>V. japonicum</i> 6346	0,15±0,02	0,30±0,02	0,59±0,01
<i>V. japonicum</i> 6346+Ge	0,16±0,04	0,35±0,03	0,59±0,07
<i>V. japonicum</i> 6346+Ge+Mo	0,24±0,01	0,36±0,02	0,75±0,01
<i>V. japonicum</i> 6346+Ge+Fe	0,16±0,05	0,34±0,01	0,59±0,02

Нами відзначено, що симбіотичні системи, які зазнали впливу комплексу нанокарбоксилатів Ge та Fe, характеризувалися меншою кількістю бульбочок, але при цьому вони були більших розмірів. Так, у фазу бутонізації та цвітіння на коренях рослин даного варіанту кількість бульбочок була на 14 та 41 % нижчою відносно контрольних, при цьому їх маса не змінювалась.

Аналіз насінневої продуктивності показав, що додавання до середовища вирощування ризобій комплексу карбоксилатів Ge і Fe викликало максимальне (на 13 %) із усіх досліджуваних варіантах зростання урожаю рослин сої відносно контролю (табл 7.6). В інших досліджуваних варіанти також фіксували досить високу прибавку урожаю у порівнянні із контролем (Ge – 9 %, Ge+Mo – 10 %).

Таблиця 7.6 – Урожай насіння сої за впливу комплексів нанокарбоксилатів Ge, Mo, Fe

Варіант	г/рослину	Приріст до контролю
<i>B. japonicum</i> 6346	4,40±0,12	
<i>B. japonicum</i> 6346+Ge	4,82±0,08	+ 9
<i>B. japonicum</i> 6346+Ge+Mo	4,86±0,11	+ 10
<i>B. japonicum</i> 6346+Ge+Fe	4,99±0,04	+ 13

Отже, у контрольованих умовах вегетаційних дослідів нами підтверджено позитивну дію нанокарбоксилату германію на формування та функціонування симбіотичного апарату сої, при цьому максимально ефективними були комплекси даного елемента із нанокарбоксилатами молібдену. Зокрема, поєднання карбоксилатів Ge і Mo підвищувало нодуляційну активність ризобій та азотфіксувальну активність симбіотичного апарату сої. Проте сумісне застосування нанокарбоксилатів германію та феруму хоча й меншою мірою активізувало АФА симбіотичних систем, але забезпечувало максимальне зростання урожаю рослин сої.

У результаті наших досліджень виявлено, що суміш нанокарбоксилатів германію та феруму в комплексі з активними штамми *B. japonicum* у співвідношенні 1:1:1000 дозволяють забезпечувати рослини додатковими елементами живлення, формуючи ефективні рослинно-мікробні системи, і дають змогу повною мірою реалізувати генетичний потенціал сучасних сортів сої.

Таким чином, на основі отриманих результатів досліджень цю суміш нанокарбоксилатів металів нами було обрано для модифікації препарату «Ризостим».

7.5 Перевірка в польових умовах ефективності препарату за його довготривалого зберігання

Відомо, що термін зберігання препарату має виключно важливе значення для виробників сільськогосподарської продукції, тому одним із етапів наших досліджень була перевірка впливу довготривалого зберігання на титр ризобій у готовому модифікованому препараті (табл. 7.7).

Таблиця 7.7 – Вплив довготривалого зберігання на титр ризобій ($\text{КУО} \times 10^9$) у виготовлених препаратах

Варіант	Титр ризобій		
	у день приготування препарату	після довготривалого зберігання препарату	
		30 діб	45 діб
Контроль («Ризостим»)	4,5±0,1	5,2±0,3	4,2±0,4
«Ризостим» модифікований	4,7±0,2	5,7±0,1	5,0±0,1

Так, на 30 добу зберігання зафіксовано тенденцію до збільшення титру ризобіальних клітин як у стандартному, так і модифікованому добриві. Слід зауважити, що модифікований препарат характеризувався інтенсивнішим наростанням біомаси клітин у порівнянні з контролем.

Подальше збереження препаратів до 45 діб призвело до незначного зниження титру ризобій у обох досліджуваних варіантах. При цьому в модифікованому препараті такий ефект був менш вираженим і кількість мікроорганізмів утримувалася на рівні титру ризобій у день його приготування, що доводить доцільність використання нанокарбоксилатів германію та заліза як біологічно активних добавок, які сприяють наростанню біомаси ризобій та довшому терміну зберігання їх титру.

Наступним етапом було дослідження впливу довготривалого зберігання комбінованих препаратів на симбіотичні властивості бульбочкових бактерій та урожайність рослин. Як видно з табл. 7.8, показники кількості, маси бульбочок та їх азотфіксувальної активності у фазу бутонізації за умов обробки свіжовиготовленим комбінованим препаратом були найвищими.

Таблиця 7.8 – Вплив комбінованих бактеріальних препаратів на формування і функціонування симбіотичного апарату сої сорту Алмаз (польовий дослід)

Варіант	Кількість бульбочок, шт./рослину	Маса бульбочок, г/рослину	АФА, нмоль C ₂ H ₄ /(рослину × год)
Фаза бутонізації			
Свіжовиготовлений (стандартний) препарат	4,60±1,34	0,12±0,01	1,52±0,29
Свіжовиготовлений модифікований препарат	9,11±1,21	0,21±0,01	2,63±0,21
Модифікований препарат після довготривалого зберігання	6,52±1,48	0,16±0,01	1,57±0,18
Фаза цвітіння			
Свіжовиготовлений (стандартний) препарат	9,8±1,89	0,49±0,07	2,05±0,23
Свіжовиготовлений модифікований препарат	10,25±1,64	0,56±0,04	2,44±0,21
Модифікований препарат після довготривалого зберігання	9,63±2,09	0,42±0,06	1,92±0,16

Інокуляція насіння сої свіжовиготовленим (стандартним) та комбінованим препаратами після довготривалого зберігання однаково впливала на процес

нодуляції та інтенсивність азотфіксації. У фазу цвітіння рослин зберігалася така ж тенденція, лише азотфіксувальна активність та кількість і маса бульбочок рослин, оброблених модифікованим препаратом після довготривалого зберігання, знижувалась у порівнянні з варіантом інокуляції насіння свіжовиготовленим (стандартним) препаратом. Але варто зауважити, що дана різниця була в межах похибки і становила лише близько 6 %.

Оскільки соя, в першу чергу, зернова культура, то головним показником її продуктивності є урожай насіння. У нашому дослідженні було показано, що величина цього параметра практично не залежала від тривалості періоду зберігання насіння, завчасно інокульованого препаратами (табл. 7.9). Аналіз урожаю показав, що ефективність різних форм препаратів за умов передпосівної обробки є практично однаковою. Дещо вищим був урожай за використання свіжовиготовленого модифікованого препарату, проте ця прибавка виявилась у межах похибки дослідження.

Таблиця 7.9 – Вплив комбінованих бактеріальних препаратів на урожай зерна сої сорту Алмаз (польовий дослід)

Варіант	Урожай, ц/га
Свіжовиготовлений (стандартний) препарат	33,6±0,5
Свіжовиготовлений модифікований препарат	34,9±0,4
Модифікований препарат після довготривалого зберігання	33,2±0,5

Так, нами було показано, що, не зважаючи на тривале зберігання, як стандартний, так і модифікований, біопрепарат «Ризостим» залишається ефективним для передпосівної інокуляції насіння сої та забезпечує формування потужного симбіотичного апарату у дослідних рослин.

7.6 Дія фунгіцидів за різних способів їх застосування на формування та функціонування симбіозу сої зі стійкими у чистій культурі до пестицидів ризобіями

Встановлення симбіотичних зв'язків між бобовими рослинами та бульбочковими бактеріями ініціює утворення корневих бульбочок, де і відбувається зв'язування молекулярного азоту. У процес утворення і функціонування бульбочок включаються численні реакції рослини. Проте, одним із факторів впливу на формування симбіотичного апарату є вплив хімічних засобів захисту рослин, які застосовують при вирощуванні сої [132, 137, 140].

У результаті проведення вегетаційних дослідів, у яких здійснювали протруєння насіння препаратами фунгіцидної дії та обприскування рослин по вегетації для захисту від збудників хвороб на фоні інокуляції насіння ризобіями, що проявили стійкість у чистій культурі до дії пестицидів, було встановлено, що бульбочки на коренях сої сорту Алмаз утворювалися на рослинах усіх варіантів, проте їх кількість та маса суттєво відрізнялися залежно від впливу діючих речовин препаратів (рис. 7.5 і 7.6; табл. 7.10).

Згідно отриманих результатів, не залежно від використаного для інокуляції штаму ризобій, найменшу кількість і масу бульбочок упродовж вегетації сої відзначали за дії Феверу. При формуванні симбіозу між рослинами сої сорту Алмаз та бактеріями *B. japonicum* PC07 кількість бульбочок за дії Феверу була меншою порівняно з контролем на 24,6% (фаза трьох справжніх листків), 30,2 % (бутонізація-початок цвітіння) та 28,3% (утворення бобів); у варіанті з інокуляцією насіння сої Tn5-мутантом В78 токсичний вплив даного препарату спричинив зменшення кількості бульбочок на 40,8, 34,6 та 28,0% відповідно.

Фунгіцидний протруйник Стандак Топ чинив менш виражений токсичний вплив на формування бобово-ризобіального симбіозу порівняно з Февером. Однак, у варіанті з протруєнням Стандак Топ та бактеризацією насіння сої



Рисунок 7.5 – Бульбочки на коренях сої сорту Алмаз, інокульованої *B. japonicum* PC07, за обробки насіння протруйниками Максим XL, Стандак Топ і Февер (фаза трьох справжніх листків)



Рисунок 7.6 – Бульбочки на коренях сої сорту Алмаз, інокульованої транспозоновим мутантом B78, за обробки насіння протруйниками Максим XL, Стандак Топ і Февер (фаза трьох справжніх листків)

B. japonicum PC07 у фазу трьох справжніх листків кількість бульбочок на коренях була на рівні контрольних рослин, але їх маса була меншою на 12,7%. У варіанті з бактеризацією насіння сої транспозоновим мутантом B78 дія

протруйника Стандак Топ також спричинювала зменшення кількості та маси корневих бульбочок у досліді на початкових етапах формування симбіотичних систем (табл. 7.10).

