

ЧУТЛИВІСТЬ ЧИСТИХ КУЛЬТУР *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ДО ФУНГІЦИДІВ

К. П. Кукол, Н. А. Воробей, С. Я. Коць

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17; м. Київ, 03022, Україна; e-mail: katerinakukol@gmail.com

Мета. Провести скринінг широкого спектру штамів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum*, отриманих методом транспозонового мутагенезу, за чутливістю до фунгіцидів Февер, Стандак Топ, Аканто Плюс, Максим XL та Бенорад і отримати Tn5-мутанти, стійкі до різних норм вказаних пестицидів. **Методи.** Мікробіологічні, статистичні. **Результати.** В умовах лабораторних дослідів відібрано Tn5-мутанти *B. japonicum*, стійкі до виробничої та подвійної виробничої норм фунгіцидів Февер, Стандак Топ, Аканто Плюс, Максим XL та Бенорад. Показано, що діючі речовини препаратів із фунгіцидною активністю Февер, Стандак Топ, Аканто Плюс, Максим XL не чинять бактерицидної дії на життєздатність клітин більшості Tn5-мутантів, одержаних внаслідок міжродової кон'югації між *Escherichia coli* S17-1 з різними плазмідами-векторами і штамами *B. japonicum* 646 та 634б, а лише в окремих випадках послаблюють інтенсивність їх розмноження. Встановлено, що досліджувані Tn5-мутанти *B. japonicum* різною мірою чутливі до впливу рекомендованих виробником та удвічі збільшених норм препарату Бенорад на основі беномілу. 9 Tn5-мутантів оцінено як малочутливі до виробничої норми Бенораду, 11 характеризувалися вищою чутливістю до дії фунгіциду, про що свідчать зони затримки росту бактеріального газону навколо лунок із препаратом понад 15 мм. Вплив подвійної норми Бенораду на транспозонові мутанти виявився значно сильнішим, якщо порівняти з іншими фунгіцидами. Відібрано 3 Tn5-мутанти, малочутливі до впливу подвійної норми цього препарату, сповільнення репродукції клітин у цих варіантах дослідів становило 14–15 мм навколо лунок. **Висновки.** Застосування для сої бактеріальних добрив, виготовлених на основі Tn5-мутантів *B. japonicum*, резистентних до сучасних фунгіцидів, сприятиме послабленню наслідків хімічного стресу на формування та функціонування симбіотичних систем.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, соя, бульбочкові бактерії, транспозоновий мутагенез, фунгіциди, чутливість.

Вступ. Збільшення виробництва сої в Україні є одним із факторів інтенсифікації виробництва кормового білка та продукції тваринництва [1]. Усвідомлюючи стратегічне значення цієї культури у забезпеченні одержання високоякісних кормів та сировини для переробної і харчової промисловості, аграрії України збільшують посівні площі та удосконалюють елементи технології вирощування сої для підвищення її урожайності [2].

Однією з особливостей сої як бобової культури є здатність формувати урожаї повноцінного рослинного білка за рахунок фік-

сації з повітря до 50–70 % необхідного їй азоту [3]. В агроценозах України малопоширені або з'являються окремими осередками після застосування мікробних препаратів специфічні ризобії. Проте тривале сапрофітне існування бульбочкових бактерій призводить до зниження їх чисельності у ґрунті або до зникнення останніх через деякий час. Недостатня кількість цих мікроорганізмів у зоні проростання насіння сої спричинює зниження їх симбіотичного потенціалу. Тому обов'язковим агроприйомом у вирощуванні цієї культури повинна бути передпосівна обробка насіння біопрепаратами на основі високо-

ефективних конкурентоздатних штамів бульбочкових бактерій [1; 3].

Водночас за останні роки значно погіршилася фітосанітарна ситуація у посівах сої [1]. Відомо близько 120 збудників хвороб цієї культури, серед яких патогени грибної, бактеріальної і вірусної етіології, що здатні уражувати рослини у різні фази їх росту і розвитку. У посівах сої часто одночасно кілька збудників хвороб інфікують рослини, що призводить до зниження енергії проростання насіння та його схожості, зрідження посівів, зменшення фотосинтетичної поверхні листового апарату, як наслідок, зменшується урожайність зерна, вміст білка та жиру [4]. Для обмеження шкідливості хвороб сої використовують передпосівне протруювання насіння та обприскування рослин під час вегетації препаратами фунгіцидної дії. Оскільки більшість фунгіцидів — речовини хімічної природи, актуальним є встановлення чутливості активних штамів бульбочкових бактерій до препаратів на основі широкого спектру активних речовин, які використовують у сільськогосподарському виробництві як засоби захисту рослин (ЗЗР).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Система захисту сільськогосподарських культур від шкідливих організмів становить досить складний технологічний процес і здійснюється послідовним проведенням комплексу заходів. Хімічний метод захисту рослин займає чільне місце у системі контролю чисельності патогенів і фітофагів у багатьох країнах світу. Асортимент пестицидів, препаративні форми і способи їх застосування докорінно змінилися проти тих, які використовувалися у другій половині минулого століття. Сучасні препарати стали більш збалансованими за багатьма показниками, часто у їх складі по два-три компоненти активної речовини, що розширює спектр дії, спрощує дозування і приготування робочих розчинів [5].

У літературі є дані про те, що передпосівна інокуляція насіння препаратами азотфіксувальних бактерій сприяє зниженню ураженості рослин сої мікозами та бактеріозами, а також підвищенню урожаю зерна щодо контролю [6]. Однак, за виявлення ураження насіння збудниками хвороб, недотримання сівозмін, внаслідок чого патогени накопичуються у ґрунті, та при появі типових

симптомів патологічного процесу без застосування пестицидів не обійтись.

Перелік пестицидів та агрохімікатів, дозволених до застосування в Україні, щорічно поповнюється новими препаратами [7]. Широке застосування інокуляції бульбочковими бактеріями бобових культур для підвищення урожайності та поліпшення якості продукції спонукає до систематичної роботи над покращенням симбіотичних властивостей цих бактерій, а отже, ефективності бобово-ризобіального симбіозу [8].

