

УДК 576.871.155.557

## ХАРАКТЕРИСТИКА БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ *SINORHIZOBIUM MELILOTI*, ВИДІЛЕНИХ ІЗ БІОЦЕНОЗІВ ЗОНИ ПОЛІССЯ УКРАЇНИ, ЗА СИМБІОТИЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ

Н.А. ВОРОБЕЙ, С.Я. КОЦЬ

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: n-vorobey@ukr.net

Досліджено особливості азотфіксації люцерни в симбіозі з ризобіями, виділеними з корневих бульбочок рослин біоценозів зони Полісся України. Унаслідок штучної бактеризації люцерни сорту Ярославна ізолятами інтенсифікується асиміляція  $N_2$ , активується вегетативний ріст, збільшується вміст хлорофілу у листках рослин порівняно із застосуванням виробничого штаму 425a *S. meliloti*. Відмічено різну динаміку азотфіксуючої активності бульбочок люцерни протягом вегетаційного періоду залежно від мікросимбіонта. За інокуляції ізолятом АС08 бульбочки утворювались інтенсивніше у ранні фази розвитку люцерни, що сприяло підвищенню активності азотфіксації в цей період. Ізоляти АС08 і АС88 *S. meliloti* відібрано за симбіотичними показниками з метою подальшого випробування та впровадження їх як бактеріальної основи у виробництво добрива — ризостиму.

*Ключові слова:* *Sinorhizobium meliloti*, бульбочкові бактерії, люцерна, симбіоз, азотфіксація.

Здатність бобових рослин у симбіозі з бульбочковими бактеріями засвоювати атмосферний азот значно поширена в природі та забезпечує їм екологічні переваги в умовах дефіциту азоту. Використання цієї властивості в сільськогосподарській практиці дає змогу істотно зменшити або повністю виключити застосування мінеральних азотних добрив без істотного зниження урожайності бобових культур і зберегти при цьому родючість ґрунту [8, 10, 11].

Актуальним завданням сьогодення у сфері біологічної азотфіксації є розробка препаратів для стимулювання росту, розвитку бобових рослин, посилення їх продуктивності в результаті використання симбіотрофного азоту. Біопрепарати, створені на основі вискоєфективних штамів бульбочкових бактерій для інокуляції бобових культур, сприяють збагаченню ґрунту екологічно чистим азотом, підвищують урожай і поліпшують якісний склад рослинної продукції [7, 14].

Одним із методів отримання господарсько-цінних штамів бульбочкових бактерій є аналітична селекція, яка не втратила практичного значення і сьогодні [1, 5, 15, 17—19]. При цьому вихідним матеріалом слугують ризобії, виділені з корневих бульбочок рослин або безпосередньо з мікробних ценозів ґрунту [18, 19]. Проте за активністю асиміляції атмосферного азоту вони нерідко поступаються штамам, які вже використовуються як бактеріальна основа при виготовленні нітрагіну та набули

статусу виробничих [19]. Виділити з біоценозів нові культури ризобій, активніші за існуючі виробничі та музейні штами, стає дедалі складніше, оскільки інтенсивність азотфіксації обмежується як можливостями геному мікросимбіонта, так і енергетичними затратами рослини-хазяїна [13]. Їстотною перевагою «природних» культур бульбочкових бактерій є пристосованість до ґрунтово-кліматичних умов тієї чи іншої географічної зони їх походження. Звідси випливає, що ці культури потенційно висококонтурентоздатні, швидко приживаються при інтродукції їх у відповідну екологічну нішу і не впливають на структуру мікробної спільноти ґрунту. Штами *Rhizobium*, відібрані з природних популяцій на основі «сапрофітної конкуренції», тобто здатності утворювати колонії в ґрунті за відсутності рослини-хазяїна та симбіоз зі специфічними рослинами, є перспективною генетичною базою для селекції високоактивних штамів, адаптованих до певних ґрунтово-кліматичних умов. Водночас можна поліпшити симбіотичні властивості аналітично селекціонованих бульбочкових бактерій, використавши їх як вихідні (батьківські) при отриманні нових штамів генно-інженерними методами [14].