Таблиця 7.10 – Кількість і маса бульбочок на рослинах сої сорту Алмаз за обробки фунгіцидами та інокуляції *B. japonicum* PC07 і B78

Варіант	Фаза розвитку рослин					
	трьох справжніх листків		бутонізації – початку цвітіння		утворення бобів	
	кількість, шт.	маса, г	кількість, шт.	маса, г	кількість, шт.	маса, г
Обробка насіння						
PC07	17,3± 0,96	0,157± 0,009	26,50± 2,08	0,171± 0,010	21,3± 1,50	0,248± 0,010
Максим XL + PC07	23,3± 1,71	0,148± 0,010	26,0 ± 1,63	0,343± 0,020	30,3± 2,06	0,693± 0,050
Стандак Топ + PC07	17,8± 1,41	0,137± 0,007	21,8± 1,89	0,214± 0,014	24,8± 1,71	0,330± 0,023
Февер + PC07	13,0± 0,96	0,119± 0,004	18,5± 1,29	0,153± 0,010	15,3± 0,96	0,193± 0,013
B78	21,0± 1,0	0,177± 0,007	26,0± 2,0	0,195± 0,015	25,0± 1,41	0,363± 0,024
Максим XL + B78	19,5± 1,3	0,116± 0,010	25,0± 2,0	0,230± 0,016	40,0± 2,5	0,830± 0,042
Стандак Топ + B78	17,0± 0,9	0,143± 0,007	22,0± 1,0	0,303± 0,017	31,0± 2,0	0,413± 0,021
Февер + B78	12,5± 1,0	0,084± 0,006	17,0± 1,0	0,179± 0,012	18,0± 1,0	0,233± 0,017
Обприскування рослин по вегетації						
PC07 + Аканто Плюс	Не досліджували		27,8± 1,89	0,209± 0,010	25,5± 1,41	0,303± 0,017
B78 + Аканто Плюс			25,5± 1,91	0,220± 0,013	29,8± 2,2	0,40± 0,028

У варіанті з протруюванням Стандак Топ та бактеризацією насіння сої *B. japonicum* PC09 у фазу трьох справжніх листків кількість бульбочок на

коренях була на 11,9% меншою порівняно з контролем, але їх маса була більшою на 10,3%. У подальшому протягом вегетації відзначено перевищення кількості корневих бульбочок за дії Стандак Топ порівняно з показниками контрольних рослин на 7,1 % у фазу бутонізація-початок цвітіння та на 64,4 % у фазу утворення бобів.

У варіанті з бактеризацією насіння сої транспозоновим мутантом В144 дія протруйника Стандак Топ не спричинювала зменшення кількості та маси корневих бульбочок.

Профілактичне обприскування вегетуючих рослин сої препаратом Аканто Плюс здійснювали, коли симбіотичні системи були уже сформовані, тому негативного впливу на нодуляційні процеси не відзначено. У фазу бутонізації-початку цвітіння кількість бульбочок за обробки фунгіцидом була на рівні контрольних рослин, а за масою дещо перевищувала їх.

У результаті аналізу азотфіксувальної активності сформованих симбіотичних систем встановлено зниження рівня асиміляції N_2 у фазу трьох справжніх листків за комбінованого застосування протруйників насіння та бульбочкових бактерій *V. japonicum* РС07 і В78, відносно варіантів тільки з інокуляцією. Однак, протягом вегетаційного періоду негативний вплив включених у дослідження препаратів фунгіцидної дії на функціонування бобово-ризобіальних симбіозів знижувався (рис. 7.7 і 7.8).

У варіантах із застосуванням профілактичного обприскування рослин від збудників хвороб препаратом Аканто Плюс АФА у період бутонізації-початок цвітіння була на рівні контрольних рослин, проте у кінці вегетації на 12,9 та 21,1% перевищувала їх.

Відзначено істотне зниження показника АФА порівняно з контролем у фазу трьох справжніх листків на фоні бактеризації *V. japonicum* РС09 та В144 у варіантах із обробкою Февером. У фазу бутонізації-початку цвітіння на фоні інокуляції бульбочковими бактеріями РС09 та В144 вищими порівняно з контролем були значення АФА за дії Стандак Топ; за впливу діючих речовин Феверу зниження даних показників становило 15,6 та 11,4% відповідно. У

варіанті з бактеризацією В144 найвищий рівень АФА відзначено на фоні застосування Стандак Топ (табл. 7.11).

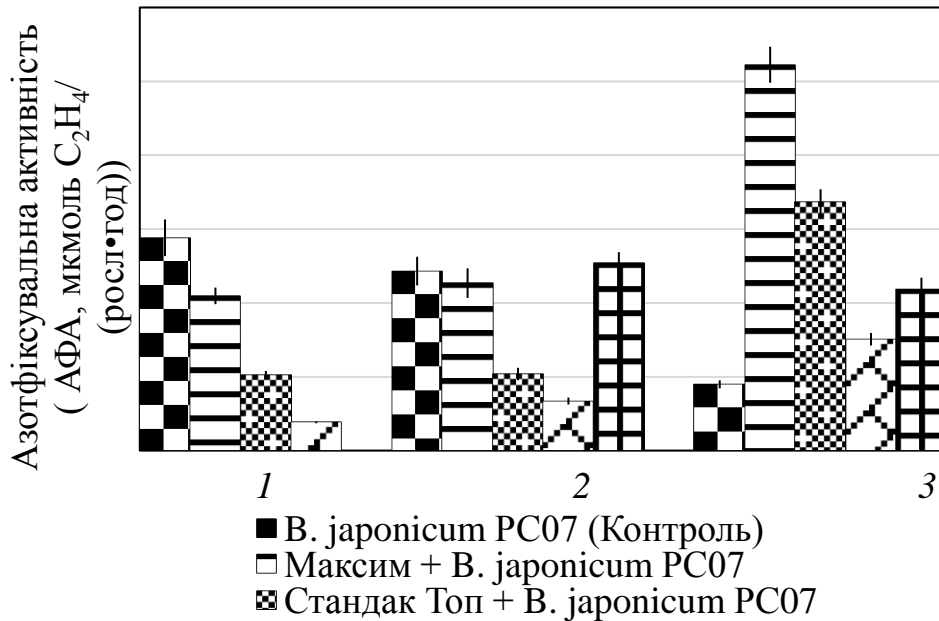


Рисунок 7.7 – Азотфіксувальна активність рослин сої, вирощеної за дії фунгіцидів та інокуляції *B. japonicum* PC07, у фази: 1 – трьох справжніх листків, 2 – бутонізації-початку цвітіння, 3 – утворення бобів

Зниження активності симбіотичного апарату вже у фазі утворення бобів можна пояснити тим, що в цей період уповільнюється процес фотосинтезу та притік поживних речовин до кореневої системи. У бобах накопичуються пластичні речовини, при цьому в самій рослині міститься значний запас азоту і вільних амінокислот, які в подальшому при необхідності можуть реутилізуватися у боби.

З літератури відомо, що одним із механізмів негативного впливу фунгіцидів на бобово-ризобіальний симбіоз є інгібування продукування рослинами фітоестрогенів, які виступають атрактантами для ризобій, що має важливе значення для приваблювання бактерій.

Fox et al. [175] перевірили, чи дійсно фунгіциди перешкоджають фітоестрогеновій сигнальній системі, яка регулює симбіоз бобових рослин і

ризобій. Ними було виявлено, що 45 з 62 фунгіцидів інгібують флавоноїдний NodD рецептор, а також активацію генів бульбочкоутворення під час симбіотичного процесу. Інший шлях, яким фунгіциди опосередковано інгібують життєдіяльність ризобій, – це зниження синтезу фітогормонів і сидерофорів.

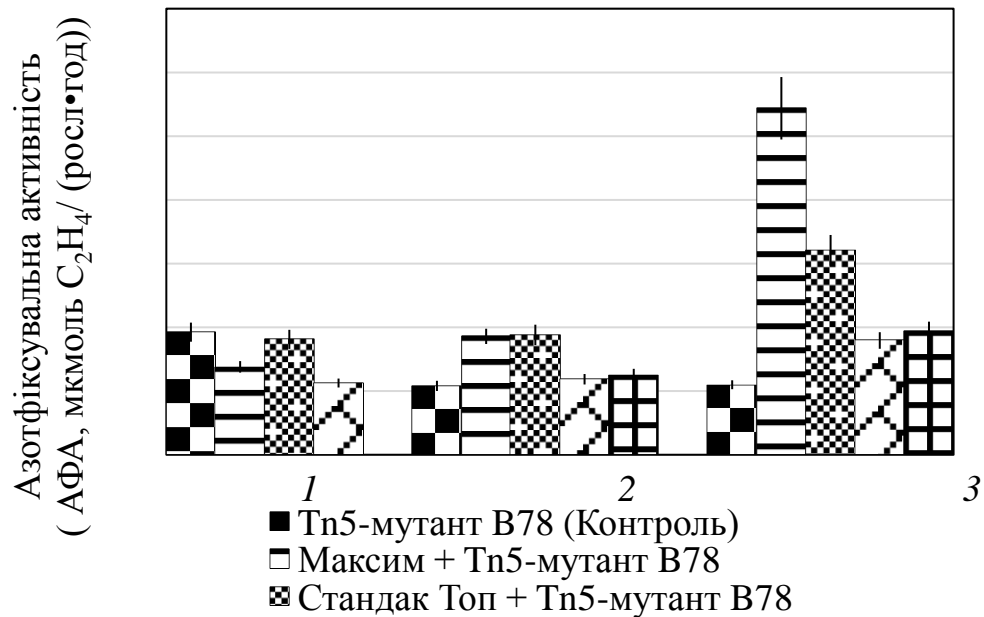


Рисунок 7.8 – Азотфіксувальна активність рослин сої, вирощеної за дії фунгіцидів та інокуляції Tn5-мутантом В78, у фази: 1 – трьох справжніх листків, 2 – бутонізації-початку цвітіння, 3 – утворення бобів

У роботі Pudelko et al. [176] показано зниження нодуляційного процесу за обробки насіння сої фунгіцидом Фунабен Т (148 г/л карбендазин + 332 г/л тирам) з подальшою інокуляцією. Кількість бульбочок зменшувалась на 31,5 і 45,7% залежно від того, який штам використовували для інокуляції насіння – *B. japonicum* USDA 110 чи *B. japonicum* USDA 123 відповідно. Guene et al. [177] також звертають увагу на те, що вплив обробки насіння квасолі фунгіцидами на бульбочкоутворення залежить від штаму ризобій, яким інокульоване насіння. Наведені дані підтверджують думку про можливість підбору таких композицій фунгіциду і ризобій, за яких нітрогеназна активність не зменшується.