Одним із ефективних сучасних методів отримання нових штамів бульбочкових бактерій є транспозоновий мутагенез, використання якого має низку переваг проти застосування традиційних підходів у селекції ризобій. Одержання транспозонових мутантів і дослідження їхніх властивостей має велике значення для розуміння процесів та вивчення механізмів, які лежать в основі формування та функціонування симбіотичних систем [9].

Як показує світова практика, селекція, спрямована на продуктивність та якість зерна без одночасного посилення імунної системи рослин, зумовлює генетичну вразливість сортів. Тому селекціонери працюють як над підвищенням потенціалу урожайності сортів, так і над посиленням імунітету рослин до шкідників та збудників хвороб. Водночас є потреба в ретельному дослідженні токсичної дії хімічних ЗЗР на мікро- і макросимбіоти та на бобово-ризобіальну систему загалом.

За даними літератури, у дослідях із визначення впливу протруйників із фунгіцидним ефектом на виживання *V. japonicum* на насінні, а також урожайність сої, встановлено, що препарати на основі карбендазіму та оксиду міді, карбоксину і тираму та пентсікуруну не знижували рівень виживання ризобій та зернову продуктивність культури. Тому їх рекомендують застосовувати сумісно з інокуляцією насіння сої. У результаті обробки посівного матеріалу препаратами з діючими речовинами кабрендазім та іпродіон, металаксил, гімексазол відмічено зниження чисельності клітин *V. japonicum* на насінні [10].

Отже, показано, що вплив протруйників насіння та фунгіцидів, що використовують для обприскування рослин під час вегетації,

на формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу залежить від діючих речовин препаратів, дотримання регламентів їх застосування і фізіолого-біохімічних властивостей бактерій — біоагентів мікробних препаратів.

Визначення у лабораторних умовах стійкості чистих культур бульбочкових бактерій, отриманих різними методами селекції, до дії фунгіцидних препаратів дозволить передбачити та попередити можливі негативні наслідки їх сумісного застосування на формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу у виробничих умовах.

Метою досліджень є проведення скринінгу широкого спектру штамів бульбочкових бактерій *B. japonicum*, отриманих методом транспозонового мутагенезу, за чутливістю до фунгіцидів Февер, Стандак Топ, Аканто Плюс, Максим XL та Бенорад і відбір Tn5-мутантів *B. japonicum*, стійких до різних норм вказаних пестицидів.

Матеріали та методи досліджень. У роботу залучені бульбочкові бактерії сої, отримані методом неспецифічного транспозонового мутагенезу внаслідок міжродової кон'югації між *Escherichia coli* S17-1 з різними плазмідами-векторами і штамми *B. japonicum* 646, 634б. Tn5-мутанти *B. japonicum* 646 (B16, B20, B75, B78, B82, B128, B130, B131, B137, B140, B144, B154, B157 B163), Tn5-мутанти *B. japonicum* 634б (Д1, Д36, Д37), отримані у результаті мутагенезу з *E. coli* S17-1, що містить плазмиду pSUP5011::Tn5 *mob*; Tn5-мутанти *B. japonicum* 646 (T17-2, T21-2, T9-1), одержані із застосуванням плазмиди pSUP2021::Tn5. Внаслідок кон'югації з *E. coli* ризобії набули здатності до репродукції на селективному середовищі МДА з канаміцином (200 мкг/мл), цим вони відрізняються від вихідних батьківських штамів. Вказані транспозонові мутанти зберігаються у колекції симбіотичних та асоціативних азотфіксуючих мікроорганізмів ІФРГ НАН України.

Для відновлення фізіологічної активності після зберігання в умовах музею за +4 °С бульбочкові бактерії *B. japonicum* вирощували на манітно-дріжджовому агарі (МДА), г/л: K₂HPO₄ — 0,5; MgSO₄·7H₂O — 0,2; NaCl — 0,1; маніт — 10,0; дріжджовий екстракт — 0,5; агар — 15,0–17,0; дист. вода, рН 6,8–7,0 за 28 °С протягом 5–7 діб.

Чутливість бульбочкових бактерій до впливу фунгіцидів вивчали методом лунок, висічених у пластинках агаризованого середовища в чашках Петрі [11]. Лунки діаметром 10 мм висічені в пластинках МДА стерильним металевим циліндром. Пластинки МДА засівали суцільним газоном бульбочкових бактерій згідно із загальноприйнятими методиками [12]. У лунки вносили по 80 мкл розчину фунгіциду та інкубували в термостаті 5 діб за температури 28 °С. Контролем слугували лунки в центрі агарової пластинки з 80 мкл стерильної водопровідної води. Повторність у варіантах досліду п'ятиразова.

У дослідженні використовували фунгіциди контактної-системної та системної дії з різними діючими речовинами:

1) Февер т. к. с. («Bayer CropScience AG», Німеччина) — протруйник контактної-системної дії з активною діючою речовиною протіокназол (300 г/л, підклас триазолінтіонів). Норма витрати препарату становить 0,2–0,4 л/т, використання робочого розчину — 10 л/т насіння;

2) Стандак Топ т. к. («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 становить 1–2 л/т, робочого розчину — 10 л/т насіння;

3) Аканто Плюс к. с. («DuPont», США) — двохкомпонентний фунгіцид на основі пікоксістробіну (200 г/л, клас стробілурини) + ципроконазол (80 г/л, клас триазоли). Робочим розчином препарату здійснюють обприскування рослин у період вегетації для захисту від широкого спектру хвороб листкового апарату з нормою витрати 0,5–0,75 л/га;

4) Максим XL 035 FS, т. к. с. («Syngenta», Швейцарія) — протруйник контактної і проникаючої дії проти широкого спектру найпоширеніших хвороб із діючими речовинами флудіоксоніл (25 г/л, клас фенілпіроли) та металаксил-М (10 г/л, клас феніламіди). Норма витрати препарату для обробки насіння сої становить 1,0 л/т, використання робочого розчину — 10 л/т насіння;

5) Бенорад — системний фунгіцид та протруйник посівного і посадкового матеріалу сільськогосподарських культур із дію-

чою речовиною беноміл (500 г/кг, клас бензімідазоли). Норма витрати препарату становить 2–3 кг/т насіння [7].