Важливо зазначити, що за своєю природою вид *Sinorhizobium meliloti* є факультативним симбіотичним азотфіксатором, здатним як до сапрофітного існування в ґрунті за відсутності рослини-хазяїна, так і до формування симбіозу. Відомо, що найпродуктивніший симбіоз виникає у випадку, коли рослина-хазяїн і популяція бактерій еволюціонували разом [7, 12].

Оскільки ефективність симбіозу великою мірою залежить від добору сортів вирощуваних бобових рослин і комплементарних їм активних штамів бульбочкових бактерій, у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики (ІФРГ) НАН України постійно проводиться селекційна робота, спрямована на добір найактивніших форм ризобій, виділених із бульбочок рослин природних ценозів і безпосередньо з мікробіоти ґрунту, до районуваних сортів люцерни [2, 6, 7].

Метою цієї роботи є оцінювання азотфіксувальної здатності та ефективності бобово-ризобіального симбіозу люцерни посівної сорту Ярославна, районуваного в умовах Полісся і Лісостепу України, з бульбочковими бактеріями *S. meliloti*, які належать до ґрунтових культур — «аборигенів» зони Полісся.

## Методика

Вегетаційні дослідження проводили з рослинами люцерни (*Medicago sativa* L.) сорту Ярославна селекції Інституту землеробства НААН України на вегетаційному майданчику Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Рослини вирощували в 10-кілограмових пластикових посудинах на субстраті, яким слугував річковий пісок. Джерелом мінерального живлення була поживна суміш Гельригеля [3], збагачена мікроелементами молібденом, бором і міддю та збіднена на азот — 0,2 норми (1 норма відповідає  $708 \text{ мг Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  на 1 кг піску) за Гельригелем.

Як інокулянти використано бульбочкові бактерії *S. meliloti* з музейної колекції ІФРГ НАН України: штами-контролі — виробничий штам 425a (аналітичної селекції ВНДІСГМ, Санкт-Петербург), активний Tn5-мутант T17 штаму 425a [16] та аналітично селекціоновані культури AC08, AC28, AC48, AC88 (ізоляти, виділені з кореневих бульбочок люцерни природних ценозів зони Полісся України (Житомирська обл., Коростенський р-н, червень 2008 р.). Бульбочкові бактерії вирощували на ага-

ризованому середовищі 79 ( $K_2HPO_4$  — 0,5 г/л,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,2,  $NaCl$  — 0,1,  $CaCO_3$  — сліди, казамінокислоти, або гідролізат лактоальбуміну — 0,1 % (1 г), маніт — 10,0, агар — 17,0, дистильована вода) при +28 °С упродовж 5 діб — до кінця експоненціальної фази росту. Для приготування інокуляційних суспензій біомасу бактеріальних клітин змивали з поверхні агару стерильною водою, суспендували, вирівнювали за стандартом каламутності. Бактеріальний титр суспензій відповідав  $10^9$  клітин/мл. Насіння стерилізували протягом 15 хв 70 %-м етанолом, промивали під проточною водою 2 год та інокулювали бульбочковими бактеріями упродовж 30 хв. Повторність варіантів у вегетаційному досліді п'ятиразова, у кожній посудині вирощували по 8 рослин за вологості піску 60 % повної вологоємності (ПВ) і природного освітлення. Фізіологічні показники вимірювали у фази стеблуння — 25-та та 32-га доби, бутонізації — 40-ва, початку цвітіння — 50-та і цвітіння — 58-ма доба після сходів насіння люцерни. Перший укіс надземної маси проводили в період бутонізації—початку цвітіння рослин, другий — в аналогічний період після скошування та відростання люцерни.

