

- бур'янів: Матеріали 5-ї Науково-теоретичної конференції (Київ, 17–18 березня 2006 р.). — К., 2006. — С. 74–81.
5. Малієнко А.М. Особливості формування бур'янових перелогів на сірому лісовому крупнопилувато-легкосуглинковому ґрунті Лісостепу / А.М. Малієнко, Ю.М. Скурятін // Проблеми бур'янів і шляхи зниження забур'яненості орних земель: Матеріали 4-ї Науково-теоретичної конференції (Київ, 17–18 березня 2006 р.). — К., 2004. — С. 121–126.
 6. Домбровська С.С. Природні сіножаті та пасовища північно-центрального Степу: монографія / С.С. Домбровська, О.М. Курдюкова, М.І. Конопля; за ред. С.С. Домбровської. — Луганськ: Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2013. — 294 с.
 7. Екологічний атлас Луганської області / [Є.Л. Макаровський, О.В. Соловійов, Є.Г. Кривенець та ін.]. — Луганськ, 2004. — 167 с.
 8. Вадюніна А.Ф. Методи дослідження фізических свойств ґрунтів / А.Ф. Вадюніна, З.А. Корчагіна. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 1986. — 416 с.
 9. Браун Д. Методи исследования и учета растительности / Д. Браун. — М.: Изд-во иностр. литературы, 1957. — 315 с.
 10. Шенников А.П. Введение в геоботанику / А.П. Шенников. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1964. — 447 с.
 11. Методика опытов на сенокосах и пастбищах / [П.И. Ромашов, В.П. Мельничук, В.Г. Игловикова и др.] — М.: ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса, 1971. — Ч. 2. — 176 с.
 12. Определитель высших растений Украины / [Д.Н. Доброчаева, М.И. Котов, Ю.Н. Прокудин и др.] — К.: Наук. думка, 1987. — 548 с.
 13. Mosyakin S.L. Vascular plants of Ukraine a nomenclatural checklist / S.L. Mosyakin, M.M. Fedoronchuk; Editor S.L. Mosyakin / M.G. Kholodny Institute of Botany. — Kyiv, 1999. — 345 p.
 14. Takhtajan A. Flowering Plants. Second Edition / A. Takhtajan. — Springer. — Verlag, 2009. — Vol. XLV. — P. 872.
 15. Зоотехнический анализ кормов / [Е.А. Петухова, Р.Ф. Бессарабова, Л.Д. Халенева, О.А. Антонова]. — 2-е изд., доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1989. — 239 с.

УДК 579.266.2:574.38

РІЗНОМАНІТТЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІЗОЛЯТІВ РИЗОСФЕРИ РОСЛИН РІПАКУ

А.А. Бунас¹, Я.В. Чабанюк¹, О.В. Лобова²

¹ Інститут агроекології і природокористування НААН

² Національний університет біоресурсів і природокористування України

*З ризосфери ріпаку сорту Чорний велетень виділено домінуючих представників різних таксономічних груп мікроорганізмів. На основі дублювання функцій мікроорганізмів у мікробіоценозі встановлено, що 78% домінуючих бактеріальних ізолятів проявляють широкоспецифічні трофічні властивості. Вони можуть використовувати в своїх трофічних ланцюгах мінеральні та органічні форми азоту, а за відсутності його зв'язаних форм фіксувати молекулярний азот атмосфери з різною активністю. Доведено, що домінуючі бактеріальні ізоляти А-29, К-11 мають низку корисних у агрономічному вимірі властивостей і за інтродукції в кореневу зону рослин ріпаку забезпечують зменшення втрат азоту субстратом. На основі морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних властивостей і генів 16S рРНК встановлено, що ізолят А-29 належить до *Bacillus subtilis*, а ізолят К-11 до *Pseudomonas aureofaciens*.*

Ключові слова: мікробні ізоляти, гени 16S рРНК, ДНК, РНК, нуклеотидна послідовність.

Мікроорганізми кореневої зони рослин постійно перебувають у тісній взаємодії з усіма компонентами екосистеми, і насам-

перед з рослинами, та як і рослини, своєю чергою, також впливають на їх ріст і розвиток [1, 2]. М. Виноградський наголошував, що діяльність ґрунтової мікрофлори — це не сукупність індивідуальних процесів, а

колективна робота, яка базується на за-
садах саморегуляції [3].