Робочі розчини фунгіцидів готували з огляду на концентрації препаратів, рекомендовані виробниками для протруювання насіння сої та обприскування посівів у період вегетації. У лабораторних дослідах чутливість ризобій до фунгіцидів оцінювали візуально та відмічали інтенсивність бактеріального росту навколо лунок: «++» — інтенсивний ріст; «+» — слабке пригнічення; «+—» — більш інтенсивне пригнічення; «—» — повна відсутність росту. Числовим показником зазначали розмір зон затримки росту бактеріального газону навколо лунок із пестицидом. Зони пригнічення росту бактерій навколо лунок, розмір яких не перевищує 15 мм, свідчить про слабку чутливість до препарату. Зона затримки росту від 15 до 25 мм фіксується у чутливих мікроорганізмів. Наявність зони розміром більш ніж 25 мм вказує на високу чутливість до препарату [11]. Відсутність затримки росту газону вказувала на резистентність мікроорганізмів до досліджуваної концентрації фунгіцидів. У лабораторних дослідах з відбору високоефективних штамів бульбочкових бактерій сої, отриманих методом транспозонового мутагенезу, досліджували їх стійкість до виробничої та подвійної виробничої норм ЗЗР.

Результати та обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що із широкого спектру залучених у роботу Tn5-мутантів, отриманих методом транспозоно-

вого мутагенезу із застосуванням різних плазмід-векторів, більшість виявилися стійкими до дії виробничої норми препарату Февер. Однак, відмічено наявність зон затримки росту до 5 мм у Tn5-мутантів B131, B157, T17-2 та T9-1, що свідчить про їх слабку чутливість до дії цього протруйника.

У варіантах досліду з Tn5-мутантами B75, T21-2 та Д36 не відмічено пригнічення росту бактеріального газону, проте колонії біля лунок були дещо світлішого кольору, менші за розміром, виділялися на загальному фоні газону специфічним «ореолом» навколо лунки з внесеним фунгіцидом.

Інноваційний протруйник Стандак Топ, застосований у виробничій нормі, не пригнічував ріст досліджуваних транспозононих мутантів. Усі Tn5-мутанти *B. japonicum* штамів 646 та 6346 були також не чутливі до дії препарату Аканто Плюс (рис. 1).

У подальших дослідженнях встановлено, що низка культур бульбочкових бактерій *B. japonicum*, отриманих методом транспозонового мутагенезу, не чутливі до токсичної дії фунгіциду Максим XL у лабораторних умовах. Показано, що вплив цього препарату проявляється від нейтрального до слабого пригнічення культурального росту ризобій навколо лунок, що засвідчує поява зон затримки росту розміром від 3,5 до 7,0 мм. Найбільш стійкими до впливу рекомендованої норми протруйника фунгіцидної дії Максим XL з-поміж інших відзначено Tn5-мутанти B20, B78, B128, B137, B144, B154, B163, T17-2, Д1, Д36, Д37 (табл. 1).

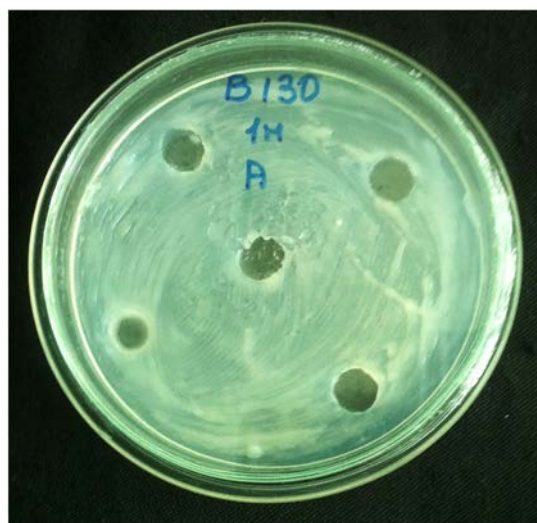
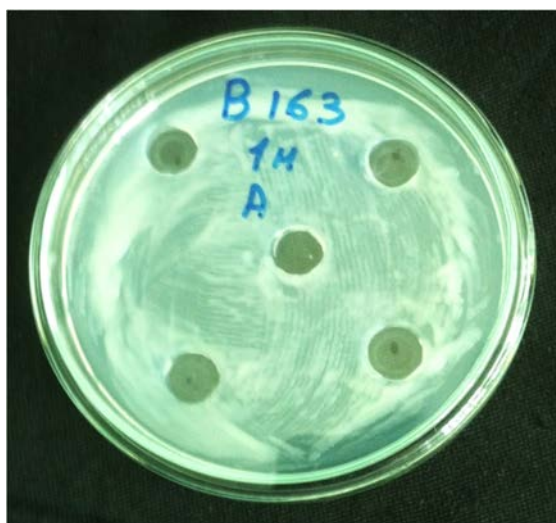


Рис. 1. Стійкість Tn5-мутантів *B. japonicum* B163 та B130 до 1 виробничої норми фунгіциду Аканто Плюс.

Таблиця 1. Чутливість бульбочкових бактерій *B. japonicum*, отриманих методом транспозонового мутагенезу, до виробничої норми фунгіцидів Февер, Стандак Топ, Аканто Плюс, Максим XL та Бенорад

Tn5-мутанти	Февер		Стандак Топ		Аканто Плюс		Максим XL		Бенорад	
	бактеріальний ріст									
	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б
B16	+++	0	+++	0	+++	0	++-	4,0	+-	18,0
B20	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	+-	13,0
B75	+++	0	+++	0	+++	0	+-	3,5	+-	18,0
B78	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	+-	14,0
B82	+++	0	+++	0	+++	0	+-	5,0	---	≥25,0
B128	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	---	19,0
B130	+++	0	+++	0	+++	0	+-	7,0	+-	15,0
B131	++-	4,0	+++	0	+++	0	++-	5,0	++-	8,0
B137	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	---	16,0
B140	+++	0	+++	0	+++	0	+-	7,0	---	17,0
B144	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	+-	14,0
B154	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	+-	15,0
B157	+++	5,0	+++	0	+++	0	+-	6,0	+-	13,0
B163	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	+-	15,0
T17-2	++-	5,0	+++	0	+++	0	+++	0	++-	8,0
T9-1	++-	4,0	+++	0	+++	0	+-	7,0	+-	10,0
T21-2	+++	0	+++	0	+++	0	+-	5,0	++-	13,0
Д1	+++	0	+++	0	+++	0	++-	0	+-	≥25,0
Д36	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	+-	15,0
Д37	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	+-	14,0

Примітка. У таблицях 1 і 2: а — інтенсивність росту, б — розмір зон пригнічення бактеріального росту, мм; «+++» — інтенсивний ріст, «++-» — слабе пригнічення, «+-» — більш інтенсивне пригнічення, «---» — повна відсутність бактеріального росту; ≥25 — розмір зони пригнічення понад 25 мм.