Нітрогеназну активність (азотфіксацію) визначали за рівнем ацетиленвідновлювальної активності (АВА) бульбочок ацетиленовим методом [9]. Газову суміш аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6855 Network GC System (визначення проводили у п'ятиразовій повторності). Вміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин визначали за методикою Веллбуерна [20]. Для цього відбирали проби листків із середніх ярусів п'яти рендомізованих рослин одного варіанта. Вимірювання проводили у триразовій біологічній повторності. Пігменти екстрагували диметилсульфоксидом (ДМСО) (на 100 мг рослинного матеріалу 10 мл ДМСО). Оптичну густина розчину визначали на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО, Росія) за 649 нм (хлорофіл *a*), 665 (хлорофіл *b*), 652 (сума хлорофілів) і 480 нм (каротиноїди) у кюветі з товщиною шару розчину 1 см. Експериментальні дані статистично оброблені за Доспеховим [4] та з використанням програми Microsoft Excel 2010. У таблицях наведено середньоарифметичні значення показників та їх стандартні похибки.

### Результати та обговорення

У результаті дослідження виявлено особливості симбіотичної азотфіксації люцерни сорту Ярославна за інокуляції ізолятами протягом періоду вегетації рослин. Встановлено, що симбіотичні пари люцерна—ризобії, утворені за участю різних культур бульбочкових бактерій, відрізнялися між собою за типом динаміки та інтенсивністю фіксації атмосферного азоту. Зокрема бульбочки, сформовані за участю ізолятів АС28 і АС48, мали низький рівень ацетиленвідновлювальної активності у фази стеблуння і бутонізації люцерни. Однак із початком формування генеративних органів активність асиміляції атмосферного азоту люцерною у симбіозі з ризобіями АС28 швидко наростала і стабілізувалася на досягнутому рівні на 58-му добу вегетації рослин, хоча й поступалась іншим варіантам за цим показником (табл. 1). Водночас максимальний показник азотфіксувальної активності бульбочок рослин, бактеризованих ризобіями АС48 (який поступався АВА Тп5-мутанта Т17), відмічено у фазу цвітіння люцерни (58-ма доба після появи сходів). Ізолят АС48 є мікросимбіонтом із максимальною активністю нітрогенази у фазу

ТАБЛИЦЯ 1. Динаміка азотфіксувальної активності кореневих бульбочок люцерни, утворених за участю ізолятів *S. meliloti*, виділених із біоценозів Полісся України

Інокулянт	Азотфіксувальна активність, мкмоль С <sub>2</sub> Н <sub>4</sub> /(рослину · год)						Сумарна за період визначень
	Фаза розвитку рослин, доба після появи сходів						
	Стеблування, 25-та	Стеблування, 32-та	Бутонізація, 40-ва	Початок цвітіння, 50-та	Цвітіння, 58-ма		
Без інокуляції	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. meliloti</i>	0,61±0,02	0,95±0,03	2,76±0,78	7,80±0,88	7,28±0,92	18,45	18,45
T17	2,24±0,15	2,99±0,62	5,30±0,71	5,60±0,63	17,84±0,23	33,97	33,97
AC08	3,39±0,14	4,47±0,15	3,96±0,98	2,23±0,29	10,11±0,47	24,16	24,16
AC28	0,09±0,00	1,66±0,40	1,12±0,03	5,46±0,71	5,61±0,39	13,94	13,94
AC48	0,04±0,005	0,25±0,01	1,16±0,05	2,27±0,16	15,72±0,60	19,62	19,62
AC88	0,48±0,03	1,70±0,33	2,57±0,17	1,43±0,09	15,55±1,30	21,73	21,73

ТАБЛИЦЯ 2. Кількість та маса кореневих бульбочок у люцерни, інокульованої ізолятами *S. meliloti*, які виділені з біоценозів Полісся України

