



Рослинництво, кормовиробництво

УДК 579.262:582.736:631.461.5+
631.348

© 2015

І.С. Бровко

Л.В. Титова,

*кандидат
біологічних наук*

Г.О. Іутинська,

*член-кореспондент
НАН України,
доктор біологічних наук*

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

ФОРМУВАННЯ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМ У СОЇ РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ ЗА УМОВ ПЕСТИЦИДНОГО НАВАНТАЖЕННЯ

Мета. Вивчити особливості формування і функціонування симбіотичних систем у сої різних генотипів за умов пестицидного навантаження. **Методи.** Ваговий, ацетилен-редуктазний і статистичний. **Результати.** Установлено негативний вплив гербіциду на формування бульбочок виробничим штамом *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 та одночасне зростання азотфіксувальної активності симбіотичних систем. **Висновки.** Показано формування ефективного симбіозу штаму з гліфосат-толерантною соєю на чорноземному ґрунті, що підлягав багаторазовим обробкам гліфосатом, при цьому врожайність зерна підвищувалася на 46%.

Ключові слова: симбіотичні системи, генотипи сої, трансгенна соя, гліфосат, азотфіксувальна активність, продуктивність.

У сільському господарстві актуальною є проблема збереження екологічної стабільності ґрунтів, підвищення врожайності та якості рослинницької продукції. Особливо гостро стоїть питання підвищення врожайності зернобобових культур, які є джерелом повноцінного білка, збалансованого за амінокислотним складом. Для його вирішення створюють й впроваджують у виробництво нові біотехнології і сорти, адаптовані до умов навколишнього середовища та сучасного землекористування.

Значне місце в агропромисловому комплексі України займає соя як цінна бобово-олійна культура з унікальною якістю зерна, високою продуктивністю та економічністю виробництва. Крім розробки перспективних агротехнологій і селекції нових сортів (зокрема генетично модифікованих), надзвичайно

важливим є вивчення особливостей взаємодії сої різних генотипів зі специфічними ризобіями, чутливості нових сортів сої до інокуляції, впливу пестицидного фону на ефективність симбіотичних систем.

Мета досліджень — вивчити особливості формування і функціонування симбіотичних систем у сої різних генотипів за умов пестицидного навантаження.

Матеріали та методи досліджень. Об'єкти досліджень — високоефективний виробничий штам бульбочкових бактерій сої з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 та рослини сої сорту Подільська 416 і гліфосат-толерантної лінії 40-3-2.

Сорт сої Подільська 416 (селекції Інституту агроєкології і природокористування НААН та

Вінницького державного аграрного університету) — середньоранній, високопродуктивний, стійкий до вилягання, з підвищеною холодо- та посухостійкістю. Сприятливі зони для його вирощування — Лісостеп і Степ.

Лінія трансгенної сої 40-3-2 (гліфосат-толерантна соя, ГТС) створена компанією Monsanto Canada Inc. Основною її властивістю є стійкість до дії гліфосату, який використовують для боротьби з бур'янами. Лінію ГТС 40-3-2 отримано за технологією рекомбінантних ДНК зі вставкою бактеріального гена гліфосатстійкої форми ферменту 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (ЕПШФС, ЕС 2.5.1.19) [10]. Гліфосат (N-фосфометилгліцин) — діюча речовина гербіциду раундап. Він інгібує активність рослинного ферменту ЕПШФС, задіяного в біохімічних шляхах синтезу таких ароматичних амінокислот, як фенілаланін, тирозин і триптофан, що призводить до пригнічення росту та подальшої загибелі рослин. Завдяки генетичній модифікації ГТС нечутлива до гліфосату і здатна синтезувати ароматичні амінокислоти в умовах застосування гербіциду.

Досліди проводили у вегетаційному будиночку Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Сою вирощували в керамічних посудинах об'ємом 3 л на 2-х ґрунтових субстратах: чорноземі типовому глибокому малогумусному крупнопилуватосуглинковому, відібраному на полях, довгий час оброблюваних гербіцидом

раундап (Білоцерківське дослідно-селекційне відділення Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН), і на торфосуміші (ЗАТ НВФ ДП «Гаврощина торф»). Схема досліджень містила такі варіанти: інокуляцію насіння; інокуляцію насіння і обробку рослин гербіцидом; обробку гербіцидом неінокульованих рослин; контроль (без інокуляції і без обробки гербіцидом). Інокуляцію насіння здійснювали виробничим штамом *B. japonicum* УКМ В-6035 з бактеріальним навантаженням 10^7 кл./насінину. У варіантах з обробкою гербіцидом використовували комерційний препарат раундап (Монсанто, США) згідно з інструкцією фірми виробника.

