

РІЗНОМАНІТТЯ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ КВАСОЛІ В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ

Д.В. Крутило¹, О.В. Надкернична¹, О.В. Шерстобоева²

¹ Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН

² Інститут агроекології і природокористування НААН

Із ґрунтів різних регіонів України вилучено 50 штамів бульбочкових бактерій квасолі та вивчено їх біологічне різноманіття. Встановлено, що нові штами *Rhizobium phaseoli* істотно відрізняються за чутливістю до антибіотиків, серологічними та генетичними властивостями. За антигенним складом досліджені бульбочкові бактерії віднесено до різних серологічних груп. Із застосуванням методу ПЛП-RFLP ITS-регіону виявлено значний генетичний поліморфізм мікросимбіонтів квасолі, виділених із ґрунтових популяцій ризобій. За рестрикційними профілями 16S-23S рДНК їх вперше розділено на різні ITS-типи.

Ключові слова: *Rhizobium phaseoli*, серологічне різноманіття, генетичний поліморфізм, ПЛП-RFLP, ITS-регіон.

Виробнича діяльність людей унаслідок застосування інтенсивних новітніх технологій дедалі більше здійснює втручання у процеси, що відбуваються в біосфері, порушуючи структурно-функціональні зв'язки, чим нерідко спричиняє небажані екологічні наслідки. Тому загроза глобальної екологічної кризи потребує розробки наукових основ раціонального природокористування, обґрунтування і реалізації програми стійкого розвитку суспільства загалом та агросфери зокрема. Симбіотична взаємодія бобових рослин із азотфіксуювальними бульбочковими бактеріями та її використання для розв'язання проблеми забезпечення високобілковою продукцією тваринництва, а людства якісними продуктами є одним із багатьох прикладів інтенсифікації агровиробництва природними шляхами [1].

Відомо, що квасоля звичайна (*Phaseolus vulgaris* L.) посідає друге місце після сої за площами посівів у світі. Для України вона є традиційною зернобобовою культурою. Аналіз літературних даних свідчить, що найближчим часом посівні площі цієї важливої культури будуть поступово збільшуватися.

Квасоля належить до бобових культур, які здатні вступати у симбіотичні взаємовідносини з різними ризобіальними партнерами [2]. На сьогодні відомо багато видів ризобій — симбіонтів квасолі, зокрема: *Rhizobium etli*, *R. phaseoli* (раніше розглядався як біовар виду *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*), *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. leucaenae*, *R. lusitanum*, *R. pisi*, *R. freirei* та *R. giardinii* [3, 4].

Слід зауважити, що системного вивчення бульбочкових бактерій квасолі, поширених у ґрунтах України, майже не проводилось. Тому дослідження фенотипічних та генетичних властивостей ризобій квасолі, що зумовлюють їх поліморфізм та адаптивність до певних екологічних умов, досі залишаються актуальними. Також особливої уваги потребує вивчення ґрунтових популяцій мікросимбіонтів квасолі, оскільки природні штами часто здатні конкурувати в процесі утворення бульбочок з інтродукованими в агроценози біоагентами мікробних препаратів. Ці дослідження дають змогу встановити закономірності формування місцевих популяцій бульбочкових бактерій квасолі в різних агроценозах та виявити штами з добре вираженими цінними господарськими властивостями

Метою нашої роботи було вивчити різноманіття бульбочкових бактерій квасолі у природних популяціях ризобій, отримати нові активні штами та провести їх серологічне і генетичне типкування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були бактерії виду *R. phaseoli* — представники ґрунтових популяцій ризобій квасолі.

Штами бульбочкових бактерій виділяли з бульбочок зернової та овочевої квасолі, яку вирощували на зразках ґрунтів, відібраних у різних регіонах України: дерново-підзолистому ґрунті — Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (ІСМАВ, м. Чернігів), темно-сірому ґрунті — Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН» (сmt Чабани), сірому лісовому ґрунті — Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН (м. Вінниця).

Морфологічні, культуральні та фізіологічні властивості ризобій досліджували загальноприйнятими методами [5, 6]. Чутливість бактерій до антибіотиків вивчали методом дифузії в агарі з використанням дисків. Електронно-мікроскопічні дослідження ризобій проводили методом негативного контрастування. Клітини розглядали на електронному мікроскопі B-S540 Tesla при 75 кВ та робочому збільшенні на екрані: $\times 10000$. Для ідентифікації чистих культур бульбочкових бактерій використовували визначник Бергі [7].

Різноманіття бульбочкових бактерій квасолі оцінювали за допомогою серологічного методу. Поліклональні О-антисироватки до штамів ризобій квасолі *R. phaseoli* 700 (стандартний штам), *R. phaseoli* ФБ1 та *R. phaseoli* ФДЗ отримували за методикою О.А. Берестецького [6] у власній модифікації. Бульбочкові бактерії вирощували на твердому гороховому середовищі, бактеріальну масу змивали зі скосів агару фізіологічним розчином та осаджували центрифугуванням. До осаду клітин бактерій додавали по 5 мл фізіологічного розчину та 2,5%-го розчину глютарового альдегіду

і залишали у холодильній камері. Через одну добу бактеріальні клітини відмивали від глютарового альдегіду, осад ресуспендували і доводили титр антигена до 10^6 – 10^8 клітин/мл.