Інокулянт	Динаміка утворення бульбочок, шт./рослину						Маса бульбочок, мг./рослину		
	Фаза розвитку рослин, доба після появи сходів								
	Стеблування, 25-та	Стеблування, 32-та	Бутонізація, 40-ва	Початок цвітіння, 50-та	Цвітіння, 58-ма	Початок цвітіння, 50-та	Цвітіння, 58-ма		
Без інокуляції	0	0	0	0	0	0	0	0,01±0,00	
<i>S. meliloti</i> 425a	3,6±0,5	3,5±0,5	10,2±1,0	24,0±1,7	87,3±7,2	0,18±0,02	0,21±0,05	0,21±0,05	
T17	3,3±0,7	2,2±0,6	8,0±0,5	36,0±3,2	43,0±4,4	0,26±0,01	0,19±0,02	0,19±0,02	
AC08	6,7±0,5	7,5±0,5	27,5±2,2	27,3±2,2	41,7±2,4	0,13±0,01	0,16±0,01	0,16±0,01	
AC28	2,5±0,5	3,2±0,2	15,2±2,0	83,7±3,0	70,3±1,4	0,27±0,03	0,31±0,02	0,31±0,02	
AC48	0,5±0,0	4,2±0,5	8,2±0,3	39,3±3,0	37,7±2,4	0,11±0,02	0,18±0,04	0,18±0,04	
AC 88	2,0±0,5	5,5±0,3	10,5±1,3	41,3±3,0	56,0±5,0	0,11±0,01	0,25±0,07	0,25±0,07	

цвітіння і може бути використаний як компонент при створенні комплексних азотфіксувальних препаратів на основі штамів із різними типами динаміки для забезпечення оптимального рівня асиміляції азоту протягом онтогенезу люцерни.

У фазу стеблуння люцерни АВА бульбочок, утворених ізолятом АС08, була найвищою серед досліджених варіантів і в 1,5 раза переважає показник високоактивного мутанта Т17 *S. meliloti*. Слід зазначити, що ізолят АС08 у ранні фази становлення симбіозу з люцерною сорту Ярославна виявив високу нодуляційну здатність і перевищував цей показник інших мікросимбіонтів у 1,4–2,3 у фазу стеблуння та в 1,8–3,4 раза — у фазу бутонізації. Отже, ізолят АС08 здатний до активної азотфіксації у ранній період функціонування бобово-ризобіального симбіозу, що є його відмінною ознакою. В подальшому інтенсивність асиміляції  $N_2$  бульбочками люцерни, утвореними АС08 і АС88, істотно змінювалась порівняно з відповідним показником у фазу бутонізації рослин. Зокрема у фазу початку цвітіння вона зменшувалась, у період цвітіння рослин азотфіксувальна активність мікросимбіонтів АС88, АС08 збільшувалась, перевищувала відповідно в 2,1 та 2,4 раза штаму 425а і наближалась до аналогічного показника Тn5-мутанта Т17 *S. meliloti*.

Динаміка АВА бульбочок штамів 425а, Т17 *S. meliloti* була подібною протягом фаз стеблуння, бутонізації й початку цвітіння люцерни та істотно відрізнялась у фазу цвітіння рослин. На 50-ту добу вегетативного росту рослин (початок цвітіння) АВА симбіотичних систем за участю штаму 425а досягала максимуму з тенденцією до її зниження в період цвітіння рослин. У цей самий час інтенсивність азотфіксації бульбочок люцерни, утворених мутантом Т17, становила 5,60 проти 7,80 мкмоль  $C_2H_4$ /(рослину · год) ризобій штаму 425а. Найвищий рівень азотфіксувальної активності у люцерни, інокульованої мутантом Т17, за період дослідження спостерігали у фазу цвітіння рослин. Отже, симбіотичні системи, утворені за участю досліджуваних культур бульбочкових бактерій, відрізнялись не тільки за інтенсивністю азотфіксації, а й мали різну динаміку залежно від штаму-інокулянту. Виявлено, що ризобії АС08, АС48, АС88 здатні до інтенсивнішої азотфіксації у період цвітіння люцерни порівняно з бульбочками, утвореними виробничим штамом 425а (див. табл. 1). Ізоляти АС88 і АС08 перевищували виробничий штаму 425а на 17,8–31,0 % за сумарною АВА за період визначень (25–58-ма доби після появи сходів), проте поступалися за цим показником відповідно на 36,0 і 29,0 % Тn5-мутанту Т17.