Оцінено як малочутливі до виробничої норми Бенораду 9 Tn5-мутанів *B. japonicum* B20, B78, B131, B144, B157, T9-1, T17-2, T21-2 та Д37, оскільки дія препарату призвела до незначного сповільнення репродукції клітин, водночас зони затримки росту бактеріального газону навколо лунок із фунгіцидом дорівнювали 8–15 мм. Інші 11 Tn5-мутантів — B16, B75, B82, B128, B130, B137, B140, B154, B163 Д1 та Д36 виявилися різною мірою чутливими до Бенораду. Зони затримки росту бактеріального газону, які фіксуються у чутливих мікроорганізмів, становили від 15 мм і більше. Серед них високочутливими до виробничої норми Бенораду були Tn5-мутанти B82 та Д1, зони затримки росту їх бактеріального газону навколо лунок становили понад 25 мм.

У роботах науковців із різних країн є дані про скринінг штамів бульбочкових бакте-

рій, стійких до діючих речовин препаратів із фунгіцидним ефектом [13; 14]. Так, наприклад, відібрано штами *B. japonicum*, стійкі до впливу різних норм тираму. Вони залишаються ефективними симбіонтами, тому препарати, виготовлені на їх основі, рекомендовано для інокуляції насіння, що обробляють протруйниками, у складі яких є тирам, без негативної дії на життєздатність бактерій. Водночас важливо дотримуватися рекомендованих виробником норм біопрепаратів та пестицидів [13].

Слід зауважити, що однією з причин надходження надмірної кількості хімічних засобів захисту рослин у агробіоценози є порушення регламентів їх застосування. У виробничих умовах не виключені неточності у розрахунках норм витрат концентрованих препаратів за приготування робочих розчинів для протруювання насіння або обприску-

вання посівів під час вегетації. За цих умов кількість внесеної діючої речовини може бути як меншою, так і більшою за норму, внаслідок чого порушується основна функція цієї технологічної операції за рахунок зміни впливу на цільові об'єкти, природні популяції мікроорганізмів та інтродуковані штами бульбочкових бактерій. Тому дослідження впливу підвищених норм препаратів фунгіцидної дії на корисну мікробіоту, зокрема й на активні, конкурентоздатні штами ризобій, також є обґрунтованим і актуальним.

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що з-поміж досліджуваних Tn5-мутантів *V. jarrowii* стійкими до дії подвійної виробничої норми препарату Февер були: B78, B82, B130, B137, B157, D36 та D37 (табл. 2). Виявлено слабку чутливість до подвійної норми Феверу у Tn5-мутантів B16, B20, B75, B128, B131, B140, B154, B163 і T21-2. Водночас відмічено ріст біля лунок та наявність незначних зон затримки росту бактеріального газону розміром 1,5–4 мм. За

дії подвійної норми Феверу відмічено зони затримки росту бактеріального газону чистих культур Tn5-мутантів T9-1, T17-2 та D1 розміром більше 25 мм, що свідчить про високу чутливість їх клітин до збільшеної концентрації протіоконазолу.

Подвійна виробнича норма протруйника Стандак Топ не мала негативного впливу на ріст Tn5-мутантів B16, B20, B130, B157, B163 та D36. Слабке пригнічення з наявністю росту відмічено у варіантах досліді з Tn5-мутантами B75, B78, B128, B140, B144, B154, T21-2 та D37 — зони затримки бактеріального росту становили від 1,5 до 3 мм. Токсичність діючих речовин препарату Стандак Топ за використання подвійної норми виявилася більшою щодо Феверу, оскільки за їх дії відмічено бактерицидний ефект щодо 6 Tn5-мутантів — B82, B131, B137, T9-1, T17-2 та D1. Можна припустити, що токсичність надмірної концентрації протруйника Стандак Топ щодо зазначених модифікованих мутагенезом ризобій зумовлена на-

Таблиця 2. Чутливість бульбочкових бактерій *V. jarrowii*, отриманих методом транспозонового мутагенезу, до подвійної виробничої норми фунгіцидів Февер, Стандак Топ, Аканто Плюс, Максим XL і Бенорад

Tn5-мутанти	Февер		Стандак Топ		Аканто Плюс		Максим XL		Бенорад	
	бактеріальний ріст									
	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б
B16	++-	1,5	+++	0	+++	0	++-	5,1	+--	14,0
B20	++-	2,0	+++	0	+++	0	+--	6,8	+--	14,0
B75	++-	2,5	++-	1,5	+++	0	++-	5,0	+--	20,0
B78	+++	0	++-	1,5	+++	0	+--	9,0	---	≥25
B82	+++	0	---	≥25	+++	0	+--	8,3	---	≥25
B128	++-	2,5	++-	1,5	+++	0	++-	6,3	++-	20,0
B130	+++	0	+++	0	+++	0	++-	5,4	---	≥25
B131	++-	4,0	---	≥25	---	≥25	++-	7,0	---	≥25
B137	+++	0	---	≥25	---	≥25	++-	7,0	---	≥25
B140	++-	7,0	++-	1,5	+++	0	++-	6,1	++-	17,0
B144	++-	1,5	++-	2,5	+++	0	++-	5,0	+--	14,0
B154	++-	3,0	++-	3,0	+++	0	++-	5,0	++-	21,0
B157	+++	0	+++	0	+++	0	++-	5,2	++-	15,0
B163	++-	2,5	+++	0	+++	0	++-	7,0	---	≥25
T9-1	---	≥25	---	≥25	---	≥25	---	≥ 25	---	≥25
T17-2	---	≥25	---	≥25	---	≥25	++-	5,5	---	≥25
T21-2	++-	3,0	++-	1,5	+++	0	++-	6,4	++-	14,0
D1	---	≥25	---	≥25	---	≥25	++-	5,0	---	≥25
D36	+++	0	+++	0	+++	0	++-	4,0	---	≥25
D37	+++	0	++-	1,5	+++	0	+--	8,0	---	≥25

явністю у складі препарату речовин із різних класів (фенілпіразоли, бензimidазоли та стробілурини).