Таблиця 7.11 – Азотфіксувальна активність (мкмоль C_2H_4 / (рослину×год)) рослин сої, вирощеної за дії фунгіцидів та інокуляції *B. japonicum* PC09 та B144

Варіант	Штам-інокулянт	Фаза розвитку рослин		
		трьох справжніх листків	бутонізації – початку цвітіння	утворення бобів
Контроль	PC09	2,64±0,13	4,24±0,20	3,38±0,13
Стандак Топ		3,30±0,15	6,70±0,31	4,81±0,20
Февер		2,00±0,06	3,58±0,16	5,92±0,27
Контроль	B144	3,05±0,11	3,60±0,20	2,92±0,12
Стандак Топ		3,24±0,09	4,05±0,19	3,74±0,16
Февер		1,61±0,07	3,19±0,13	2,32±0,09

7.7 Вплив інокуляції насіння сої стійкими до фунгіцидів ризобіями на ріст і розвиток рослин на фоні застосування протруйників

У результаті проведених досліджень встановлено зменшення величини показників наростання надземної маси рослин сої сорту Алмаз при застосуванні протруйників Стандак Топ і Февер. Так, у варіанті з бактеризацією аналітично селекціонованим штамом *B. japonicum* PC07 та протруйником Стандак Топ зниження показника маси надземної частини рослин порівняно з контролем становило: 11,3% у фазу трьох листків, 19% у фазу бутонізації-початку цвітіння та 13,2% у фазу утворення бобів. У варіанті з бактеризацією транспозоновим мутантом B78 за обробки насіння Стандак Топ вегетативна маса рослин також була меншою порівняно з контролем за даними трьох відборів на 6,7–11,9%. У досліді внаслідок впливу на насіння сої протіоконазолу, що є діючою речовиною Феверу, відзначено зниження показника наростання вегетативної маси рослин у варіантах з інокуляцією *B. japonicum* PC07 та PC09 на 13,1 та 15,0% (фаза трьох справжніх листків), 27,1 та 14,0% (бутонізація-початок цвітіння) та 12,7 і 6%

(утворення бобів); у варіанті з інокуляцією мутантом В78 зниження даного показника відносно контролю становило 14,2; 12,9 та 17,3% відповідно.

При застосуванні для інокуляції насіння сої стійких до фунгіцидів штамів бульбочкових бактерій та протруюванні препаратом Максим ХЛ відзначено стимулювальний ефект на ріст рослин протягом вегетації, про що свідчать вищі, порівняно з контролем та отриманими при обробці іншими препаратами, значення вегетативної маси рослин. Обробка рослин у фазі бутонізації фунгіцидом Аканто Плюс істотно не впливала на розвиток надземної маси рослин сої.

У варіанті з бактеризацією аналітично селекціонованим штамом *B. japonicum* РС09 та препаратом Стандак Топ зниження показника маси надземної частини рослин порівняно з контролем становило 5,5% у фазу трьох справжніх листків та 6,9% у фазу утворення бобів. У варіанті з бактеризацією транспозоновим мутантом В144 за обробки насіння Стандак Топ відмічено, що вегетативна маса рослин також була меншою порівняно з контролем за даними двох відборів на 2,5–7,6%.

Встановлено відмінності у дії протруйників на формування кореневої системи сої у досліді. Найбільш виражений токсичний вплив, внаслідок якого відзначено зниження маси коренів у фазах трьох листків та бутонізації-початку цвітіння, мав препарат Февер. Так, маса коренів на фоні інокуляції *B. japonicum* РС07 була меншою на 21,3–16,2% порівняно з контролем; на фоні бактеризації Тп5-мутантом В78 – на 22,4–10,5% відповідно. За дії вказаного препарату маса коренів на фоні інокуляції *B. japonicum* РС09 була меншою на 38,6–17,1% порівняно з контролем; на фоні бактеризації Тп5-мутантом В144 – на 31,4–29,1% відповідно.

За інформацією виробника фунгіциду Аканто Плюс, його профілактичне застосування захищає рослини від комплексу мікозів, спричинених численними некротрофами, які швидко уражують та знищують клітини, утворюючи плямистості. Складові препарату забезпечують уповільнення процесу утворення етилену для запобігання старінню рослин, захищаючи верхній та середній яруси

листіків. У нашому досліді після обприскування вегетуючих рослин фунгіцидом було відзначено через кілька діб інтенсивніше зелене забарвлення сої, яке зберігалось тривалий час, внаслідок чого ці варіанти візуально вирізнялися.

Висунуто припущення про те, що ефекти від застосування триазолів проявляються у вигляді інгібування біосинтезу етилену, внаслідок чого уповільнюється старіння листків сої та ріпаку, що відбувається внаслідок змін гормонального балансу в клітинах і підтверджується збільшенням вмісту цитокінінів і зниженням рівнів абсцисової кислоти та етилену [178].

Відомо, що одним з критеріїв екоотоксикологічної оцінки препаратів для вибору оптимального варіанту захисту культури від комплексу шкідників є швидкість їх детоксикації в агроценозі. Під впливом абіотичних і біотичних факторів відбувається детоксикація пестицидів, яку розглядають як процес зменшення початкового токсичного потенціалу (вмісту) за рахунок процесів їх трансформації і транслокації [179]. Тобто, зменшення токсичного потенціалу препаратів і відсутність їх негативного впливу, в тому числі і на окремі морфометричні параметри рослин, може бути пов'язане з детоксикацією діючих речовин у кінці вегетації.

7.8 Продуктивність рослин сої за обробки насіння препаратами фунгіцидної дії та інокуляції резистентними до пестицидів бульбочковими бактеріями

Урожайність сої є основним показником ефективності застосованих при вирощуванні рослин технологічних прийомів. У результаті проведених досліджень встановлено, що комплексна дія протруйника Максим XL та інокуляції стійкими в чистій культурі до пестицидів бульбочковими бактеріями *B. japonicum* PC07 та транспозоновим мутантом B78 приводила до максимального збільшення урожаю в умовах вегетаційних дослідів на 20,6 та 27,2% відповідно.

У варіанті з протруюванням насіння препаратом Стандак Топ, який використовують для обмеження розвитку збудників хвороб та фітофагів, і бактеризацією *B. japonicum* PC07 отримано прибавку врожаю до 2,31 г/рослину, що на 9,5% більше, порівняно з рослинами, насіння яких обробляли лише ризобіями. За комплексного застосування препарату Стандак Топ та бактеризації Tn5-мутантом B78 відзначено зниження індивідуальної продуктивності рослин на 7,0%, що свідчить, очевидно, про інгібуючий ефект однієї з діючих речовин протруйника на фізіолого-біохімічні процеси в клітинах макросимбіонта, оскільки негативного впливу на рівень асиміляції N₂ утвореними симбіотичними системами виявлено лише у фазі трьох справжніх листків.

За сумісного застосування обробки насіння Февером (на основі протіоконазолу) з бактеризацією насіння *B. japonicum* PC07 та B78 негативний вплив на симбіотичну продуктивність відобразився на рівні урожайності культури. Застосування у період вегетації рослин профілактичного обприскування фунгіцидом Аканто Плюс не приводило до підвищення показників продуктивності (табл. 7.12).

Комплексна дія протруйників Стандак Топ і Февер на фоні інокуляції стійкими в чистій культурі до пестицидів бульбочковими бактеріями *B. japonicum* PC09 приводила до максимального збільшення врожаю в умовах вегетаційних дослідів на 12,0 та 14,6% відповідно. За комплексного застосування препарату Стандак Топ та бактеризації Tn5-мутантом B144 відзначено підвищення індивідуальної продуктивності рослин на 6,3%.

Слід враховувати, що у польових умовах негативний ефект від впливу речовин хімічного синтезу, що застосовують для передпосівної обробки насіння сої та інших культур, послаблюється внаслідок перебігу обмінних процесів у ґрунті та діяльності вільноіснуючої мікрофлори.

Загалом вплив пестицидів на рослини зводиться до різнобічної дії на обмін речовин. Вони можуть змінювати проникність клітинної мембрани, інтенсивність фотосинтезу, дихання, активність пов'язаних із ними окисно-відновних ферментів, порушувати вуглеводний, азотний, фосфорний, водний

обміни. Інтенсивність цих процесів залежить від природи препарату, його норми, строків і форми застосування, умов середовища [180].

Таблиця 7.12 – Продуктивність рослин сої сорту Алмаз за обробки фунгіцидами та інокуляції *V. japonicum* PC07 і B78

Варіант	Маса насіння, г/рослину	+/- до контролю, %
Обробка насіння		
<i>V. japonicum</i> PC07	2,11±0,13	–
Максим XL + PC07	2,55±0,14	+20,6
Стандак Топ + PC07	2,31±0,13	+9,5
Февер+ PC07	2,00±0,09	- 5,2
B78	2,13±0,13	–
Максим XL + B78	2,71±0,13	+27,2
Стандак Топ + B78	1,98±0,09	-7,0
Февер+ B78	1,83±0,10	- 14,1
Обприскування рослин по вегетації		
<i>V. japonicum</i> PC07 + Аканто Плюс	2,05±0,12	-2,8
B78+ Аканто Плюс	1,94±0,09	- 8,9

У літературі є дані про те, що обробка насіння фунгіцидом Вітавакс 200 ФФ призводила до зниження азотфіксувальної активності промислових штамів ризобій у симбіозі з соєю у 3–5 разів. Інокуляція насіння *V. japonicum* УКМ В-6035 сприяла зниженню негативного впливу фунгіциду Максим Стар 025 FS на нітрогеназну активність нодуляційного апарату [137].

Інші дослідники у результаті проведених польових експериментів на лугових черноземних ґрунтах встановили, що застосування препаратів Максим, Круїзер та Новосил для передпосівної обробки насіння сої сприяло підвищенню показників асиміляції азоту, підвищенню приросту надземної маси на 13–88 %, коренів – на 17–133%, маси бульбочок – в 1,5–2,5 рази і накопиченню органічної речовини у ґрунті – в 1,3–2,2 рази [140].

Нами в умовах вегетаційних дослідів визначено, що для забезпечення високих показників азотфіксувальної активності та підвищення індивідуальної продуктивності рослин сої ефективним є застосування протруєння насіння препаратами Стандак Топ і Февер із бактеризацією стійкими до пестицидів у чистій культурі *B. japonicum* PC09, обробка насіння Максимом XL із бактеризацією *B. japonicum* PC07 і B78 та комплексна обробка посівного матеріалу препаратом Стандак Топ із наступною інокуляцією Tn5-мутантом B144.

У цілому, вплив пестицидів на мікро- і макросимбіонтів та їх взаємодію у кожному окремому випадку залежить як від діючих речовин препаратів, так і від штамів ризобій, якими обробляли насіння. Застосування бактеріальних добрив під сою на основі бульбочкових бактерій, резистентних до сучасних фунгіцидів, сприятиме послабленню наслідків хімічного стресу на формування та функціонування симбіотичних систем і дозволить підвищувати насінневу продуктивність за рахунок сумісного (комплексного) застосування мікробних препаратів із хімічними засобами захисту рослин, які широко використовують у інтенсивних технологіях вирощування сої для обмеження розвитку патогенів різної етіології.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень розширено уявлення про вплив чинників різної природи на формування взаємовідносин між симбіопартнерами у бобово-ризобіальних азотфіксувальних системах, а також виявлено особливості функціонування цих симбіозів, що дозволило розробити певні заходи підвищення ефективності азотфіксації у бобових, зокрема, за стресових умов.