У фазу початку цвітіння і цвітіння найбільші маси бульбочок формувались у рослин, інокульованих ізолятом *S. meliloti* АС28 (табл. 2), що супроводжувалось незначним зростанням азотфіксувальної активності симбіотичної системи люцерни у цей період (див. табл. 1). Однак активність фіксації азоту бульбочками ізоляту АС28 у фазу цвітіння поступалася рослинам інших варіантів досліду, оскільки загальна маса бульбочок фактично забезпечувалась збільшенням їх кількості, ймовірно за рахунок пролонгованого періоду інвазії до коренів рослин цих ризобій (див. табл. 2). Слід зазначити, що у фазу цвітіння кількість кореневих бульбочок у рослин, інокульованих ізолятом АС28, у 2–3 рази перевищувала цей показник інших варіантів.

Стимулювальний вплив бактеризації ізолятами підтверджено збільшенням надземної маси рослин у середньому в 1,2 раза порівняно

ТАБЛИЦЯ 3. Динаміка наростання вегетативної маси люцерни, інкульованої ізолятами *S. meliloti*

Інкулянт	Фаза розвитку рослини, доба після появи сходів					Цвітіння, 58-ма
	Стеблуння, 25-га	Стеблуння, 32-га	Бутонізація, 40-ва	Початок цвітіння, 50-га		
Без інкуляції	$\frac{1,19 \pm 0,03}{0,67 \pm 0,06}$	$\frac{1,28 \pm 0,02}{0,82 \pm 0,06}$	$\frac{1,87 \pm 0,03}{1,61 \pm 0,06}$	$\frac{2,32 \pm 0,09}{2,79 \pm 0,01}$	$\frac{3,52 \pm 0,18}{3,66 \pm 0,22}$	
<i>S. meliloti</i> 425a	$\frac{1,45 \pm 0,05}{0,81 \pm 0,08}$	$\frac{1,52 \pm 0,05}{1,12 \pm 0,01}$	$\frac{2,15 \pm 0,09}{2,27 \pm 0,19}$	$\frac{3,53 \pm 0,14}{4,39 \pm 0,39}$	$\frac{4,75 \pm 0,50}{5,18 \pm 0,30}$	
T17	$\frac{1,59 \pm 0,04}{0,84 \pm 0,07}$	$\frac{1,68 \pm 0,05}{1,20 \pm 0,07}$	$\frac{2,00 \pm 0,09}{2,30 \pm 0,07}$	$\frac{3,63 \pm 0,16}{3,92 \pm 0,14}$	$\frac{5,37 \pm 0,27}{5,39 \pm 0,45}$	
AC08	$\frac{1,45 \pm 0,02}{0,81 \pm 0,05}$	$\frac{1,55 \pm 0,05}{1,16 \pm 0,03}$	$\frac{2,40 \pm 0,09}{2,17 \pm 0,19}$	$\frac{3,60 \pm 0,20}{3,79 \pm 0,32}$	$\frac{5,20 \pm 0,26}{5,39 \pm 0,35}$	
AC28	$\frac{1,42 \pm 0,07}{0,80 \pm 0,04}$	$\frac{1,49 \pm 0,04}{1,14 \pm 0,02}$	$\frac{2,01 \pm 0,06}{1,75 \pm 0,14}$	$\frac{3,49 \pm 0,14}{4,57 \pm 0,16}$	$\frac{4,62 \pm 0,22}{4,86 \pm 0,36}$	
AC48	$\frac{1,45 \pm 0,06}{0,76 \pm 0,07}$	$\frac{1,51 \pm 0,04}{1,14 \pm 0,03}$	$\frac{1,90 \pm 0,08}{1,78 \pm 0,09}$	$\frac{3,30 \pm 0,18}{3,40 \pm 0,23}$	$\frac{4,58 \pm 0,34}{4,60 \pm 0,40}$	
AC88	$\frac{1,50 \pm 0,05}{0,74 \pm 0,03}$	$\frac{1,52 \pm 0,07}{1,11 \pm 0,02}$	$\frac{2,38 \pm 0,09}{1,74 \pm 0,08}$	$\frac{3,50 \pm 0,18}{3,46 \pm 0,12}$	$\frac{5,10 \pm 0,15}{5,55 \pm 0,40}$	

Примітка: над рискою — надземна маса, під рискою — маса кореня рослини (г).