Згідно з отриманими нами результатами 75 % досліджуваних Tn5-мутантів були стійкими до подвійної виробничої норми фунгіциду Аканто Плюс на основі пікоксістробіну та ципроконазолу (табл. 2).

Водночас 25 % мутантів *B. japonicum* були чутливі до подвійної концентрації досліджуваного препарату. Зони затримки росту бактеріального газону навколо лунок із подвійною нормою цього пестициду у Tn5-мутантів B131, B137, T9-1, T21-2 та D1 були понад 25 мм.

У результаті вивчення чутливості Tn5-мутантів *B. japonicum* до впливу подвійної норми фунгіциду Максим XL у більшості досліджуваних ризобій відмічено зони слабого пригнічення росту бактеріального газону (4,0–9,0 мм), що свідчить про їх слабку чутливість до застосованої дози вказаного препарату (рис. 3).

Отже, для сумісної обробки або розведеної в часі з інокуляцією бульбочковими бактеріями насіння сої фунгіцидом Максим XL або препаратами з такими ж діючими речовинами можна рекомендувати всі досліджувані транспозонові мутанти *B. japonicum*, за виключенням Tn5-мутанта T9-1 (pSup2021::Tn5mob), оскільки він є високочутливим до дії подвійної норми Максима XL (зона пригнічення бактеріального росту понад 25 мм).

Вплив подвійної норми Бенораду на досліджувані ризобії був значно сильнішим у порівнянні з підвищеними нормами інших препаратів. Більшість Tn5-мутантів *B. japonicum* були високочутливі до збільшеної норми Бенораду, зони затримки їх росту та розмноження навколо лунок становили понад 25 мм. Чутливими до подвійної норми Бено-

раду виявилися мутанти B140 і B154 (зона пригнічення 17–21 мм). Слабочутливими є Tn5-мутанти B16, B144 та B157 та високоефективні штами B20 і T21-2, оскільки застосування протруйника призводило до сповільнення репродукції клітин у межах 14–15 мм навколо лунок із фунгіцидом.

Загалом слід зазначити, що більшість досліджуваних культур є чутливішими до Бенораду проти впливу інших фунгіцидів, що проявлялося в істотному або повному пригніченні їх росту на МДА навколо лунок, заповнених вказаним пестицидом. Імовірно, що стійкість або чутливість пов'язані з культуральними та фізіолого-біохімічними особливостями бульбочкових бактерій. У різних групах за чутливістю відзначено як високоактивні за Eff⁺-фенотипом мутанти, так і ті, що мають помірні симбіотичні властивості та отримані за використання різних плазмідних векторів. Очікувано, що застосування подвійних (надмірних) норм хімічних засобів захисту рослин чинить значно агресивніший вплив на репродукцію клітин бульбочкових бактерій. Проведені дослідження сприяли відбору серед широкого спектру залучених у роботу культур ризобій найбільш стійких до фунгіцидів форм, що відкриває можливість рекомендувати їх до використання у технологіях вирощування сої та, зокрема, за передпосівної обробки насіння фунгіцидами сумісно з інокуляцією.

Науковцями ІФРГ НАН України в умовах польових дослідів вивчено реакцію симбіотичного апарату та насінневу продуктивність сої за різних способів обробки насіння фунгіцидами. Показано, що завчасне протруювання насіння не впливало на формування вегетативної маси рослин, процес формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу на відміну від обробки

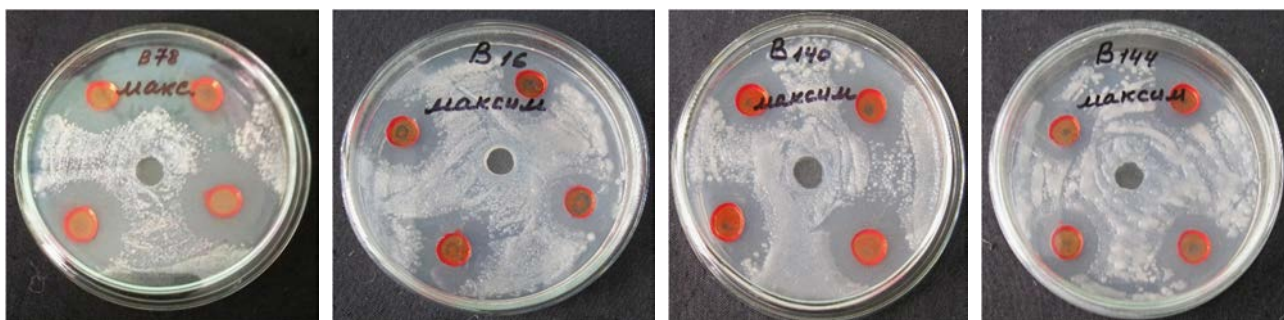


Рис. 2. Чутливість бульбочкових бактерій *B. japonicum* B78, B16, B140 та B144, отриманих методом транспозонового мутагенезу до подвійної норми фунгіциду Максим XL.

фунгіцидами в день посіву. Доведено, що в польових умовах токсичність фунгіцидів за обох способів обробки насіння була меншою проти умов вегетаційних модельних дослідів [15]. Це можна пояснити діяльністю мікробіоти ґрунту, безпосереднім впливом пестицидів на патогени, тобто реалізацією їх основного цільового призначення, та більш швидким процесом детоксикації хімічних сполук за дії низки абіотичних і біотичних факторів.