Встановлено, що екsudати насіння сої можуть покращувати функціонування нітрогеназного комплексу ризосферного ізоляту гороху RP13 і бактерій *A.chroococcum* T79. Активний штам ризобій сої *V. japonicum* 634б мав більш виражену ефекторну дію на азотфіксувальну активність бактерій RP13 і *A. chroococcum* T79 порівняно з неактивним штамом бульбочкових бактерій *V. japonicum* 604к, пригнічуючи рівень азотфіксації у мікроорганізмів. Внесення до суспензії азотобактера ризобій *V. japonicum* 634б та шестигодинного екsudату насіння сої збільшувало нітрогеназну активність бактерій *A.chroococcum* T79, тоді як додавання неактивного штаму *V. japonicum* 604к разом з екsudатом знижувало азотфіксувальну активність діазотрофа.

Показано, що шестигодинний екsudат насіння сої може покращувати азотфіксувальну активність соєво-ризобіального симбіозу, сформованого за інокуляції рослин моно- і бінарними культурами на основі *V. japonicum* 634б, ризосферних мікроорганізмів сої F1, A20 і бактерій *A. chroococcum* T79. Разом із тим, насіннєві виділення сої знижували активність бульбочкоутворення на коренях макросимбіонта. Негативна дія ризосферних мікроорганізмів на процеси формування бульбочкового апарату була менш вираженою.

Ексудат насіння сої не впливав на розвиток надземної частини рослин сої, в той час як ризобактерії викликали збільшення вегетативної маси. Встановлено, що двадцятигодинний екsudат насіння сої сповільнював бульбочкоутворення та

знижував азотфіксувальну активність, що викликало погіршення формування вегетативної маси рослин сої на ранніх етапах розвитку, а саме: у фази примордіальних та двох трійчастих листків. Ексудат коренів сої, навпаки, у більшості випадків стимулював розвиток та функціонування бобово-ризобіального симбіозу за інокуляції рослин суспензією бульбочкових бактерій *B. japonicum* 6346.

З'ясовано, що ексудат насіння сої, отриманий за використання стерильної водопровідної води, при додаванні в інокулюм сповільнював бульбочкоутворення на коренях рослини-хазяїна і призводив до зниження маси надземної частини сої у фазу бутонізації. Насінневі виділення сої, отримані за допомогою стерильної дистильованої води, навпаки, стимулювали процеси розвитку бульбочкового апарату, а також ріст і розвиток макросимбіонта.

За дії вуглеводів (глюкози, галактози, N-ацетил-D-глюкозаміну, N-ацетил-D-галактозаміну, концентрація розчинів 0,01M), як сигнально-рецепторних молекул взаємодії симбіонтів, у середовищі росту бульбочкових бактерій сої змінювався ріст і розвиток мікроорганізмів в умовах чистої культури. Позитивним сигналінгом відносно ризобій сої характеризувались вуглеводи групи галактози. Максимальний ефект відзначено у N-ацетил-D-галактозаміну, що підтверджується результатами оцінки росту культури за показниками кількості життєздатних клітин мікроорганізмів, часом генерації культури та швидкістю її розмноження.

Відзначено, що ефективність роботи симбіотичного апарату сформованих соєво-ризобіальних симбіозів обумовлена їх здатністю до максимального збереження функціонування нодуляційних та азотфіксувальних процесів за дії посухи та після відновлення поливу рослин.

Виявлено, що формування захисних реакцій рослин сої у симбіозі із *B. japonicum* за дії посухи пов'язане з активацією супероксиддисмутази, адаптаційними змінами активності каталази та аскорбатпероксидази, що

призводить до регуляції вмісту пероксидів та інтенсивності процесів ліпопероксидації.

Встановлено, що серед досліджуваних штамів *S. meliloti* (441, 448а та СН) найвищим показниками нодуляційної активності за оптимального водозабезпечення характеризувався штам 448а. В умовах недостатнього водозабезпечення бактерії штаму СН активніше колонізували рослини, порівняно до штамів 441 та 448а, хоч і утворювали меншу кількість бульбочок на рослині. На фоні поновлення поливу нодуляційна активність штамів 441 та 448а підвищувалася, внаслідок чого вони випереджали штам СН за кількістю нодульованих рослин та відсотком гроноподібних бульбочок.

На початковому етапі формування симбіозу (початок стеблуння) найбільш ефективним за загальною азотфіксувальною активністю (в перерахунку на рослину) за обох рівнів водозабезпечення виявився штам СН. У період стеблуння-бутонізації високі показники загальної азотфіксувальної активності забезпечили штамми 448 та СН, які суттєво не відрізнялись за даною характеристикою між собою. Водночас за показником питомої азотфіксувальної активності за оптимального водозабезпечення суттєво випереджав інші штам СН, а в умовах попереднього впливу нестачі вологи найбільш ефективним виявився штам 448а.

Відзначено, що інокуляція люцерни *S. meliloti* СН в умовах недостатнього водозабезпечення сприяла появі більш ранніх і дружніх сходів, а також забезпечувала інтенсивний ріст надземної маси на початкових етапах розвитку рослин. За стабільного оптимального водозабезпечення найбільш ефективними щодо впливу на наростання надземної маси у період бутонізації є штамми 448а та СН.

Визначено, що штам СН є стійким до недостатнього водозабезпечення і ефективно впливає на формування й функціонування симбіотичного апарату та наростання надземної маси рослин люцерни в умовах нестачі вологи. Водночас у постресовий період, на фоні відновленого поливу, *S. meliloti* СН поступається,

хоч і не суттєво, штаму 448а за нодуляційною та азотфіксувальною активностями.

Отримані нові штами *V. japonicum* Д37, Д87, В78, В157 ефективні при формуванні бобово-ризобіального симбіозу *Glycine max* L. (Merill) – *V. japonicum* на фоні 0,75 норми мінерального азоту, про що свідчить збільшення маси бульбочок у 1,9–2,8 рази, азотфіксувальної активності в 1,6–2,3 рази та надземної маси на 23,9–38,7% порівняно з використанням штаму-стандарту 634б у вегетаційних дослідах. Конкурентоздатність перспективних штамів на підвищеному фоні мінерального азоту становила 73–83% залежно від сорту сої та тривалості часу від інокуляції до посіву насіння, що сприяло повноцінному живленню рослин як мінеральним, так і симбіотрофним азотом.

Штами *V. japonicum* В78 та РС07 ефективні як при завчасній (за 7–14 діб), так і традиційній інокуляції (у день посіву) насіння сої. За інокуляції насіння сої у день посіву формувалось більше корневих бульбочок, проте накопичення їх маси та азотфіксація мали тенденцію до зростання за завчасної інокуляції. Урожай зерна сої, зібраний в польовому досліді, істотно не відрізнявся у варіантах із різними термінами між інокуляцією та посівом насіння (за 14 днів до посіву та в день посіву насіння). На фоні місцевих рас ризобій азотфіксація сої, інокульованої новими штамами *V. japonicum* В78 та РС07, збільшилася в 3,7–4,8 рази, отримана прибавка насіння становила 11,14–26,7%.

За інокуляції насіння сої ризобіями з часом знижується їх життєздатність: протягом перших 2 годин виживає на насінні 81,3–85,4%, бактерій, через 7 діб – 8,8–15,6%, через 14 діб – 1,2–1,3% без застосування фунгіцидів. На фоні обробки насіння фунгіцидами февер та максим (за 2 години перед інокуляцією) виживає 59,0–61%, 0,42–1,1%, 0,23–0,46% відповідно через 2 години, 7 та 14 діб його зберігання. Збільшення часу зберігання інокульованого насіння понад 14 діб супроводжується критичним зменшенням кількості ризобій, яка є недостатньою для формування ефективного бобово-ризобіального симбіозу.

Бульбочкові бактерії штаму B78 *V. japonicum*, більш життєздатні за даних умов, а бактерії штаму PC07 їм дещо поступались.

Більшість досліджуваних мікроелементів (германій, молібден, ванадій, кобальт, залізо, мідь і цинк) сприяли активному наростанню біомаси клітин *V. japonicum* 634б. При цьому найбільш ефективними виявилися нанокарбоксилати феруму, германію та молібдену в концентрації 1:1000. Винятком був нанокарбоксилат цинку, який, незалежно від концентрації, здійснював цитотоксичний вплив на культуру бульбочкових бактерій.

Використання нанокарбоксилату германію у комплексі із бульбочковими бактеріями штаму *V. japonicum* 634б сприяє збільшенню утворених на коренях сої бульбочок, приводить до максимального серед усіх досліджуваних мікроелементів зростання азотфіксуючої активності симбіотичних систем та інтенсивності фотосинтезу в листках сої.

Суміш нанокарбоксилатів германію та феруму в комплексі з активними штамми *V. japonicum* у співвідношенні 1:1:1000 дозволяє забезпечувати рослини додатковими елементами живлення, формуючи ефективні рослинно-мікробні системи та забезпечує збільшення урожаю насіння сої на 13 % у порівнянні із інокуляцією без використання мікроелементів.

Застосування бактеріального препарату на основі нанокарбоксилатів германію та феруму гарантує не лише активне формування і функціонування симбіотичного апарату в рослин та їх високу продуктивність, а також забезпечує збереження фізіологічної активності бактерій при їх довготривалому зберіганні, що дозволяє виготовляти препарат завчасно, не зменшуючи його ефективності.

Встановлено відмінності у дії протруйників насіння Февер, Стандак Топ і Максим XL на формування та функціонування симбіотичних систем сої сорту Алмаз зі стійкими у чистій культурі до пестицидів бульбочковими бактеріями *V. japonicum* PC07 та PC09 і Tn5-мутантами B78 і B144.

Відзначено, що найбільш виражений токсичний вплив на рослини сої та сформовані симбіотичні системи, порівняно з іншими протруйниками, упродовж

вегетаційного періоду мав Февер. Внаслідок комбінованого застосування Феверу з інокулянтами, виготовленими на основі аналітично селекціонованих штамів PC07 та PC09 і транспозонових мутантів B78 і B144, для обробки насіння сої відзначали менші показники вегетативної маси рослин (надземна та маса коренів) та симбіотичних утворень (кількість та маса кореневих бульбочок). Профілактичне обприскування вегетуючих рослин сої препаратом Аканто Плюс здійснювали, коли симбіотичні системи були уже сформовані, тому негативного впливу на їх формування та функціонування не відмічено.