ТАБЛИЦЯ 4. Продуктивність люцерни сорту Ярославна (маса надземної частини), інкульованої ізолятами, виділеними з біоценозів Полісся України (вегетативний дослід)

Інкулянт	Продуктивність, г/посудину									
	Сира речовина					Суша речовина				
	І укiс, 10.07.09	II укiс, 07.08.09	Сумарний урожай	% штаму 425a	І укiс, 10.07.09	II укiс, 07.08.09	Сумарний урожай	% штаму 425a		
Без інокуляції	17,68±0,51	19,70±0,64	37,38	113,9	5,96±0,27	6,01±0,38	11,97	77,7		
<i>S. meliloti</i> 425a	22,20±0,58	22,44±1,32	44,44	—	7,56±0,17	7,84±0,32	15,4	—		
T17	24,81±0,48	25,17±0,30	49,98	112,5	8,90±0,10	8,92±0,14	17,82	115,7		
AC08	24,20±0,57	24,96±0,39	49,16	110,6	8,56±0,23	8,80±0,24	17,36	112,7		
AC28	20,98±0,42	22,31±0,48	43,29	97,4	7,51±0,32	7,86±0,08	15,37	100,0		
AC48	19,84±0,37	21,90±0,80	41,74	93,9	6,67±0,26	7,82±0,23	14,49	96,0		
AC88	23,38±0,23	25,16±1,36	48,54	109,2	8,56±0,28	8,66±0,28	17,22	111,8		
НП <sub>0,5</sub>	1,4	2,5			0,8	0,7				

ТАБЛИЦЯ 5. Вміст фотосинтетичних пігментів у листках люцерни, інокульованої ізолятами, виділеними з біоценозів Полісся України (фаза розвитку рослин — цвітіння)

Інокулянт	Хлорофіл, мг/г сирової речовини		Каротиноїди, мг/г сирової речовини
	<i>a</i>	<i>b</i>	
Без інокуляції	0,71±0,05	0,24±0,01	0,15±0,01
<i>S. meliloti</i> 425a	1,14±0,05	0,36±0,01	0,25±0,01
T17	1,32±0,03	0,47±0,01	0,28±0,01
AC08	1,19±0,09	0,39±0,03	0,24±0,02
AC28	1,02±0,06	0,32±0,01	0,21±0,01
AC48	1,40±0,07	0,42±0,02	0,28±0,02
AC88	1,29±0,03*	0,45±0,01	0,27±0,01

\*Достовірна різниця зі штамом *S. meliloti* 425a.

з варіантом без інокуляції протягом вегетації люцерни. Внаслідок асиміляції N<sub>2</sub> бульбочками забезпечувались ліпші умови азотного живлення рослин, що сприяло інтенсифікації метаболічних процесів росту та розвитку. Проте рослини, інокульовані різними ізолятами, істотно не відрізнялися між собою за надземною масою і масою коренів (табл. 3). За надземною масою перевагу мали рослини, інокульовані ізолятами AC08 і AC88 протягом вегетації рослин. Найбільший приріст вегетативної маси у фазу цвітіння зафіксовано в люцерни, бактеризованої ізолятом AC88 та Tn5-мутантом T17. Продуктивність зеленої маси, зібраної за два укоси люцерни, істотно не відрізнялась у межах варіантів досліду за використання штаму 425a та ізолятів AC28, AC48. У люцерни, інокульованої ізолятами AC88, AC08, зелена маса збільшилась відповідно на 9,2 і 10,6 %, вміст сухої речовини — на 11,8 і 12,7 %, а за інокуляції насіння Tn5-мутантом T17 ці показники дорівнювали 12,5 та 15,7 % порівняно з інокуляцією штамом 425a (табл. 4).

В інокульованих рослин відмічено збільшення вмісту хлорофілів *a* і *b* та каротиноїдів порівняно з неінокульованими, що підтверджує стимулювальний вплив досліджуваних мікроорганізмів на формування фотосинтетичного апарату люцерни (табл. 5). Показники накопичення пластидних пігментів відрізнялись залежно від залученого інокулянту.