Масу кореневих бульбочок і зерна визначали за загальноприйнятими методиками. Нітрогеназну активність бульбочок сої оцінювали у фазі бутонізації — початку цвітіння ацетилен-редуктазним методом [6]. Статистичну обробку результатів експериментів виконували за допомогою стандартних комп'ютерних програм.

Результати досліджень. Установлено вплив раундапу на формування симбіотичного апарату ГТС на досліджуваних ґрунто-субстратах (табл. 1). На чорноземному ґрунті полів, де застосовували технології з використанням гліфосату, найчисленніший нодуляційний апарат у ГТ-рослин формувалася за інокуляції насіння штамом *B. japonicum* УКМ В-6035 без використання раундапу: кількість бульбочок у 4,4 раза перевищувала контрольний показник. За обробки інокульованих

1. Формування та азотфіксувальна активність симбіотичного апарату гліфосат-толерантної сої лінії 40-3-2 (фаза бутонізації — початку цвітіння)

Варіант	Контроль	Інокуляція <i>B. japonicum</i>	Інокуляція, обробка раундапом	Обробка раундапом
<i>Чорнозем типовий малогумусний</i>				
Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_2 /росл./год	0,37±0,01	0,22±0,08	0,27±0,1	0,42±0,03
Кількість бульбочок, шт./росл.	5±0	22±1	15±0	17±2
Маса бульбочок, г/росл.	0,35±0,05	0,28±0,01	0,33±0,02	0,49±0,03
Урожай, г/росл.	1,3±0,19	1,9±0,28	1,7±0,25	1,4±0,21
<i>Торфосуміш</i>				
Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_2 /росл./год	0,73±0,02	0,19±0,02	0,74±0,24	0
Кількість бульбочок, шт./росл.	38±1	58±0	48±1	0
Маса бульбочок, г/росл.	0,49±0,01	0,37±0,01	0,39±0,01	0
Урожай, г/росл.	3,6±0,50	1,5±0,22	1,9±0,28	1,8±0,27

2. Формування та азотфіксувальна активність симбіотичного апарату сої сорту Подільська 416 (фаза бутонізації – початку цвітіння)

Варіант	Контроль	Інокуляція <i>B. japonicum</i>	Інокуляція, обробка раундапом	Обробка раундапом
<i>Чорнозем типовий малогумусний</i>				
Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_2 /росл./год	0,39±0,06	0,60±0,10	0,42±0,06	0,60±0
Кількість бульбочок, шт./росл.	8±0	37±0	23±1	8±0
Маса бульбочок, г/росл.	0,38±0,05	0,58±0,02	0,60±0,03	0,40±0
Урожай, г/росл.	2,0±0,30	1,9±0,28	*	*
* Загибель рослин наприкінці вегетації.				

рослин раундапом відбувалося пригнічення бульбочкоутворення у 1,5 раза, однак при цьому фактична азотфіксувальна активність симбіотичного апарату збільшувалася в 1,2 раза. В умовах спонтанної інокуляції на фоні застосування раундапу нодуляційний процес посилювався порівняно з контролем у 3,4 раза за одночасного збільшення азотфіксувальної активності бульбочок на 13,5%. У варіанті з інокуляцією виробничим штамом без застосування раундапу було отримано найбільшу врожайність зерна, яка на 46,2% перевищувала врожайність сої в контрольному варіанті.

На торфосуміші в контрольному варіанті кількість бульбочок, сформованих у ГТ-рослин аборигенними штамми, була в 1,5 раза меншою, ніж у варіанті з інокуляцією виробничим штамом (див. табл. 1). В обох випадках зафіксовано пригнічувальну дію раундапу на нодуляційний процес. Кількість бульбочок у варіанті з інокуляцією зменшилася за обробки раундапом на 17,2%.

На відміну від результатів, отриманих у досліді з чорноземом, де відзначено стимуляцію раундапом нодуляційної активності ендемних популяцій ризобій, за вирощування сої на торфосуміші відбувалося повне пригнічення спонтанного бульбочкоутворення на пестицидному фоні. Можливо, це пов'язано з адаптацією аборигенних ризобій до раундапу в чорноземному ґрунті під посівами ГТ-сої. Так, за даними авторів [8], з ризобій, вирощуваних на середовищі, збагаченому гліфосатом, було ізольовано ген СР4-ЕПШФС, що є основою генно-інженерної конструкції ГТС. Це свідчить про те, що в селективних умовах дії гліфосату можна досягти стійкості деяких представників бактеріальних популяцій до цього гербіциду спонтанними мутаціями або горизонтальним

перенесенням генів. Подібний ефект спостерігали під час дослідження нецільового впливу гербіцидів на ризосферні мікроорганізми [2, 3, 5, 9]. Описані процеси, імовірно, впливають на розвиток мікробіоценозів за багаторазового застосування гліфосату, що позначається на ефективності мікробно-рослинних систем.