Drouin зі співавт. [16], перевіряючи вплив пестицидів на ріст 122 чистих культур ризобій, виявили найвищий рівень резистентності до інсектицидів та найбільш високу чутливість до токсичного впливу фунгіцидів. Водночас два препарати на основі каптану і манкоцебу, які використовуються для обмеження розвитку збудників хвороб, інгібували ріст більшості залучених у дослід мікроорганізмів-азотфіксаторів. Однак рекомендовані виробниками норми застосування хімічних ЗЗР у польових умовах не впливали на нодуляційну активність бульбочкових бактерій [16]. Діючі речовини, такі як карбоксин та карбоксин із каптаном, за виробничих норм використання не пригнічували утворення бульбочок на коренях сої і рівень азотфіксувальної активності. Проте вони негативно впливали на ці показники за десятикратно збільшених норм їх застосування [17].

Із літератури відомо, що застосування пестицидів у підвищених нормах призводить до глибоких змін обміну речовин у рослин на тривалий час. На певному рівні дії хімічних препаратів мобілізація захисних можливостей рослин виявляється недостатньою для подолання порушень фізіологічних та біохімічних процесів і в такому разі ці процеси стають незворотними [18]. Побічний вплив на мікроорганізми властивий для окремих пестицидів, що застосовуються в сільському господарстві з метою обмеження розвитку збудників хвороб, бур'янів і шкідників. Хімічні засоби захисту рослин, накопичуючись у ґрунті, можуть інгібувати або стимулювати розвиток корисної мікробіоти, а також патогенів, які не мають практичного значення за звичайних умов. Пряма або опосередкована дія пестицидів може поширюватися на розвиток збудників хвороб, ріст, споруляцію, проростання пропагул, виживання та активність ґрунтових грибів. Пес-

тициди можуть знижувати або збільшувати щільність інокулюму певних ґрунтових патогенів, змінювати механізми захисної системи рослини-господаря, а також взаємодію між мікоризоутворювачами та корінням рослин [19].

Пристосувальні реакції до дії хімічних засобів захисту рослин у мікроорганізмів можуть виявлятися у корекції біохімічних та фізіологічних процесів, що забезпечує їх подальше існування за умов антропогенного навантаження [20]. Також є дані про зміни у бактерій у складних системах морфології їх клітин під дією пестицидів або інших стрес-факторів [21].

Препарати, які застосовують для передпосівного протруювання насіння, можуть мати негативні побічні ефекти безпосередньо на рослину. Основними серед них вважаються пошкодження генетичного матеріалу оброблених рослин, пригнічення мітотичних процесів, затримка росту. Зокрема, на модельних рослинах *Vicia faba* L. та *Allium cepa* L. отримано дані щодо впливу пестицидів на поділ клітин та хромосомну морфологію меристематичних клітин кореня і пагона. Показано, що під дією пестицидів, особливо за високих норм витрат, може відбуватися індукція різноманітних хромосомних аномалій, таких як злипання, поділ хроматид, порушення у метафазі, С-мітоз, запізнення поділу та ін. [22; 23].

Незважаючи на значні зусилля, спрямовані на вивчення впливу пестицидів на екосистему, багато аспектів складно пояснити через різноманітні результати досліджень, висвітлених у літературі. Дискусійним залишається питання щодо впливу хімічних засобів захисту рослин на мікроорганізми та пов'язані з ними трансформації поживних речовин у ґрунті, оскільки різні групи пестицидів проявляють численні зміни рівнів токсичності. Інші фактори, як-от властивості ґрунтів, природа та концентрація застосовуваних пестицидів, мають також вплив на дію препаратів, яку вони чинять як на мікроорганізми, так і на культурні рослини.

Розуміння механізмів, які лежать в основі стійкості бактерій до діючих речовин пестицидів, може бути корисним для зменшення наслідків несприятливого впливу подібних стрес-факторів на мікробну різноманітність, ферментативну активність та біохімічні реа-

кції цих мікроорганізмів [24].

На цьому етапі нами не з'ясовано механізми стійкості бульбочкових бактерій до препаратів фунгіцидної дії, проте відібрано транспозонові мутанти, не чутливі до токсичної дії навіть подвійної виробничої норми препаратів Февер, Стандак Топ, Максим ХЛ і Бенорад, якими здійснюють передпосівне протруювання насіння, та фунгіциду Аканто Плюс для обприскування рослин сої під час вегетації.

Висновки. Застосування бактеріальних добрив для сої, виготовлених на основі штамів *B. japonicum*, резистентних до сучасних фунгіцидів, сприятиме послабленню наслідків хімічного стресу на формування та функціонування симбіотичних систем. Відтак збереження високого рівня азотфіксуючої активності симбіотичних систем «рослина – ризобії» та реалізація дії протруювання насіння або обприскування посівів у період вегетації створюють передумови для підвищення продуктивності рослин сої.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Мойсієнко В. В., Дідора В. Г. Агроекономічне обґрунтування ролі сої у вирішенні проблеми рослинного білка в Україні. *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету*. 2010. № 1 (26). С. 153–166.

2. Трибель С. О., Стригун О. О. Фітосанітарний стан агроценозів сої та інтегрований захист рослин. *Захист і карантин рослин*. 2011. 57. С. 224–246.

3. Дідович С. В., Абдурашитов С. В., Блажук С. Ф. Вплив мінеральних фосфорних добрив на ефективність симбіозу з ризобіями й ендомікоризними грибами. *Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН*. 2009. №14. С. 139–142.

4. Бабич А. О., Бабич-Побережна А. А. Селекція, виробництво, торгівля і використання сої у світі. К. : Аграрна наука, 2011. 548 с.

5. Трибель С. О., Стригун О. О., Гаманова О. М. Сучасний стан хімічного методу захисту рослин. *Карантин і захист рослин*. 2014. № 1 (210). С. 1–4.

6. Дерев'янський В. П. Біологізація живлення та захисту сої від хвороб. *Карантин і захист рослин*. 2012. № 3. С. 6–8.

7. Ящук В. У., Іванов Д. В., Кривошея Р. М., Цибульняк Ю. О., Корецький А. П. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. К. : Юнівест Медіа, 2018. 1040 с.

8. Коць С. Я., Воробей Н. А., Кириченко О. В., Мельникова Н. М., Михалків Л. М., Пухтаєвич П. П. Мікробіологічні препарати для сільського господарства. Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. К. : Логос, 2016. 48 с.