Отже, передпосівна інокуляція насіння люцерни посівної сорту Ярославна досліджуваними культурами бульбочкових бактерій забезпечує формування активних азотфіксувальних бульбочок на коренях люцерни й позитивно впливає на ріст надземної частини рослин. Особливістю формування симбіозу люцерна—ізоляти є інтенсивніше формування бульбочок у період із 25-ї по 40-ву добу вегетації рослин за інокуляції ризобіями AC08 і навпаки, утворення поодиноких бульбочок (а іноді їх відсутність) на коренях за інокуляції AC48 у період стеблуння (25-та доба після появи сходів).

Симбіотичні системи люцерни посівної сорту Ярославна, утворені за участю ізолятів, виділених із біоценозів Полісся України, відрізнялися за динамікою азотфіксувальної активності протягом періоду вегетації рослин. Зміни в динаміці та інтенсивності азотвідновлювальних процесів свідчать про різні реакції рослини-хазяїна й генетичну сумісність симбіопартнерів у процесі становлення і функціонування симбіотичних систем.

Інокуляція люцерни ізолятами сприяла інтенсифікації процесу асиміляції атмосферного азоту, збільшенню вмісту хлорофілу в лист-



ках. Бактеризація насіння ізолятами АС08 і АС88 забезпечувала істотну різницю за урожаєм надземної маси рослин порівняно з інокуляцією люцерни виробничим штамом 425а *S. meliloti*. Перспективними за господарсько-цінними властивостями є ізоляти АС08 і АС88 *S. meliloti*.

Отже, з метою поповнення селекційного фонду високоактивних штамів *Rhizobium* для виготовлення високоякісних азотфіксувальних препаратів відібрано ізоляти, виділені з бульбочок природних популяцій люцерни зони Полісся, які здатні ініціювати більш раннє формування симбіотичного апарату, посилювати асиміляцію атмосферного азоту в період цвітіння рослин порівняно з виробничим штамом 425а, стимулювати вегетативний ріст люцерни та сприяти збільшенню вмісту хлорофілу в листках.

1. Антинчук А.Ф. Экологические аспекты селекции ризобий и повышение эффективности симбиоза // Физиология и биохимия культ. растений. — 1994. — 26, № 4. — С. 315—333.
2. Воробей Н.А., Бутницький І.М., Заболотна В.П. Фіксація атмосферного азоту люцерною у симбіозі із бульбочковими бактеріями, отриманими різними методами. Физиология 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. — К.: Логос, 2009. — С. 480—485.
3. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1964. — 388 с.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
5. Костин О.В., Дозоров А.В. Эффективность спонтанных и заводских штаммов клубеньковых бактерий гороха и сои при инокуляции семян перед посевом // Межвуз. сб. Ульянов. гос. с.-х. акад. «Физиолого-биохимические аспекты обработки семян сельскохозяйственных культур». — 2003. — С. 93—98.
6. Коць С.Я., Михалків Л.М. Физиология симбіозу та азотне живлення люцерни. — К.: Логос, 2005. — 300 с.
7. Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф. и др. Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобиальный симбиоз: В 4 т. — Киев: Логос, 2010. — Т. 1. — 506 с.
8. Коць С.Я., Петерсон Н.В. Мінеральні елементи і добрива в живленні рослин. — К.: Логос, 2005. — 150 с.
9. Крикунець В.М. Ацетиленвідновний метод у дослідженнях з фізіології бобово-ризобіального симбіозу // Физиология и биохимия культ. растений. — 1993. — 25, № 5. — С. 419—430.
10. Кургак В.Г., Малинка Л.В., Пасюта А.Г. Використання симбіотичного азоту бобових трав у луківництві // Вісн. Полтав. держ. аграр. академії. — 2003. — № 6. — С. 14—15.
11. Кургак В.Г., Малинка Л.В. Продуктивність травостоїв залежно від строків підсівання коношини лучної // Зб. наук. праць Ін-ту землеробства УААН. — К.: Фітосоціоцентр. — 2004. — Вип. 1—2. — С. 105—108.
12. Патыка В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. Біологічний азот / Під ред. В.П. Патики. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
13. Патыка В.Ф., Толкачев Н.З., Бутвина Ю.З. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современной земледелии Украины // Физиология и биохимия культ. растений. — 2005. — 37, № 5. — С. 384—393.
14. Проворов Н.А. Повышение эффективности симбиотической фиксации азота растениями: молекулярно-генетические подходы и эволюционные модели // Физиология растений. — 2013. — 60, № 1. — С. 31—37.
15. Устюжанин И.А. Продуктивность и накопление азота клевером луговым при инокуляции различными штаммами клубеньковых бактерий // Аграр. наука Евро-северо-востока. — 2003. — № 4. — С. 19—23.
16. Пат. на корисну модель № 55432. Штам бактерій *Sinorhizobium meliloti* T17 (ІМВ В-7282) для одержання бактеріального добрива під люцерну. С.Я. Коць, Н.А. Воробей, С.М. Маліченко, І.М. Бутницький. — Опубл. 10.12.2010. Бюл. № 23.
17. Hameed Sohail, Yasmin Sumera, Malik Kauser A. et al. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes // Biol. Fert. Soils. — 2004. — 39, N 3. — P. 179—185.
18. Prevost D., Bromfield E.S.P. Diversiti of symbiotic rhizobia resident in Canadian soils // Can. J. Soil Sci. — 2003. — 83, N 3. — P. 311—319.