Нодуляційний апарат інокульованих рослин на чорноземі й на торфосубстраті вирізнявся найбільшою чисельністю бульбочок, але найменшою азотфіксувальною активністю, яка за обробки раундапом зростала в 3,9 раза. Отже, раундап пригнічував бульбочкоутворення виробничим штамом у ГТС на обох субстратах. Однак при цьому відбувалося стимулювання азотфіксувальної активності бульбочок, що, можливо, пов'язано з високим адаптаційним потенціалом штаму. Крім того, деякі ризобії використовують гліфосат або продукти його деградації як субстрат [4]. До деградації органофосфатів здатні й інші представники ґрунтової біоти [1, 7].

Під час вивчення ефективності промислового штаму *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 на сорті Подільська 416 як субстрат використовували чорноземний малогумусний ґрунт поля Білоцерківського дослідно-селекційного відділення Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН (табл. 2).

У варіанті з інокуляцією на фоні застосування раундапу спостерігали пригнічення бульбочкоутворення та азотфіксувальної активності відповідно в 1,6 та 1,4 раза порівняно з інокульованими рослинами на природному фоні. За однакової вірулентності ендемних ризобій на контролі та у варіанті з раундапом спостерігали підвищення азотфіксувальної активності бульбочок у 1,5 раза за умов застосування гербіциду.

Висновки

За вирощування ГТС на обох субстратах раундап пригнічував формування бульбочок виробничим штамом, але стимулював їх азотфіксувальну активність. Виробничий штам *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 на чорноземному ґрунті, що піддавався багаторічному впливу гліфосату, формував ефективний симбіоз із

гліфосат-толерантною соєю, що сприяло зростанню врожайності зерна на 46%.

Аборигенні ризобії чорноземного ґрунту виявилися адаптованими до гліфосату і виявляли більшу вірулентність та азотфіксувальну активність, водночас фізіологічна активність ендемних ризобій торфосуміші повністю пригнічувалася раундапом.

Бібліографія

1. Ермакова И.Т. Микробная деструкция органофосфатов почвенными бактериями/ И.Т. Ермакова, Т.В. Шушкова, А.А. Леонтьевский//Микробиология. — 2008. — Т. 77, № 5. — С. 689–695.
2. Araujo A.S.F. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils/ A.S.F. Araujo, R.T.R. Monteiro, R.B. Abarkeli// Chaemosphaere. — 2003. — 52, № 5. — P. 799–804.
3. Chakravarty P. Non-target effect of herbicides: I. effect of glyphosate and hexazinone on soil microbial activity. Microbial population, and in-vitro growth of ectomycorrhizal fungi/ P. Chakravarty, L. Chatarpaul//Issue Pesticide Science. — 1990. — V. 28, № 3. — P. 233–241.
4. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*/Liu c.-M., P.A. McLean, C.C. Sookdeo et al.//Appl. Environ. Microbial. — 1991. — V. 57. — P. 1799–1804.
5. Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans/ L.H.S.Zobiole, R.J. Kremer, Jr R.S. Oliveira, J. Constantin//J. of Appl. Microbiol. — 2011. — V. 110, № 1. — P. 118–127.
6. Hardy R.W.F. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation/R.W.F. Hardy, R.C. Burns, R.D./ Holsten// Soil. Biol. Biochem. — 1973. — 5, № 1. — P. 41–83.
7. Metabolism of gluphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr/G.S. Jacob, L.E. Garbow, L.E. Hallas et al.//Appl. Environ. Microbiol. — 1988. — V. 54, № 12. — P. 2953–2958.
8. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops/T. Funke, H. Han, M.L. Healy-Fried et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — 103. — P. 13010–13015.
9. Ratcliff A.W. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils/A.W. Ratcliff, M.D. Busse, C.J. Shestak//Applied Soil Ecology. — 2006. — 34, № 2. — P. 114–124.
10. www.transgen.de/anbau/eu_international

Надійшла 15.12.2014.