Схема імунізації дослідних тварин (кролів) включала шість ін'єкцій зі зростаючою дозою антигена, з підшкірним та внутрішньошкірним його введенням. Титр антисироваток та їх специфічність визначали за реакцією аглютинації методом Грубера — Відаля [8]. Як гетерологічні антигени використовували повільно- та швидкоорослі бульбочкові бактерії різних видів, що зберігаються у колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів ІСМАВ.

Для оцінки внутрішньовидового різноманіття штамів бульбочкових бактерій квасолі проводили RFLP-аналіз послідовності між генами 16S рРНК та 23S рРНК (ITS-регіону).

ДНК виділяли з п'ятидобових культур за допомогою набору «ДНК-сорб Б» (метод швидкого лізису). Ампліфікацію міжгенного спейсера 16S-23S рДНК здійснювали за допомогою праймерів FGPS1490-72 та FGPL132-38 [9, 10]. Температурно-часовий профіль ампліфікації: денатурація при 94°C — 30 с, віджиг праймерів при 55°C — 30 с, синтез комплементарного ланцюга при 72°C — 1 хв (30 циклів).

Рестрикцію ПЛР-продуктів проводили з використанням ендонуклеаз рестрикцій *MspI*, *HaeIII*, *NdeII* (Fermentas, США) згідно із інструкцією виробника. Оброблену рестриктазами ДНК аналізували за допомогою електрофорезу у 2,5%-му агарозному гелі. Розмір отриманих фрагментів ДНК визначали за допомогою комп'ютерної програми Total Lab v. 2.01.

Математичну обробку даних проводили за Б.О. Доспеховим [11] із застосуванням комп'ютерної програми Statistica 7.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Квасолію звичайну сортів Мавка (зернова квасоля) та Amazone (овочева квасоля) вирощували на зразках дерново-підзолистого, темно-сірого та сірого лісового ґрунтів з різними за щільністю популя-

ціями бульбочкових бактерій квасолі. З відібраних корневих бульбочок квасолі були отримані 50 ізолятів ризобій і вивчені їх морфолого-культуральні та фізіологічні властивості.

Встановлено, що досліджувані культури бульбочкових бактерій схожі між собою за морфологічними ознаками (рис. 1). Клітини бактерій мають форму злегка зігнутих паличок, розмір яких становить 0,7–1,0 мкм завширшки та 1,8–2,3 мкм завдовжки. Вони не утворюють спор, характеризуються рухливістю та є грамнегативними.

На твердому гороховому середовищі усі досліджувані ізоляти, незалежно від їх еколого-географічного походження, характеризуються швидким ростом. У чашках Петрі на 3–4-й день росту колонії мали округлу форму, за консистенцією — слизисті, напівпрозорі. Діаметр колоній становив 2–3 мм. Культури не росли на м'ясопептонному агарі. На поверхні лакмусового молока колонії утворювали прозору слизисту зону, розміри якої дещо різняться залежно від досліджуваної культури. Реакція середовища (рН) знижувалася до кислої.

Під час аналізу особливостей використання досліджуваними ризобіями джерел вуглецю було встановлено, що 95% ізолятів добре ростуть на середовищах з сахарозою, глюкозою, лактозою, мальтозою, фруктозою та манітом. Використання джерел мінерального азоту отриманими ізолятами є індивідуальною ознакою, хоча, загалом, вони краще ростуть на середовищах з амонійними солями та азотнокислим калієм. Переважно засвоюють відновлені форми азоту.

Усі отримані культури бульбочкових бактерій вступають в симбіотичні зв'язки з квасолею звичайною, утворюючи на коренях рослин активні червоні бульбочки.

На основі морфолого-культуральних, фізіологічних та симбіотичних властивостей отримані штами швидкорослих бульбочкових бактерій були ідентифіковані за визначником Бергі як *R. phaseoli*.

Для оцінки різноманіття бульбочкових бактерій у ґрунтових популяціях часто використовують тест на антибіотикорезистентність. Чутливість до антибіотичних



Рис. 1. Морфологія клітин бульбочкових бактерій квасолі, експоненційна фаза росту, збільшення: $\times 10000$

речовин також є однією з таксономічно важливих характеристик цих мікроорганізмів. Зважаючи на це, ми вивчали резистентність отриманих штамів ризобій квасолі до антибіотиків різної біологічної дії.

Виявлено, що досліджувані штами, загалом, подібні за чутливістю до антибіотиків. Так, бульбочкові бактерії *R. phaseoli* — ФБ1, ФМ1, ФА2, ФД1, ФД3, як і стандартний штам *R. phaseoli* 700 (табл. 1), виявились чутливими до різних інгібіторів, а саме: синтезу компонентів клітинної стінки (групи пеніциліну і цефалоспорино), синтезу білка (групи аміноглікозидів, макролідів та нітрофуранів), транскрипції і синтезу нуклеїнових кислот (група хінолонів), а також до інгібіторів функціонування цитоплазматичних мембран (група азолів). Лише до антибіотика оксациліну всі штами ризобій проявили резистентність, про що свідчить відсутність зон затримки їх росту.