За дії комбінованого застосування протруйників (Максим XL, Февер, Стандак Топ) та інокуляції резистентними до фунгіцидів ризобіями PC07 і B78 відмічено зменшення азотфіксувальної активності бульбочок сої на початкових етапах функціонування симбіотичних систем (у фазу трьох справжніх листків) та поступове відновлення інтенсивності асиміляції N₂ впродовж вегетації сої. За умов комплексного застосування Стандак Топ та бактеризації PC09 і B144 встановлено повну відсутність інгібуючого впливу хімічного препарату на рівень азотфіксувальної активності сформованих симбіотичних систем.

В умовах вегетаційних дослідів виявлено, що комплексна дія протруйників Стандак Топу (на основі фіпронілу, тіофанат-метилу та піраклостробіну) і Феверу (на основі протіоконазолу) та інокуляції бульбочковими бактеріями *B. japonicum* PC09 забезпечувала підвищення продуктивності рослин сої на 12,0 та 14,6% відповідно. Завдяки стійкості до діючих речовин препарату Максим XL (на основі флудіоксонілу та металаксилу-М) симбіотичних систем, утворених за участю резистентних до пестицидів бульбочкових бактерій *B. japonicum* PC07 і B78, встановлено підвищення продуктивності рослин сої на 20,6 та 27,2% відповідно.

РЕКОМЕНДАЦІЇ

На основі результатів досліджень пропонується:

- використання нових активних штамів-інокулянтів *B. japonicum*, толерантних до ряду фунгіцидів, як раціональний елемент технології вирощування сої; зокрема, впровадження завчасної бактеризації насіння сої препаратами, виготовленими на основі нових активних конкурентоздатних штамів *B. japonicum* В78, Д87 та РС07;

- застосування модифікованого нанокарбоксилатами германію та феруму препарату «Ризостим» у сучасних технологіях вирощування сої як природний засіб збільшення кількості азоту, доступного рослинам, для реалізації їх генетичного потенціалу врожайності;

- подальше випробування у польових умовах для розробки рекомендацій щодо сумісного застосування наступних комбінацій фунгіцидів та інокулянтів на основі бульбочкових бактерій: Стандак Топ і Февер та *B. japonicum* РС09; а також Максим XL та *B. japonicum* РС07 і В78;

- подальше дослідження симбіотичних систем, створених люцерною сорту Серафима та бульбочковими бактеріями *S. meliloti* 448а та СН, як таких, що стійкі до дії нестачі вологи на початкових етапах розвитку рослин.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) / H. Antoun, C. J. Beauchamp, N. Goussard et al. // *Plant Soil*. – 1998. – Vol. 204(1). – P. 57–67.
2. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon / H. Fankem, D. Nwaga, A. Deubel et al. // *African Journal of Biotechnology*. – 2006. – Vol. 5(24). – P. 2450–2460.
3. Ivanchina N. V. Effect of strains of *Bacillus subtilis* on productivity of pea plant under autonomous and associative inoculation with the strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1078 / N. V. Ivanchina, S. R. Garipova, D. V. Shavaleeva // *Agrochemistry*. – 2008. – Vol. 10. – P. 34–39.
4. Kole M. M. Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres / M. M. Kole, W. J. Page, I. Altosaar // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1988. – Vol. 34(6). – P. 815–817.
5. Антипчук А. Ф. Вклад *Azotobacter* в урожай и количество сахарной свеклы / А. Ф. Антипчук, В. М. Рангелова, О. В. Танцюренко, Л. У. Шевченко // *Мікробіологічний журнал*. – 1997. – № 4(59). – С. 90–94.
6. Roberson E. B. Relationship between desiccation and exopolysacchride production in a soil *Pseudomonas* sp. / E. B. Roberson, M. K. Firestone // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1992. – Vol. 58(4). – P. 1289–1291.
7. Shawky B. T. Effect of azotobacters and azospirilla on germination of seeds of some agricultural crops / B. T. Shawky // *Zentralblatt fur Mikrobiologie*. – 1990. – Vol. 145(3). – P. 209–217.
8. Чайковська Л. О. Властивості нового штаму фосфатмобілізуючих бактерій / Л. О. Чайковська // *Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН*. – 2000. – № 6. – С. 57–58.

9. Response of wheat to inoculation with *Azospirillum* and *Azotobacter* : trans. 14th Int. Congr. Soil Sci., Kyoto, August 1990 / R. Altimirska. – Kyoto, 1990. – P. 111–139.
10. Glick B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria / B. R. Glick // *Journal of Microbiology*. – 1995. – Vol. 41(2). – P. 109–117.
11. Liste H. H. Stimulation of symbiosis and growth of lucerne by combined inoculation with *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas fluorescence* / H. H. Liste // *Zentralblatt für Mikrobiologie*. – 1993. – Vol. 148(3). – P. 163–176.
12. Garcia de Salamone I. E. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants / I. E. García de Salamone, R. K. Hynes, L. M. Nelson // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2001. – Vol. 47(5). – P. 404–411.
13. Sokolova M. G. Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants / M. G. Sokolova, G. P. Akimova, O. B. Vaishlia // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2011. – Vol. 47(3). – P. 274–278.
14. Srinivasan M. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions / M. Srinivasan, F. B. Holl, D. J. Petersen // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1996. – Vol. 42(10). – P. 1006–1014.
15. Bashan Y. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* / Y. Bashan, L. E. Bashan // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 68(6). – P. 2637–2643.
16. El-Barougy E. Antagonistic activity of selected strains rhizobacteria against *Macrophomina phaseolina* of soybean plants / E. El-Barougy, N. M. Awad, A. S. Turkey, H. A. Hamed // *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*. – 2009. – Vol. 5(3). – P. 337–347.
17. El-Gamal M. S. Interactions between *Azotobacter* spp. and *Rhizobium sesbani* into the rhizosphere of *Sesbania sesban* (L.) Merrill plants and its efficiency on growth

- and symbiotic nitrogen fixation / M. S. El-Gamal // *Zentralblatt fur Mikrobiologie*. – 1992. – Vol. 147(1-2). – P. 112–118.
18. Мельникова Н. Н. Формирование и функционирование бобово-ризобиального симбиоза у растений сои при интродукции штаммов родов *Azotobacter* и *Bacillus* / Н. Н. Мельникова, Л. В. Булавенко, И. К. Курдиш и др. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2002. – № 4(38). – С. 427–432.
19. The effect of inoculating soybean plants with strains of *B. japonicum* and *A. chroococcum* : proc. 2 nd European Nitrogen Fixing Conference & NATO Advantage Work Shop, Poznan, 8-13 Sept. 1996 / V. Milic, N. Mrkovacki, M. Hrustia et al. ; Poland, 1996. – P. 193.
20. Bashan L. E. Involvement of indol-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris* / L. E. Bashan, H. Antoun, Y. Bashan // *Journal of Phycology*. – 2008. – Vol. 44(4). – P. 938–947.
21. Holguin G. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.) / G. Holguin, Y. Bashan // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1996. – Vol. 28(12). – P. 1651–1660.
22. Melnykova N. Plant growth promoting properties of bacteria isolated from the rhizosphere of soybean and pea / N. Melnykova, O. Gryshchuk, L. Mykhalkiv et al. // *Natura Montenegrina*. – 2013. – Vol. 12(3-4). – P. 915–923.
23. Мельникова Н. Н. Влияние семенных экссудатов бобовых растений на формирование бобово-ризобиального симбиоза / Н. Н. Мельникова, С. В. Омельчук // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2009. – Т. 45(3). – С. 331–337.
24. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов / С. Я. Коць, С. К. Береговенко, Е. В. Кириченко, Н. Н. Мельникова. – Киев : Наук. думка, 2007. – 315 с.

25. Hartwig U. A. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti* / U. A. Hartwig, C. A. Maxwell, C. M. Joseph, D. A. Phillips // *Plant Physiology*. – 1990. – Vol. 92(1). – P. 116–122.
26. Ndakidemi P. A. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signal and protectants in early seedling development / P. A. Ndakidemi, F. D. Dakora // *Functional Plant Biology*. – 2003. – Vol. 30(7). – P. 729–745.
27. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз : монография : [в 4 томах] / [за ред. В. В. Моргуна ; авт.-составители. : С. Я. Коць, В. В. Моргун, В. Ф. Патыка и др. – К. : Логос, 2011. – Т. 2. – 523 с.
28. Walker T. S. Root exudation and rhizosphere biology / Walker T. S., Bais H. P., Grotewold E., Vivanco J. M. // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 132(1). – P. 44–51.
29. Dakora F. D. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments / F. D. Dakora, D. A. Phillips // *Plant Soil*. – 2002. – Vol. 245. – P. 35–47.
30. Kato K. Effect of exudate released from seeds and seedling roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on proliferation of *Rhizobium* sp. (Phaseolus) / K. Kato, Y. Arima, H. Hirata // *Soil Science and Plant Nutrition*. – 1997. – Vol. 43(2). – P. 275–283.
31. Ayo Odunfa V. S. Free amino acids in the seed and root exudates in relation to the nitrogen requirements of rhizosphere soil fusaria / V. S. Ayo Odunfa // *Plant Soil*. – 1979. – Vol. 52(4). – P. 491–499.
32. Кириченко Е. В. Микробиологические аспекты регуляции продуктивности и защиты культурных растений / Е. В. Кириченко. – Николаев : Илион, 2018. – 340 с.
33. Моргун В. В. Роль біологічного азоту в азотному живленні рослин / В. В. Моргун, С. Я. Коць // *Вісник НАН України*. – 2018. – № 1. – С. 62–74.

34. Suzaki T. Root nodulation: a developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection / T. Suzaki, M. Kawaguchi // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2014. – Vol. 21(10). – P. 16–22.
35. Wang D. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism / D. Wang, Sh. Yang, F. Tang, H. Zhu // *Cell Microbiology*. – 2012. – Vol. 14(3). – P. 334–342.
36. Сытников Д. М. Экономическая целесообразность применения ризобияльных препаратов, модифицированных гомологичным лектином / Д. М. Сытников // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2012. – № 1(17). – С. 75–84.
37. Канделинская О. Л. Роль лектинов в регуляции эффективности бобово-ризобияльного симбиоза у люпина / О. Л. Канделинская // *Ботаника (исследования). Сб. науч. тр. / Ин-т эксп. Ботаники НАН Беларуси. – Минск : Ин- радиобиологии, 2015. – Вып. 44. – С. 283–290.*
38. Пат. на корисну модель 102077 Україна, МПК А01N 25/00, А01N 65/20. Застосування лектину насіння сої для регуляції формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу люцерни та сої за дії посухи / С. Я. Коць, Л. М. Михалків, П. М. Маменко, Л. І. Веселовська (Україна) ; Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. – № U201502022 ; заявл. 06.03.15 ; опубл. 26.10.15, Бюл. № 20.
39. Kyrychenko O. V. Efficiency of soybean-rhizobium symbioses for seeds inoculated with compositions based on *Rhizobium*, *Azotobacter* and phytolectins / O. V. Kyrychenko // *Biotechnologia Acta*. – 2019. – Vol. 12(2). – P. 79–87.
40. Кириченко О. В. Полісахариди бульбочкових бактерій та їх роль у формуванні бобово-ризобіального симбіозу / О. В. Кириченко // В кн. : *Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом* / С. Я. Коць, С. М. Маліченко, О. Д. Кругова. – К. : Логос, 2001. – С. 57–79.