Агротехнологічні прийоми вирощуван-
ня ріпаку передбачають внесення великих
доз мінеральних добрив, особливо азотних,
що зумовлює порушення збалансованості
ланцюгів у екосистемі, сформованих упро-
довж тривалого періоду [4]. Особливості
трансформації сполук біогенних елементів
у агроценозах, у т.ч. азоту, залежить від
низки чинників, до яких належать кліма-
тичні умови регіону та конкретного сезону,
геохімічний вплив ґрунтів, тип рослиннос-
ті, антропогенна дія і мікробіологічна ак-
тивність, що є найменш дослідженою [5].

Метою роботи було дослідження струк-
тури мікробного ценозу ризосфери ріпаку,
виділення домінуючих мікроорганізмів та
їх ідентифікація.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вплив різних доз азотних добрив на
мікробіоценоз ризосфери рослин ріпаку
встановлювали за активністю ґрунту риз-
осфери [6] та функціональними власти-
востями домінуючих ізолятів (бактерій,
мікроміцетів, стрептоміцетів) [7].

Домінуючі ізоляти мікроорганізмів з
ризосфери рослин ріпаку на початкових
етапах роботи відбирали за морфологіч-
ними ознаками. Виділення чистої куль-
тури з подальшим перенесенням ізолю-
ваної колонії в пробірку здійснювали
загальноприйнятним методом виснажливого
штриха.

Ідентифікацію чистої культури дослід-
них ізолятів до роду проводили за: морфо-
логічними, культуральними, фізіолого-біо-
хімічними ознаками [8, 9].

За отриманими ідентифікаційними
ознаками встановлювали таксономічну на-
лежність бактерій, виділених з ризосфери
рослин ріпаку, за визначником [10].

Ідентифікацію перспективних штамів
бактерій до виду проводили молекулярно-
генетичними методами.

Виділення тотальної ДНК з бактеріаль-
них клітин ізоляту А-29 і К-11 здійснюва-
ли за допомогою набору реагентів Ultra
Clean™ (MoBio Інк., США).

Ампліфікаційні фрагменти тотальної
ДНК розділяли електрофорезом в ага-
розному гелі з трис-ацетатним буфером
(ТАЕ); 0,04М Трис-ацетат (рН-8,0), 0,002М
ЕДТА.

Для зберігання готували 50x ТАЕ. На
1 л розчину: льодяної оцтової кислоти —
57,1 мл; 0,5М ЕДТА — 200 мл; Трис-НСІ —
242 г.

Для проведення електрофорезу вико-
ристовували питому напругу 3–5 В/см.
Гель з концентрацією агарози 1% викорис-
товували для аналізу фрагментів ДНК по-
над 1 тис. пар нуклеотидів (п.н.). Коротші
фрагменти аналізували при концентрації
агарозного гелю 2%. Бромистий етидій
для візуалізації ДНК в ультрафіолетовому
світлі додавали до гелю перед використан-
ням — до концентрації 10 мкг/мл.

Тотальну ДНК використовували як ма-
трицю для ампліфікації фрагмента *grs*-гена
(16S рРНК) з такими праймерами:

27f: (5'– AGAGTTTGATCATGGCTCAG –3')

1522r: (5'– AAGGAGGTGATCCARCCGCA –3').

Полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР)
проводили у загальному об'ємі — 50 мкл.
В реакційну суміш ПЛР вносили ДНК
матриці (50 нг/мкл) — 5 мкл, 10x бу-
фера (100 мМ Трис-НСІ, 400 мМ КСІ,
500 мкг/мл бичачого сироваткового аль-
буміну, рН 8,3) — 5 мкл, 2,5 мМ dNTPs —
5, кожного праймеру (10 пмоль/мкл) — 1,
Taq-полімерази та dH₂O — 0,5 мкл. Ре-
жим ПЛР: початкова денатурація при
94°C упродовж 3 хв, потім 30 циклів — де-
натурація при 94°C — 1 хв, приєднання
праймерів при 55°C — 1 хв, синтез при
72°C — 1,5 хв, термінальна стадія синтезу
при 72°C упродовж 10 хв. Розмір отримано-
го фрагмента, визначеного в 1% агарозному
гелі, становив 1495 п.н. 16S рРНК. Очищен-
ня отриманого ПЛР-продукту здійснювали
з допомогою UltraClean™ PCR Clean-up
DNA purification kit (MoBio Laboratories,
Inc.m USA). Пряме визначення нуклео-
тидної послідовності фрагмента *grs*-гена
(16S рРНК) ізоляту А-29 проводили за
методом Сенгепа [11] з використанням
BigDye Terminator v3.0 Sequencing Kit

Amersham (USA) в автоматичному секвенаторі ALF express (Pharmacia Biotech, Sweden). Аналіз нуклеотидної послідовності проводили за допомогою BLAST (NCBI) та Vector NTI 6.0 (Інфомакс Інк., США).