9. Коць С. Я., Мельник В. М., Даценко В. К. Транспозоновий мутагенез як ефективний метод отримання нових штамів бульбочкових бактерій. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія*. 2009. № 1. С. 6–18.

10. Revellin C., Leterme P., Catroux G. Effect of some fungicide treatments on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* and on the nodulation and yield of soybean [*Glycine max* (L) Merr.]. *Biology and Fertility of Soils*. 1993. № 16. P. 211–214. <https://doi.org/10.1007/BF00361410>

11. Алексеев О. О., Патица В. П., Гнатюк Т. Т. Взаємовідносини між *Bradyrhizobium japonicum* і збудниками бактеріозів сої та їх чутливість до пестицидів. *Молодий вчений*. 2016. № 12.1 (40). С. 50–63.

12. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М., Колотилова Н. Н., Котова И. Б., Семенова Е. В. ... Юдина Т. Г. Практикум по микробиологии. М. : Академия, 2005. 608 с.

13. Andres J. A., Correa N. S., Rosas S. B. Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram: isolation of fungicide resistant strains. *Biology and Fertility of Soils*. 1997. № 26. P. 141–145. <https://doi.org/10.1007/s003740050357>

14. Ahemad M., Khan M. S. Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. *Acta physiologiae plantarum*. 2012. № 34 (1). P. 245–254. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0823-8>

15. Павлице А. В., Якимчук Р. А., Омельчук С. В., Жемойда А. В., Коць С. Я. Симбіотичні властивості та насіннева продуктивність сої у польових умовах за різних способів обробки насіння фунгіцидами. *Фізіологія рослин і генетика*. 2018. 50, № 4. С. 358–368.

16. Drouin P., Sellami M., Prevost D., Fortin J., Antoun H. Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2010. 45(8). P. 780–788. <https://doi.org/10.1080/03601234.2010.515168>

17. Mallik M. A. B., Tesfai K. Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. *Plant and Soil*. 1985. 85. P. 33–41. <https://doi.org/10.1007/BF02197798>

18. Євтушенко М. Д., Марютін Ф. М., Туренко В. П., Жеребко В. М., Секун М. П. Фітофармакологія. К. : Вища освіта, 2004. 432 с.

19. Kortekamp A. Unexpected Side Effects of Herbicides: Modulation of Plant-Pathogen Interactions; Herbicides and Environment. Croatia, 2011. 760 p.
20. Stenersen J. Chemical pesticides: mode of action and toxicology. Boca Raton : CRC Press, 2004. 274 p.
21. Justice S. S., Hunstad D. A., Cegelski L., Hultgren S. J. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology*. 2008. 6 (2). P. 162–168.
22. Pandey R. Cytotoxic effects of pesticides in somatic cells of *Vicia faba* L. *Цитология и генетика*. 2008. 6. С. 13–18. <https://doi.org/10.3103/S0095452708060030>
23. Anirban P., Nag S., Sinha K. Cytological effect of blitox on root mitosis of *Allium cepa* L. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2013. 3. P. 1–7.
24. Hussain S., Siddique T., Saleem M., Arshad M., Khalid A. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in agronomy*. 2009. 102. P. 159–200. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(09\)01005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(09)01005-0)

Отримано 20.09.2019

<https://doi.org/10.35868/1997-3004.30.20-31>

UDC 631.847.211:632.952

SENSITIVITY OF PURE CULTURES OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* TO FUNGICIDES

K. P. Kukol, N. A. Vorobey, S. Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv
e-mail: katerinakukol@gmail.com

Objective. Conduct screening of a wide variety of transgenic mutagenesis strains of *Bradyrhizobium japonicum* nodule bacteria by the sensitivity to Fever, Standak Top, Akanto Plus, Maxym XL, and Benorad fungicides, and obtain Tn5 mutants resistant to different normal rates of the above pesticides. **Methods.** Microbiological, statistical. **Results.** Under the conditions of laboratory experiments, Tn5 mutants of *B. japonicum*, resistant to the production and dual production normal rate of Fever, Standak Top, Akanto Plus, Maxym XL, and Benorad, were selected. It was shown that the active substances of the products with fungicidal activity Fever, Standak Top, Akanto Plus, Maxym XL do not have bactericidal effect on cell viability of the majority of Tn5 mutants obtained as a result of intergeneric conjugation between *Escherichia coli* S17-1 with different plasmid vectors and strains of *B. japonicum* 646 and 634b, and only in some cases reduce the intensity of their reproduction. It was established that Tn5 mutants of *B. japonicum* under study have different sensitivity to the influence of the normal rates of benomil-based Benorad recommended by the manufacturer and twice-increased. Nine Tn5 mutants were evaluated as low-sensitive to the production normal rate of Benorad, 11 were characterized by a higher sensitivity to fungicide, as evidenced by the zones of delayed growth of bacterial lawn around wells with the product over 15 mm. The influence of the double Benorad normal rate on transposon mutants was significantly stronger compared with other fungicides. Three Tn5 mutants, low-sensitive to the influence of the double rate of this product were selected, and delay of the reproduction of cells in these variants of the experiment was 14–15 mm around the wells. **Conclusion.** The use of bacterial fertilizers for soybeans based on Tn5 mutants of *B. japonicum* resistant to modern fungicides will help to reduce the consequences of chemical stress on the formation and functioning of symbiotic systems.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, nodule bacteria, transposon mutagenesis, fungicides, sensitivity.