41. Косенко Л. В. Биологическая активность глюкана *Sinorhizobium meliloti* / Л. В. Косенко, Л. М. Михалкив, Е. Д. Кругова и др. // Микробиология. – 2003. – № 5(72). – С. 633–638.
42. Антипчук А. Ф. Влияние липополисахаридов и глюканов двух штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на формирование и эффективность их симбиоза с растениями гороха / А. Ф. Антипчук, Л. В. Косенко // Микробиология. – 2004. – № 1(73). – С. 62–67.
43. Laus M. C. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin / M. C. Laus, T. J. Logman, G. E. Lamers et al. / Molecular Microbiology. – 2006. – Vol. 59(6). – P. 1704–1713.
44. Кириченко Е. В. Взаимоотношения бобовых растений и клубеньковых бактерий при доконтактном взаимодействии и ранних этапах формирования азотфиксирующих систем / Е. В. Кириченко // В кн. : Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов / С. Я. Коць, С. М. Маліченко, О. Д. Кругова, Е. В. Кириченко. – К. : Наук. думка, 2007. – С. 80–140.
45. Кириченко О. В. Екзополісахариди бульбочкових бактерій люпину та сої і їх роль у встановленні симбіотичних зв'язків між ризобіями та бобовими рослинами / О. В. Кириченко, С. М. Маліченко, Л. В. Косенко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2001. – № 6(33). – С. 539–544.
46. Кириченко Е. Роль фитолектинов в регуляции функционирования симбиозов и ассоциаций. Биологическая активность лектинов бобовых и зерновых культур / Е. Кириченко. – Saarbrucken, Deutschland : Palmarium Academic Publishing, 2012. – 84 с.
47. Косенко Л. В. Действие стимулятора роста растений бактозоля на *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 250а и его азотоустойчивый мутант М-71 в условиях различной обеспеченности азотом / Л. В. Косенко, Н. М. Мандровская, Е. Д. Кругова и др. // Микробиология. – 2003. – № 1(72). – С. 40–47.

- 48.Кругова О. Д. Інтенсифікація симбіотичної азотфіксації за допомогою біологічно активних речовин синтетичного і природного походження / О. Д. Кругова // В кн. : Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом / С. Я. Коць, С. М. Маліченко, О. Д. Кругова, Е. В. Кириченко. – К. : Логос, 2001. – С. 157–168.
- 49.Садовникова Ю. Н. Особенности клеточных ответов *Azospirillum brasilense* на взаимодействие стрессовых факторов и лектина пшеницы : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 – биохимия, 03.00.07 – микробиология / Садовникова Юлия Николаевна ; Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. – Саратов, 2009. – 23 с.
- 50.Кириченко Е. В. Биологическая активность ризосферной почвы пшеницы яровой в ассоциации с бактериями *Azotobacter chroococcum* T79, модифицированными N-ацетил-D-глюкозамином / Е. В. Кириченко // Мікробіологія і біотехнологія. – 2016. – № 3. – С. 30–42.
- 51.Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community / H. Burgmann, S. Meier, M. Bunge, F. Widmer, J. Zeyer // Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 7(11). – P. 1711–1724.
- 52.Курьченко О. V. Effect of hapten N-acetyl-D-glucosamine on biological activity of the wheat lectin / О. V. Курьченко, G. Yu. Perkovska // General and Applied Plant Physiology. – 2007. – Vol. 33(3-4). – P. 141–154.
- 53.Пат. на винахід 102077 Україна, МПК С12N 1/20. Спосіб підтримання життєздатності *Bradyrhizobium japonicum* / С. Ф Козар, Т. О. Усманова, Т. А. Євтушенко (Україна) ; Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України. – № а201304311 ; заявл. 05.04.13 ; опубл. 25.02.15, Бюл. № 4.
- 54.Пат. на винахід 108323 Україна, МПК С12Р 19/04. Спосіб одержання екзополісахариду / Т. П. Пирог, Н. А. Гриценко, М. О. Івахнюк, (Україна) ; Національний університет харчових технологій. – № а201501955 ; заявл. 26.02.14 ; опубл. 10.04.15, Бюл. № 7.

55. Zahran H. H. Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate / H. H. Zahran // *Microbiology and Molecular Biology*. – 1999. – Vol. 63(4). – P. 968–989.
56. Hungria M. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil / M. Hungria, M. A. T. Vargas // *Field Crops Result*. – 2000. – Vol. 65(2-3). – P. 151–164.
57. Serraj R. Role of symbiotic nitrogen fixation in the improvement of legume productivity under stressed environments / R Serraj, J. Adu-Gyamfi // *West African Journal of Applied Bioliogy*. – 2004. – Vol. 6(1). – P. 95–109.
58. Williams P. M. Effect of osmotically induced leaf moisture stress on nodulation and nitrogenase activity of *Glycine max* / P. M. Williams, S. M. de Mallorca // *Plant Soil*. – 1984. – Vol. 80. – P. 267–283.
59. Каппушиев И. Н. Старение клубеньков бобовых / И. Н. Каппушиев, Г. М. Кожаринова, С. Ф. Измайлов // *Физиология растений*. – 1998. – № 1(45). – С. 117–130.
60. Мишустин Е. Н. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс / Е. Н. Мишустин, В. К. Шильникова. – М. : Наука, 1973. – 288 с.
61. Чеботарь Н. И. Об эффективности инокуляции сои в условиях зоны Молдавии / Н. И. Чеботарь // *Бюлетень ВНИИСХМ*. – 1987. – № 48. – С. 13–19.
62. Коць С. Я. Бобово-ризобіальний симбіоз за водного стресу та способи підвищення його продуктивності в умовах посухи / С. Я. Коць, Л. М. Михалків // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 2008. – № 4(40). – С. 279–291.
63. Orchard V. A. Relation between soil respiration and soil moisture / V. A. Orchard, F. G. Cook // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1983. – Vol. 15(4). – P. 447–453.
64. Legume-Rhizobium symbiotic development in rie-based multiple cropping systems. *Curr. Perspect. Nitrogen Fixation : proc. 4 Int. Symp. nitrogen fixation*,

- Canberra, 1-5 Dec. 1980 / B. Rerkasem, D. Tongkumdee ; Amsterdam, 1981. – 435 p.
65. Tate R. L. Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation) / R. L. Tate. – New York : John Wiley and Sons, Inc., 1995. – P. 307–333.
66. Wadisirisuk P. Influence of *Bradyrhizobium japonicum* location and movement on nodulation and nitrogen fixation in soybean / P. Wadisirisuk, S. K. A. Danso, G. Hardarson, J. Bower // Applied and Environmental Microbiology. – 1989. – Vol. 55(7). – P. 1711–1716.
67. Worall V. C. The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii* Dang / V. C. Worall, R. J. Roughley // Journal of Experimental Botany. – 1976. – Vol. 27(101). – P. 1233–1241.
68. Zahran H. H. Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum* / H. H. Zahran, J. I. Sprent // Planta. – 1986. – Vol. 167. – P. 303–307.
69. Ergin M. Effect of water stress on growth and nitrogen fixing activity of *Trifolium repens* / M. Ergin, J. I. Sprent // New Phytologist. – 1973. – Vol. 72(1). – P. 117–126.
70. Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculants performance and increase legume productivity in stressful environments. Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam / [G. O'Hara, R. Yates, J. Howieson] ; ed. by D. Herridge ; – ACIAR Proceedings, 2002. – P. 75–80.
71. Ali S. F. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India / S. F. Ali, L. S. Rawat, M. K. Meghvansi, S. K. Mahna // Science. – 2009. – Vol. 4(1). – P. 13–18.
72. Zahran H. H. Diversity and environmental stress responses of rhizobia bacteria from Egyptian grain legumes / H. H. Zahran, M. Abdel-Fattah, M. M. Yasser et al. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. – 2012. – Vol. 6(10). – P. 571–583.

73. Коць С. Я. Ефективність інокуляції люцерни новими штамми *Sinorhizobium meliloti* за різного вологозабезпечення ґрунту / С. Я. Коць, Л. М. Михалків, Н. А. Воробей та ін. // Збірник наукових праць СГІ-НЦНС. – 2015. – № 66(26). – С. 178–188.
74. Mittler R. ROS signaling: the new wave? / R. Mittler, S. Vanderauwera, N. Suzuki et al. // Trends in Plant Science. – 2017. – Vol. 16(6). – P. 300–309.
75. Mittler R. ROS are good / R. Mittler // Trends in Plant Science. – 2017. – Vol. 22(1). – P. 11–19.
76. Damiani I. Reactive oxygen species and nitric oxide control early steps of the legume – *Rhizobium* symbiotic / I. Damiani, N. Pauly, A. Puppo et al. // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol. 7. – P. 1–8.
77. Guo Y. Y. Effect of drought stress on lipid peroxidation, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activity of leaves and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. seedling / Y. Y. Guo, H. Y. Yu, M. M. Yang et al. // Russian Journal of Plant Physiology. – 2018. – Vol. 65(2). – P. 244–250.
78. Agarwal S. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia* / S. Agarwal, R. Shaheen // Brazilian Journal of Plant Physiology. – 2007. – Vol. 19(2). – P. 149–161.
79. Веселов А. П. Математическая модель возможного триггера обратимого включения режима стресса у растений / А. П. Веселов // Физиология растений. – 2001. – № 1(48). – P. 124–131.
80. Xu Z. Plant responses to drought and rewatering / Z. Xu, G. Zhou, H. Shimizu // Plant Signaling and Behavior. – 2010. – Vol. 5(6). – P. 649–654.
81. Fathi A. Effect of drought stress and its mechanism in plants / A. Fathi, D. B. Tari // International Journal of Life Sciences. – 2016. – Vol. 10(1). – P. 1–6.
82. Xue Q. Physiological mechanisms contributing to the increased water-use efficiency in winter wheat under deficit irrigation / Q. Xue, Z. Zhu, J. T. Music et al. // Plant Physiology. – 2006. – Vol. 162(2). – P. 154–164.