ПЛР-аналіз ізоляту К-11 проводили зі специфічними праймерами для бактерій виду *Pseudomonas aureofaciens* [12]:

49f (5' – GAAGCTTGCTTCTCTTGAG – 3')

617r (5' – CTCGCCAGTTTTGGATG – 3').

ПЛР проводили в реакційній суміші об'ємом 20 мкл, що вмщувала 1x ПЛР-буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ трифосфатів, 10 пмоль кожного праймера, 20 нг ДНК-матриці, 2,5 од. Таq-ДНК-полімерази. Спочатку проводили ДНК-денатурацію при температурі 94°C упродовж 5 хв і перші 4 цикли за таких умов: 1 хв – при 94°C, 1 – при 65 і 3 хв – при 72°C. Цикли повторювали 5 разів при температурі приєднання праймерів у 60°C та 30 разів при 57°C. Термінальну стадію синтезу проводили при температурі 72°C упродовж 3 хв. Отримані ПЛР-продукти розділяли електрофорезом в агарозному 2,0% гелі.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З ризосфери рослин ріпаку виділено 147 ізолятів, серед яких 40 амоніфікаторів, 42 бактерії, що використовують мінеральний азот, 50 стрептоміцетів, 15 мікроміцетів. На основі принципу дублювання функцій у мікробіоценозі визначили, що за діапазоном трофності 78% бактеріальних ізолятів проявили широкоспецифічні властивості (рис. 1), тобто бактерії можуть використовувати в своїх трофічних ланцюгах мінеральні та органічні форми азоту, а за відсутності його зв'язаних форм фіксувати молекулярний азот атмосфери з різною активністю. Оскільки переважною є частка широкоспецифічних мікроорганізмів, то саме вона найповніше відображає властивості мікробіоценозу [13]. Тому для подальших досліджень було відібрано бактеріальні ізоляти, що мали широкий діапазон трофності щодо сполук азоту.

Попередніми дослідженнями встановлено, що ізоляти рослин ріпаку мають низку

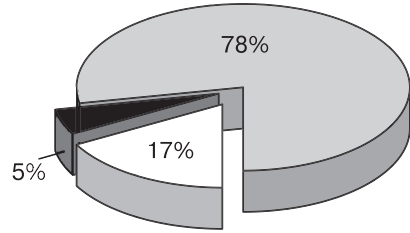


Рис. 1. Частка широкоспецифічних бактеріальних ізолятів серед виділених домінантних ізолятів ризосфери рослин ріпаку: ■ – широкоспецифічні, □ – середньоспецифічні, ■ – вузькоспецифічні

агрономічно-корисних властивостей, таких як нітрогеназна, фосфатмобілізувальна, целюлазна активності, а також здатність до продукування речовини фітогормональної та антагоністичної дії. Серед всіх виділених мікроорганізмів найактивнішими за всіма дослідними показниками виявились бактеріальні ізоляти А-29 та К-11.

Подальшим кроком досліджень було дослідження основних морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних властивостей у перспективних ізолятів мікроорганізмів. На основі вище названих показників ідентифікації встановлено, що ізоляти А-29 і К-11 є представниками родів *Bacillus* та *Pseudomonas* відповідно.

Для визначення видової належності бактеріального ізоляту А-29 було проведено аналіз нуклеотидної послідовності фрагмента *gts*-гена (16S рРНК). Порівняльний аналіз визначеної послідовності 1495 п.н. з відомими послідовностями з банку генів (GenBank, NCBI) підтвердив попередній висновок про належність ізоляту А-29 до бактерій роду *Bacillus* (рис. 2).

Найбільшу гомологію у базі даних (GenBank, NCBI) показав ізолят А-29 – 99% до бактерій виду *Bacillus subtilis* штаму ВFAS, № АУ775778.1.