19. Simon T. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates: Collection, identification and screening of efficiency in symbiosis with clover // Plant Soil Environ. — 2006. — 52, N 3. — P. 105—110.
20. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Physiol. — 1994. — 144, N 3. — P. 307—313.

Отримано 27.08.2014

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ *SINORHIZOBIUM MELILOTI*,  
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОЦЕНОЗОВ ЗОНЫ ПОЛЕСЬЯ УКРАИНЫ, ПО  
СИМБИОТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

Н.А. Воробей, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследованы особенности азотфиксации люцерны в симбиозе с ризобиями, выделенными из корневых клубеньков растений биоценозов зоны Полесья Украины. Вследствие искусственной бактеризации люцерны сорта Ярославна изолятами интенсифицируется ассимиляция  $N_2$ , активируется вегетативный рост, увеличивается содержание хлорофилла в листьях растений по сравнению с применением производственного штамма 425а *S. meliloti*. Отмечена различная динамика азотфиксирующей активности клубеньков люцерны на протяжении вегетационного периода в зависимости от микросимбионта. Инокуляция изолятом АС08 приводила к более интенсивному образованию клубеньков в ранние фазы развития люцерны, что способствовало повышению активности азотфиксации в этот период. Изоляты АС08 и АС88 *S. meliloti* отобраны по симбиотическим показателям с целью дальнейшего испытания и внедрения их в качестве бактериальной основы в производство биологического удобрения — ризостима.

THE CHARACTERISTIC OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI* NODULE BACTERIA  
ISOLATED FROM BOICENOSES OF UKRAINIAN POLISSYA ZONE BY THE  
SYMBIOTIC PARAMETERS

N.A. Vorobey, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The features of nitrogen fixation of alfalfa in symbiosis with rhizobia isolated from the root nodules of plants of biocenoses of Ukrainian Polissya zone were studied. As a result of bacterization of alfalfa variety Yaroslavna by isolates the  $N_2$ -assimilation intensified, the vegetative growth activated, the chlorophyll content in leaves increased compared to use of industrial strain 425a of *S. meliloti*. There were observed the different types of dynamics of nitrogen fixing activity of alfalfa nodules during the period of vegetation depending on microsymbionts. The inoculation by the isolate AS08 led to more intensive nodule formation in the early phases of alfalfa development which contributed to an increase of nitrogen fixing activity during this period. The AS08 and AS88 isolates of *S. meliloti* are selected by the symbiotic properties for further research as a bacterial basis in production of biological fertilizer Rhizostym.

*Key words:* *Sinorhizobium meliloti*, nodule bacteria, alfalfa, symbiosis, nitrogen fixation.