83. Wijewardana C. Physiological assessment of water deficit in soybean using midday leaf water potential and spectral features / C. Wijewardana, F. A. Alsajri, J. T. Irby et al. // *Functional Plant Biology*. – 2011. – Vol. 38(6). – P. 523–533.
84. Dong S. A study on soybean responses to drought stress and rehydration / S. Jiang, Y. Dong, Y. A. Dong et al. // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2019. – Vol. 26(8). – P. 2006–2017.
85. Guinel F. C. Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation / F. C. Guinel // *Frontiers in Plant*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1–21.
86. Nakashima K. Toward the genetic improvement of drought tolerance in crops / K. Nakashima, K. Suenaga // *Japan Agricultural Research Quarterly*. – 2017. – Vol. 51(1). – P. 1–10.
87. Deka D. Effect of drought stress on crop plants with special reference to drought avoidance and tolerance mechanisms / D. Deka, A.K. Singh, A. Singh // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2018. – Vol. 7(09). – P. 2703–2721.
88. Nadeem M. Research progress and perspective on drought stress in legumes: a review / M. Nadeem, J. Li, M. Yahya // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20(10). – P. 2–32.
89. Auler P. A. Expression of transcription factors involved with dehydration in contrasting rice genotypes submitted to different levels of soil moisture / P. A. Auler, M. N. do Amaral, T. Rossatto et al. // *Genetics and Molecular Research*. – 2019. – Vol. 18(1). – gmr18247.
90. Finkel T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing / T. Finkel, N. J. Holbrook // *Nature*. – 2000. – Vol. 408(6809). – P. 239–247.
91. Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К. Т. Турпаев // *Биохимия*. – 2002. – № 3(61). – С. 339–352.
92. Контурська О. О. Активність ензимів аскорбат-глутатионового циклу в листках проростків кукурудзи в умовах засолення та обробки адаптогенними

- препаратами / О.О. Контурська, Т.О. Палладіна // Український біохімічний журнал. – 2012. – № 6(84). – С. 139–144.
93. Yannarelli G. G. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress / G. G. Yannarelli, A. J. Fernandez-Alvarez, D. M. Santa-Cruz et al. // *Phytochemistry*. – 2007. – Vol. 68(4). – P. 505–512.
94. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В. В. Бараненко // *Цитология*. – 2006. – № 6(48). – С. 465–474.
95. Креславский В. Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В. Д. Креславский, Д. А. Лось, С. И. Аллахвердиев, В. В. Кузнецов // *Физиология растений*. – 2012. – № 2(59). – С. 163–178.
96. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений / Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. // *Ukr. Biochem. J.* – 2014. – Vol. 86(4). – P. 18–35.
97. Giannopolitis C. N. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in higher plants / C.N. Giannopolitis, S. K. Ries // *Plant Physiology*. – 1977. – Vol. 59(2). – P. 309–314.
98. Nakano Y. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // *Plant Cell Physiology*. – 1981. – Vol. 22(5). – P. 867–880.
99. Becana M. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules / M. Becana, D. A. Dalton, J. F. Moran et al. // *Physiology Plantarum* – 2000. – Vol. 109. – P. 372–381.
100. Matamoros M. A. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis / M. A. Matamoros, D. A. Dalton, J. Ramos et al. // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 133. – P. 499–509.
101. Sulieman S. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: metabolism and regulatory mechanisms / S. Sulieman, L-S. P. Tran // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – Vol. 15(11). – P. 19389–19393.

102. Wang Q. Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions / Q. Wang, J. Liu, H. Zhu // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1–8.
103. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз : монография : [в 4 томах] / [за ред. В. В. Моргуна ; авт.-составители. : С. Я. Коць, В. В. Моргун, В. Ф. Патыка и др. – К.: Логос, 2010. – Т. 1. – 506 с.
104. Біологічний азот / [В. П. Патики, С. Я. Коць, В. В. Волкогон та ін.] ; під ред. В. П. Патики ; – К. : Світ, 2003. – 42 с.
105. Алексеев О. О. Влияние экологических факторов на развитие и продуктивность бобово-ризобиального симбиозу / О. О. Алексеев // *Сільське господарство екологія та охорона*. – 2016. – № 4. – С. 187–196.
106. Pukhtaievych P. P. Efficiency of inoculation by nodule bacteria of alfalfa grown alone and in mixture with smooth bromegrass at varying rates of phosphorus and potassium nutrition / P. P. Pukhtaievych, E. P. Kukol, N. A. Vorobey et al. // *Физиология растений и генетика*. – 2019. – № 5(51). – С. 415–424.
107. Тихонович И. А. Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве) / И. А. Тихонович, А. П. Кожемяков, В. К. Чеботарь и др. – М. : ВНИИСХМ, 2005. – 154 с.
108. Triplett E. W. Genetics of competition for nodulation of legumes / E. W. Triplett, M. J. Sadowsky // *The Annual Review of Microbiology*. – 1992. – Vol. 15(10). – P. 399–428.
109. Zdor R. C. Nodulation competitiveness of Tn5-induced mutants of *Rhizobium fredii* USDA208 that are altered in motility and extracellular polysaccharide production / R. C. Zdor, S. G. Pueppke // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1991. – Vol. 37. – P. 52–58.
110. Кокорина А. Л. Бобово-ризобиальный симбиоз и применение микробиологических препаратов комплексного действия – важный резерв

- повышения продуктивности пашни / А. Л. Кокорина, А. П. Кожемяков. – СПб. : ВНИИСХМ, 2010. – 50 с.
111. Коць С. Інокуляція та інкрустація насіння сої: огляд технології застосування і ринку препаратів / С. Коць, П. Маменко // Пропозиція: спецвипуск журналу. Сучасні агротехнології із застосування біопрепаратів та регуляторів росту. –2015. – С. 24–28.
112. Воробей Н. А. Конкурентоздатність транспозонових мутантів *Bradyrhizobium japonicum* / Н. А. Воробей, С. Я. Коць, Л. А. Кудрявченко // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку: у 2 т. / НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетики, Укр. т-во фізіологів рослин ; голов. ред. В. В. Моргун – Київ : Логос, 2009. – Том 2. – С. 480–485.
113. Воробей Н. А. Азотфіксувальна активність та ріст вегетативних органів люцерни за сумісної інокуляції суспензіями на основі активного і неактивного штамів *Sinorhizobium meliloti* / Н. А. Воробей, С. Я. Коць // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – № 2(41). – С. 162–167.
114. Howieson J. G. Rhizobial persistence and its role in the development of sustainable agricultural systems in Mediterranean environments / J. G. Howieson // Soil Biology & Biochemistry. – 1995. – Vol. 27. – P. 603–610.
115. Кожемяков А. П. Агротехнологические основы создания усовершенствованных форм микробных биопрепаратов для земледелия / А. П. Кожемяков, Ю. В. Лактионов, Т. А. Попова и др. // Сельскохозяйственная биотехнология. – 2015. – № 3(50). – С. 369–376.
116. Маліченко С. М. Ефективність різних способів інокуляції сої бульбочковими бактеріями / С. М. Маліченко, В. К. Даценко, П. М. Маменко, С. Я. Коць // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2009. – Вип. 10. – С. 20–28.
117. Патица В. П. Вплив аборигенних популяцій бульбочкових бактерій сої на симбіотичну активність інтродукованого штаму *Bradyrhizobium japonicum*

- 6346 / В. П. Патика, Д. В. Крутило, Т. М. Ковалевська // Мікробіологічний журнал. – 2004. – № 3(66). – С. 14–21.
118. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / [Г. Спайнк, А. Кондороши, П. Хукас и др.] ; рус. перевод под ред. И. А. Тихоновича, Н. А. Проворова ; – СПб., 2002. – 568 с.
119. Асеева Т. А. Эффективность различных приёмов повышения продуктивности посевов сои в Хабаровском крае / Асеева Т. А., Золотарева Е. В., Паланица С. Р. // Вестник Красноярского ГАУ. – 2008. – № 3. – С. 113–117.
120. Колісник С. І. Основні технологічні прийоми вирощування сої на насіння / С. І. Колісник // Корми і кормовиробництво. – 2012. – Вип. 71. – С. 41–48.
121. Бабич А. О. Соя: агроекологічні основи вирощування, переробки і використання: Навчальний посібник / А. О. Бабич, М. І. Бахмат, О. М. Бахмат. – Кам'янець-Подільський : ПП «Медобори-2006», 2013. – 268 с.
122. Волкогон В. В. Ефективність симбіозу бульбочкових бактерій з рослинами сої / В. В. Волкогон, М. С. Комок // Бюлетень Інституту зернового господарства НААН. – 2010. – № 39. – С. 89–93.
123. Коць С. Я. Мінеральні елементи і добрива в живленні рослин: навч. Посіб. для студ. вищ. навч. закл. Вид. 3-е, переробл. і допов. / С. Я. Коць, Н. В. Петерсон. – Київ : Логос, 2009. – 182 с.
124. Ситар О. В. Нанотехнології в сучасному сільськогосподарському виробництві / О. В. Ситар, Н. В. Новицька, Н. Ю. Таран та ін. // Фізика живого. – 2010. – № 3(18). – С. 113–116.
125. Wang P. Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences / P. Wang, E. Lombi, F. J. Zhao, P. M. Kopittke // Trends in Plant Science. – 2016. – Vol. 21(8). – P. 699–712.
126. Prasad R. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives / R. Prasad, A. Bhattacharyya, Q. D. Nguyen // Microbiology Journal. – 2017. – Vol. 8. – P. 161–171.

127. Нанотехнологии и наноматериалы в агропромышленном комплексе / [В. Ф. Федоренко, М. Н. Ерохин, В. И. Балабанов и др.]. – Москва : ФГБНУ «Росинформагротех», 2011. – 312 с.
128. Мікробіологічні препарати для сільського господарства / [С. Я. Коць, Н. А. Воробей, О. В. Кириченко та ін.] ; Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. – К. : Логос, 2016. – 48 с.
129. Бабич А. О. Селекція, виробництво, торгівля і використання сої у світі / А. О. Бабич, А. А. Бабич-Побережна. – К. : Аграрна наука, 2011. – 548 с.
130. Трибель С. О. Сучасний стан хімічного методу захисту рослин / С. О. Трибель, О. О. Стригун // Карантин і захист рослин. – 2014. – № 1. – С. 210.
131. Ковалевська Т. М. Вплив фундазолу та ризоторфіну на продуктивність симбіозу бульбочкових бактерій з рослинами люпину / Т. М. Ковалевська, П. В. Горбань, О. В. Надкернична, А. Г. Бардаков // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2005. – Вип. 1-2. – С. 52–59.
132. Niewiadomska A. Pesticide side effect on the symbiotic efficiency and nitrogenase activity of *Rhizobiaceae* bacteria family / A. Niewiadomska, J. Kłama // Polish Journal of Microbiology. – 2005. – Vol. 54. – P. 43–48.
133. Bikrol A. Response of *Glycine max* relation to nitrogen fixation as influenced by fungicide seed treatment / A. Bikrol, N. Saena, K. Singh // African Journal of Biotechnology. – 2005. – Vol. 4(7). – P. 667–671.
134. Campo R. J. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants / R. J. Campo, R. S. Araujo, M. Hungria // Symbiosis. – 2009. – Vol. 48(1-3). – P.154–163.
135. Сафронова Г. В. Влияние инокулянтов и пестицидов на развитие бобово-ризобиального симбиоза и продуктивность зернобобовых растений / Г. В. Сафронова, Л. А. Суховицкая, Н. В. Короленок // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2007. – № 5. – С. 61–73.