Отже, на основі проведених морфологічних, фізіологічних та генетичних аналізів можна зробити висновок, що ізолят А-29 є представником виду *Bacillus subtilis*. Досліджений штам зберігається в колекції мікроорганізмів лабораторії екології мікроорганізмів Інституту агроєкології і приро-

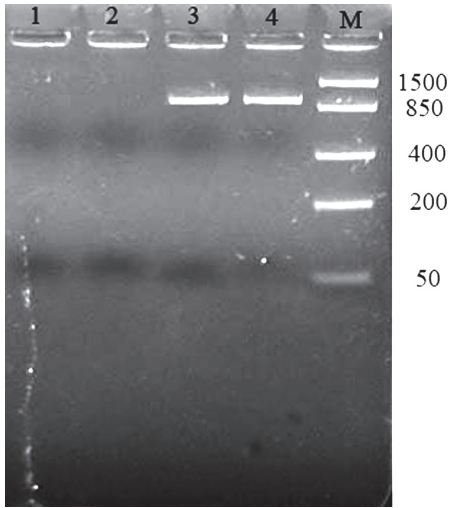


Рис. 2. ПЛР-аналіз ДНК ізолятів домінантних бактерій з праймерами, специфічними для бактерій виду *Bacillus*: 1, 2, 3 — ізоляти А-2, А-17, А-29 відповідно; 4 — продукт ДНК *Bacillus subtilis* 26 D (позитивний контроль); М — маркер (Ферментас, Литва)

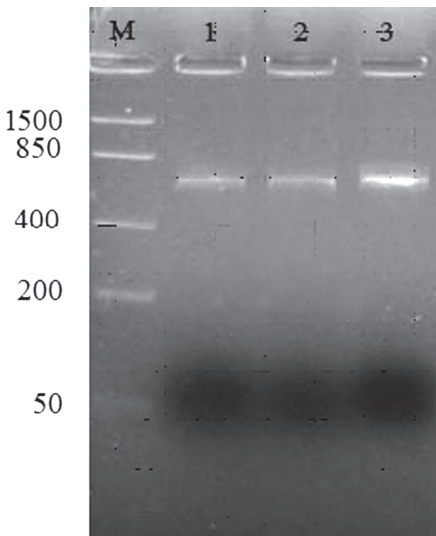


Рис. 3. ПЛР-аналіз ДНК ізолятів домінантних бактерій з праймерами, специфічними для бактерій виду *Pseudomonas aureofaciens*: М — маркер (Ферментас, Литва); 1 — продукт ДНК *Pseudomonas aureofaciens* Н-16; 2, 3 — ізоляти К-11, К-2 відповідно

докористування і має реєстраційну назву *Bacillus subtilis* А-29.

Для підтвердження або спростування результатів мікробіологічних тестів про родову належність бактеріальних ізолятів К-2, К-11 було проведено ПЛР-аналіз. Унаслідок ампліфікації фрагмента гена 16S рРНК на ДНК-матриці ізолятів К-2, К-11 із специфічними праймерами для бактерій виду *Pseudomonas aureofaciens* було отримано продукт розміром 569 п.н. (рис. 3).

Результати ПЛР свідчать про високу ймовірність того, що ізоляти К-2 та К-11 належать до виду *Pseudomonas aureofaciens*.

ВИСНОВКИ

З ризосфери рослин ріпаку виділено домінантні ізоляти бактерій, мікроміцетів, стрептоміцетів. Встановлено, що за діапазоном трофності 78% бактеріальних ізолятів проявили широкоспецифічні властивості, тобто бактерії можуть використовувати в своїх трофічних ланцюгах мінеральні та органічні форми азоту, а за відсутності його зв'язаних форм фіксувати молекулярний азот атмосфери з різною активністю.