REFERENCES

1. Moisiyenko, V. V., & Didora, V. G. (2010). Agroekonomichne obruntuvannya roli soyi u vyrishenni problemy roslynnoho bilka v Ukraini [The agro-economic substantiation of the role of soybean in solving the problem of plant protein of Ukraine]. *Visnyk Zhytomyrskoho natsionalnoho ahroekologichnoho universytetu — Bulletin of the Zhytomyr National Agro-Ecological University*, 1 (26), 153–166 [in Ukrainian].
2. Tribel, S. A., & Strygun, O. O. (2011). Fitosanitarnyi stan agrocenoziv soyi ta integrovanyi zakhyst roslyn [Phytosanitary situation of the soybean agrocenoses and integrated plant protection]. *Zahyst i karantyn roslyn — Plant protection and quarantine*, 57, 224–246 [in Ukrainian].
3. Didovich, S. V., Abdurashitov, S. F., & Blazhuk, S. V. (2009). Vplyv mineralnykh fosfornykh dobryv na efektyvnist symbiozu z ryzobiyamy i endomikoryznymy grybamy [The influence of mineral phosphoric fertilizers on efficiency of the symbiosis of soybean with Rhizobium and endomycorrhizal fungi]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu oliinykh kultur UAAN — Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Oilseed Crops UAAS*, 14, 139–142 [in Ukrainian].
4. Babych, A. O., & Babych-Poberezhna, A. A. (2011). *Selektciya, vyrobnyctvo, torgivlia i vykorystannja soyi u sviti* [Selection, production, trade and use of soybeans in the world]. Kyiv : Agrarna nauka [in Ukrainian].
5. Trybel, S. O., Strygun, O. O., & Gamanova, O. M. (2014). Suchasnyi stan khimichnoho metodu zakhystu roslyn [Current state of a chemical method of plant protection]. *Karantyn i zahyst roslyn — Quarantine and plant protection*, 1 (210), 1–4 [in Ukrainian].
6. Derevyanskyi, V. P. (2012). Biologizaciya zhyvlennya ta zahystu soyi vid khvorob. [Biologization of soybean nutrition and protection from diseases]. *Karantyn i zahyst roslyn — Quarantine and plant protection*, 3, 6–8 [in Ukrainian].
7. Yaschuk, V. U., Ivanov, D. V., Krivosheya, R. M., Tsibulnyak, Yu. O., & Koretskiy, A. P. (2018). *Perelik pestytsydiv i agrokhimikativ dozvolenykh do vykorystannya v Ukraini* [The list of pesticides and agrochemicals permitted for use in Ukraine]. Kyiv: Yunivest Media [in Ukrainian].
8. Kots, S. Ya., Vorobey, N. A., Kyrychenko, O. V., Melnykova, N. N., Mykhalkiv, L. M., & Pukhtayevych, P. P. (2016). Mikrobiologichni preparaty dlya sil's'kogo gospodarstva. Instytut fiziologii roslyn i genetyky NAN Ukrainy. [Microbiological preparations for agriculture. Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine]. Kyiv: Logos [in Ukrainian].
9. Kots, S. Ya., Melnyk, V. M., & Datsenko, V. K. Transpozonyj mutagenez yak efektyvnyj metod otrymannya novykh shtamiv bulbochkovykh bakterij [Transposon mutagenesis as the effective mean to obtain the new strains of nodule bacteria]. *Visnyk Harkivskogo nacional'noho agrarnogo universytetu. Seriya: Biologiya — The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, 1, 6–18 [in Ukrainian].
10. Revellin, C., Leterme, P., & Catroux, G. (1993). Effect of some fungicide seed treatments on the survival of Bradyrhizobium japonicum and on the nodulation and yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Biology and Fertility of Soils*, 16(3), 211–214. <https://doi.org/10.1007/BF00361410>
11. Alekseyev, O. O., Patyka, V. P., & Gnatiyk, T. T. (2016). Vzayemovidnosyny mizh Bradyrhizobium japonicum i zbudnykamy bakterioziv soyi ta yikh chutlyvist' do pestytsydiv. [The relationship between Bradyrhizobium japonicum and soybean bacteriosis pathogens and their sensitivity to pesticides]. *Molodiy vcheniy — Young scientist*, 12.1 (40), 50–63 [in Ukrainian].
12. Netrusov, A. I., Egorova, M. A., Zakhar-chuk, L. M., Kolotilova N. N., Kotova, I. B., Semenova, E. V. ... Yudina, T. G (2005). *Praktikum po mikrobiologii* [Practice on microbiology]. Moskva: Akademyia [in Russian].
13. Andres, J. A., Correa, N. S., & Rosas, S. B. (1997). Survival and symbiotic properties of Bradyrhizobium japonicum in the presence of thiram: isolation of fungicide resistant strains. *Biology and fertility of soils*, 26 (2), 141–145. <https://doi.org/10.1007/s003740050357>
14. Ahemad, M., & Khan, M. S. (2012). Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting Bradyrhizobium sp. MRM6 strain. *Acta physiologicae plantarum*, 34 (1), 245–254. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0823-8>
15. Pavlyshche, A. V., Yakimchyk, R. A., Omelchyk, S. V., Zhemioda, A. V., & Kots, S. Ya. Symbiotychni vlastyvoli ta nasinnyeva produktyvnist soyi u pol'ovykh umovakh za riznykh sposobiv obrobky nasynnya fungicydamy [Symbiotic properties and seed productivity of soybean in field conditions under various methods of seed treatment with fungicides]. *Fisiol. rast. Genet — Plant physiology and genetics*, 50 (4), 358–368 [in Ukrainian].
16. Drouin, P., Sellami, M., Prevost, D., Fortin, J., & Antoun, H. (2010) Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 45(8). 780–788. <https://doi.org/10.1080/03601234.2010.515168>
17. Mallik, M. A. B., & Tesfai, K. (1985). Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. *Plant and Soil*, 85 (1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/BF02197798>

18. Yevtushenko, M. D., Maryutin, F. M., Turenko, V. P., Zherebko, V. M., & Sekun, M. P. (2004). *Fitofarmakologiya* [Phytopharmacology]. Kyiv: Vyshcha osvita [in Ukrainian].
19. Kortekamp, A. (2011). *Unexpected Side Effects of Herbicides: Modulation of Plant-Pathogen Interactions; Herbicides and Environment*. Croatia.
20. Stenersen, J. (2004). *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. Boca Raton: CRC Press.
21. Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L., & Hultgren, S. J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (2), 162–168.
22. Pandey, R. (2008). Cytotoxic effects of pesticides in somatic cells of *Vicia faba* L. *Tsitologiya i genetika*, No. 6, 13–18. <https://doi.org/10.3103/S0095452708060030>
23. Anirban, P., Nag, S., & Sinha, K. (2013). Cytological effect of blitox on root mitosis of *Allium cepa* L. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3, 1–7.
24. Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., & Khalid, A. (2009). Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in agronomy*, 102, 159–200.

Received 20.09.2019