136. Campo R. J. Compatibilidade de uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja / R. J. Campo, M. Hungria. – Londrina : Embrapa Soja-Circular Técnica, 2000. – 32 p.
137. Вознюк С. В. Формування та функціонування симбіотичних систем та мікробіоценозу ризосфери сої за використання різних фунгіцидів / С. В. Вознюк, Л. В. Титова, О. В. Ратушинська, Г. О. Іутинська // Мікробіологічний журнал. – 2016. – № 4(78). – С. 59–70.
138. Ahemad M. Effect of tebuconazole-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium* isolate MRP1 on pea – *Rhizobium* symbiosis / M. Ahemad, M. S. Khan // *Scientia horticulturae*. – 2011. – Vol. 129(2). – P. 266–272.
139. Tariq M. Effect of fungicides and bioinoculants on *Pisum sativum* / M. Tariq, S. Hameed, M. Shahid et al. // *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*. – 2016. – Vol. 5(2). – P. 36–40.
140. Якименко М. В. Совместное применение штаммов ризобий и некоторых препаратов для предпосевной обработки семян сои / М. В. Якименко, С. А. Бегун // *Земледелие*. – 2016. – № 6. – С. 46–48.
141. Shahid M. Fungicide tolerant *Bradyrhizobium japonicum* mitigate toxicity and enhance greengram production under hexaconazole stress / M. Shahid, M. S. Khan // *Journal of Environmental Sciences*. – 2019. – Vol. 78. – P. 92–108.
142. Борзенкова Г. А. Оптимизация технологии предпосевного протравливания и возможность его сочетания с инокуляцией для защиты сои от семенной инфекции / Г. А. Борзенкова // *Зернобобовые и крупяные культуры*. – 2014. – № 1 (9). – С. 22–30.
143. Zilli J. É. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield / J. É. Zilli, K. G. Ribeiro, R. J. Campo, M. Hungria // *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. – 2009. – Vol. 33(4). – P. 917–923.
144. Якименко М. В. Совместимость коллекционных штаммов ризобий сои с фунгицидами и ростстимулирующими препаратами / М. В. Якименко,

- С. А. Бегун, А. И. Сорокина // Дальневосточный аграрный вестник. – 2016. – № 2. – С. 38–41.
145. Кукол К. П. Чутливість чистих культур *Bradyrhizobium japonicum* до впливу різних норм фунгіцидів / К. П. Кукол, Н. А. Воробей, С. Я. Коць // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2019. – Том 30 – С. 20–31.
146. Воробей Н. А. Оцінка токсичності впливу фунгіцидів на бульбочкові бактерії *Bradyrhizobium japonicum* у чистій культурі / Н. А. Воробей, К. П. Кукол, С. Я. Коць // Мікробіологічний журнал. – 2020. – № 3(82). – С. 45–54.
147. Simon R. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering transposon mutagenesis in gram-negative bacteria / R. Simon, U. Prierer, A. A. Puhler // Biotechnology. – 1983. – Vol. 1. – P. 784–791.
148. Whitaker J. R. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm / J. R. Whitaker, P. E. Granum // Analytical Biochemistry. – 1980. – Vol. 109. – P. 156–159.
149. Hardy R. W. F. 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 Physiology. – 1968. – Vol. 43. – P. 1185–1207.
150. Антипчук А. Ф. Практикум з мікробіології: навч. посіб. / А. Ф. Антипчук, А. І. Піляшенко-Новохатній, Т. М. Євдокименко. – К. : Університет «Україна», 2011. – 156 с.
151. Бабенюк Ю. Д. Мікробіологія : навч. посіб. / Ю. Д. Бабенюк, А. Ф. Антипчук. – К. : Університет «Україна», 2010. – 149 с.
152. Simon R. High frequency mobilization of gram-negative bacteria replicons by the in vitro constructed Tn5-mob transposon / R. Simon // Molecular Genetics and Genomics – 1984. – Vol. 196(3). – P. 413.
153. Воробей Н. А. Біотехнологія створення ефективних Tn5-мутантів бульбочкових бактерій конюшини *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* /

- Н. А. Воробей, В. М. Заєць, С. Я. Коць // Біотехнологія. – 2012. – Том 3(5). – С. 53–61.
154. Практикум по мікробіології / [А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.] ; под ред. А. И. Нетрусова ; – М. : Академия, 2005. – 608 с.
155. Amarger N. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains *Rhizobium meliloti* / N. Amarger // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1981. – Vol. 13(6). – P. 475–480.
156. Child J. J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. association with nonleguminous plant cell cultures / J. J. Child // *Nature*. – 1975. – Vol. 253. – P. 350–351.
157. Гродзинский А. М. Краткий справочник по физиологии растений / А. М. Гродзинский, Д. М. Гродзинский. – Киев : Наук. Думка, 1964. – 388 с.
158. Перелік пестицидів і агрохімікатів дозволених до використання в Україні. / [В. У. Ящук, Д. В. Іванов, Р. М. Кривошея та ін.] ; Київ : Юніверст Медіа, 2018. – 1040 с.
159. Крикунець В. М. Ацетиленвідновний метод у дослідженнях з фізіології бобово-ризобіального симбіозу / В. М. Крикунець // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 1993. – № 5(25). – С. 419–430.
160. Niki E. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects / E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – Vol. 338(1). – P. 668–676.
161. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* / S. Sagisaka // *Plant Physiology*. – 1976. – Vol. 57(2). – P. 308–309.
162. Доліба І. М. Метод визначення каталазної активності у рослинному матеріалі / І. М. Доліба, Р. А. Волков, І. І. Панчук // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2010. – № 6(42). – С. 497–503.
163. Bradford M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising: the principle of protein–dye binding / M. A. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

164. Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения / [Дж. М. О. Скерлок, С. П. Лонг, Д. О. Холл и др.]; под ред. А. Т. Мокроносова и А. Г. Ковалева ; М. : Агропромиздат, 1989. – 460 с.
165. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – М. : Агропромиздат, 1985. – 351с.
166. Noel K. D. 2-O-Methylation of fucosyl residues of a rhizobial lipopolysaccharide is increased in response to host exudate and is eliminated in a symbiotically defective mutant / K. D. Noel, J. M. Vox, V. J. Bonne // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70(3). – P. 1537–1544.
167. Капе R. Isoliquiritigenin, a strong nod gene- and glyceolin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudates / R. Капе, M. Parniske, S. Brandt, D. Werner // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – Vol. 58(5). – P. 1705–1710.
168. Schmidt P. E. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium sp.* NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudates / P. E. Schmidt, W. J. Broughton, D. Werner // MPMI. – 1994. – Vol. 7(3). – P. 384–390.
169. Loh J. T. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*: IV. Effect of lactose and flavones on the expression of the lectin B_j38 / J. T. Loh, S. C. Ho, J. L. Wang, M. Schindler // Glycocong. Journal. – 1994. – Vol. 11(4). – P. 363–370.
170. Воробей Н. А. Реалізація азотфіксувального потенціалу Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* у симбіозі з рослинами сої / Н. А. Воробей, С. Я. Коць, П. М. Маменко // Biotechnologia Acta. – 2013. – Vol. 6(5). – С. 122–130.
171. Саимназаров Ю. Б. Биохимические показатели маша и арахиса при взаимодействии с клубеньковыми бактериями / Ю. Б. Саимназаров, И. У. Бахромов, Д. З. Пулатова, Н. А. Проворов // Физиология и биохимия культурных растений. – 1997. – № 6(29). – С. 450–454.
172. Онищук О. П. Идентификация новых генов клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti*, вовлеченных в контроль эффективности симбиоза с

- люцерной *Medicago sativa* / О. П. Онищук, О. Н. Курчак, Е. П. Чижевская и др. // Экологическая генетика. – 2014. – № 1(XII). – С. 39–47.
173. Онищук О. П. Оценка фенотипического проявления бактериальных генов, контролирующих эффективность азотфиксирующего симбиоза с растениями / О. П. Онищук, Н. А. Проворов, Н. И. Воробьев, Б. В. Симаров // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 1. – С. 32–43.
174. Aranjuelo I. Nodule performance within a changing environmental context / I. Aranjuelo, C. Arrese-Igor, G. J. Molero // Plant Physiology. – 2014. – Vol. 171(12). – P. 1076–1090.
175. Fox J. E. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants / J. E. Fox, J. Gullledge, E. Engelhaupt et al. // PNAS. – 2007. – Vol. 104(24). – P. 10282–10287.
176. Pudelko K. Influence of fungicide Funaben T on nodulation of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in the field conditions / K. Pudelko, C. J. Madrzak // Journal of Plant Protection Research. – 2004. – Vol. 44(2). – P. 155–160.
177. Guene N. F. D. Nodulation and nitrogen fixation of field grown common bean (*Phaseolus vulgaris*) as influenced by fungicide seed treatment / N. F. D. Guene, A. Diouf, M. Gueye // African Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 2(7). – P. 198–201.
178. Fletcher R. A. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants / R. A. Fletcher, A. Gilley, T. D. Davis, N. Sankhla // Horticultural Reviews. – 2000. – Vol. 24. – P. 55–138.
179. Черв'якова Л. М. Екотоксикологічна оцінка застосування пестицидів для захисту сільськогосподарських культур від шкідників і хвороб способом протруювання насіння / Л. М. Черв'якова, О. В. Балюх, Т. П. Панченко // Захист і карантин рослин. – 2014. – 60. – С. 465–472.
180. Фітофармакологія / [М. Д. Євтушенко, Ф. М. Марютін, В. П. Туренко та ін.] ; за ред. професорів М. Д. Євтушенка, Ф. М. Марютіна ; – К. : Вища освіта, 2004. – 432 с.