На основі морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних властивостей і аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК бактеріальні ізоляти А-29 та К-11, що мають низку корисних властивостей, ідентифіковано як *Bacillus subtilis* А-29 і *Pseudomonas aureofaciens* К-11.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вернадский В.И. Биосфера: Избранные труды по биохимии / В.И. Вернадский. — М.: Мысль, 1967. — 376 с.
2. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н.А. Красильников. — М.: Изд-во АН СССР, 1958. — 464 с.
3. Виноградский С.Н. Микробиология почвы / С.Н. Виноградский. — М.: Изд-во АН СССР, 1952. — 792 с.
4. Великий В.И. Некоторые эколого-гигиенические аспекты интенсивного применения азотных минеральных удобрений в сельском хозяйстве / В.И. Великий, И.В. Мудрый // Довкілля та здоров'я. — 1999. — № 4 (11). — С. 55–58.
5. Наукові основи сталого розвитку агроєкосистем України [монографія] / [О.І. Фурдичко, О.С. Дем'янюк, Л.І. Моклячук, та ін.]; за ред. акад. О.І. Фурдичка. — К.: ДІА, 2012. — 352 с.

6. Бунас А.А. Мікробне угруповання ризосфери *Brassica napus* L. за різного забезпечення елементами живлення / А.А. Бунас, Я.В. Чабанюк // Агроекологічний журнал. — 2011. — С. 30–34.
7. Бунас А.А. Антагонізм ізолятів роду *Streptomyces* до фітопатогенних грибів / А.А. Бунас // Агроекологічний журнал. — 2011. — № 4. — С. 95–96.
8. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учеб. пособие. — [3-е изд., перераб. и доп.]; под ред. Н.С. Егорова. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
9. Експериментальна ґрунтова мікробіологія [монографія] / [В.В. Волкогон, О.В. Надкернична, Л.М. Токмакова та ін.]; за ред. В.В. Волкогона. — К.: Аграрна наука, 2010. — 464 с.
10. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. [Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снитц]; под ред. Г.А. Заварзина. — Т. 2. — М.: Мир, 1997. — 368 с.
11. Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicken, A.R. Coulson // Proc. Nat. Acad. Sci USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 5463–5467.
12. Fate of the biological control agent *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 after application to turfgrass / W.V. Sigler, C.H. Nakatsu, Z.J. Reicher, R.F. Turco // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol. 67, No. 8. — P. 3542–3548.
13. Белимов А.А. Взаимодействие ассоциативных бактерий и растений в зависимости от биотических и абиотических факторов: автореф. ... д-ра биол. наук: спец. 03.00.07 «Микробиология» / А.А. Белимов. — СПб., 2008. — 46 с.

УДК 581.145:576.311.34: 582.746.51

ВПЛИВ ІНОКУЛЯЦІЇ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* УКМ В-6035 НА ФОТОСИНТЕТИЧНИЙ АПАРАТ ТРАНСГЕННОЇ СОЇ

Н.І. Адамчук-Чала

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

*Показано ультраструктурні зміни фотосинтетичного апарату гліфосат-толерантної сої до спільного впливу інокуляції насіння культурою *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 і обробки рослин гербіцидом раундап в умовах мікростаціонарних дослідів (2010–2011 рр.). Обробка рослин гербіцидом сприяла зростанню розмірів і кількості хлоропластів та збільшенню об'ємів тилакоїдів гран і тилакоїдів строми хлоропластів, накопиченню крохмальних зерен. За використання раундапу інокуляція насіння сої бульбочковими бактеріями мала позитивний вплив на розвиток системи фотомембран хлоропластів та їх кількості в клітинах мезофілу листків. Виявлені зміни ультраструктурної організації клітин мезофілу і субструктурної організації хлоропластів свідчать про позитивний вплив інокуляції на розвиток фотосинтетичного апарату гліфосат-толерантної сої, що сприяє підвищенню її врожайності на 27,9%.*

Ключові слова: трансгенна соя, гербіцид раундап, мезофіл, фотосинтетичний апарат, інокуляція.

Останнім часом боротьба із багаторічними бур'янами із використанням гербіцидів стала найрозповсюдженішим агроприйомом у вирощуванні зернобобових культур. Проте існують дані щодо негативної дії гербіцидів на фізико-хімічні процеси і функціональні показники рослин [1, 2].

Використання до появи сходів культурних рослин гербіциду суцільної дії

раундапу, діючою речовиною якого є фосфорорганічна сполука гліфосат, сприяє ефективному зниженню багаторічних бур'янів у стадії вегетації [3]. За результатами дослідів [2] було відзначено, що за потрапляння гербіциду у вологий ґрунт відбувалося швидке розкладання гліфосату на нетоксичні речовини. Поряд із тим існують дані щодо інгібування гербіцидом комплексу взаємозв'язків груп мікроорганізмів, біохімічної активності і процесу