Поряд із тим порівняння зон затримки росту дало змогу розділити досліджувані штами на дві групи. Так, штами *R. phaseoli* — ФБ1, ФМ1, ФА2 виявились подібними за цією ознакою, утворюючи окрему групу. Вони мали більш виражену чутливість до амоксициліну, ампіциліну, цефазоліну, амікацину, канаміцину, еритроміцину, ципрофлоксацину та були менш чутливими до фурадоніну, ніж штами другої групи *R. phaseoli* — ФД1 і ФД3. Крім того, зони

Чутливість штамів бульбочкових бактерій квасолі до антибіотиків

Механізм біологічної дії	Антибіотик	Зона затримки росту, мм					
		Штами <i>Rhizobium phaseoli</i>					
		700	ФБ1	ФМ1	ФА2	ФД1	ФД3
Інгібітори синтезу компонентів клітинної стінки	Оксацилін	0	0	0	0	0	0
	Левоміцетин	57±2	17±2	17±3	16±1	26±2	26±1
	Амоксицилін	75±2	88±1	86±2	89±1	49±2	48±2
	Ампіцилін	58±2	75±1	76±1	75±3	33±1	32±1
	Цефотаксим	74±2	89±1	81±1	86±1	71±2	64±1
	Цефтріаксон	84±1	89±1	82±2	88±1	71±4	68±2
	Цефалексин	58±2	88±1	83±1	87±2	63±1	68±1
	Цефазолін	18±2	87±2	85±3	87±1	37±2	35±2
Інгібітори синтезу білка	Гентаміцин	29±2	56±1	56±1	53±3	54±3	55±1
	Амікацин	45±1	63±1	64±2	63±1	27±1	30±2
	Канаміцин	15±2	63±1	58±1	64±2	15±2	17±1
	Еритроміцин	37±1	53±2	50±1	53±1	35±1	36±1
	Фурадонін	9±1	11±1	9±1	13±1	21±2	22±1
Інгібітори транскрипції і синтезу нуклеїнових кислот	Ципрофлоксацин	87±1	89±1	87±1	88±2	57±4	59±3
	Норфлоксацин	11±1	12±1	14±1	14±1	10±2	10±1
Інгібітори функціонування цитоплазматичних мембран	Поліміксин	12±1	13±1	13±1	12±2	12±1	13±1

затримки росту у представників двох груп штамів відрізнялись у 1,4–4,3 раза.

Наступним етапом нашої роботи було серологічне типування штамів бульбочкових бактерій квасолі різного еколого-географічного походження.

Із застосуванням модифікованих схем імунізації кролів були отримані імунні антисироватки до стандартного штаму *R. phaseoli* 700 і нових активних штамів бульбочкових бактерій квасолі *R. phaseoli* – ФБ1 та ФД3. Титр антисироваток у реакції аглютинації становив – 1:2560, 1:5120 та 1:5120 відповідно, робоче розведення – 1:200.

Усі антисироватки проявили високу специфічність, вони не вступали в реакцію з жодним із 24 досліджених штамів, що належать до п'яти родів бульбочкових

бактерій: *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Neorhizobium*, *Mezorhizobium* та *Rhizobium*. Не спостерігалося також позитивної перехресної реакції із штамми ризобій квасолі, до яких отримано антисироватки (*R. phaseoli* 700, *R. phaseoli* ФБ1 та *R. phaseoli* ФД3).

Для вивчення серологічного різноманіття бульбочкових бактерій квасолі були відібрані 40 штамів, вилучених із ґрунтів різних регіонів України. У роботі також використовували штам: стандартний – *R. phaseoli* 700 та типовий – *R. phaseoli* VKM В-1966.

Аналіз серологічних властивостей виділених штамів *R. phaseoli* засвідчив, що вони розрізняються за антигенним складом і належать до різних серологічних груп (табл. 2). Найбільшим серологічним різ-

Таблиця 2

Реакція культуральних антигенів штамів бульбочкових бактерій квасолі

Антигени (штами мікроорганізмів)	Географічне походження	Антисироватки			Неідентифіковані штами
		700	ФБ1	ФД3	
<i>R. phaseoli</i> 700	Мексика	+	-	-	-
<i>R. phaseoli</i> VKM В-1966	США	-	-	-	+
<i>R. phaseoli</i> – ФБ1, ФБ2, ФБ3, ФА2, ФА3, ФА4	Україна, Чернігівська обл.	-	+	-	-
<i>R. phaseoli</i> – ФД3, ФД1, ФД5, ФД6, ФД7, ФД8, ФД9, ФД10	Україна, Чернігівська обл.	-	-	+	-
<i>R. phaseoli</i> – ФМ1, СА3	Україна, Чернігівська обл.	-	-	-	+
<i>R. phaseoli</i> – ФК1, ФК2, ФК3, ФК4, ФК5, ФК6, ФК7, ФК8, ФК9, ФК10	Україна, Київська обл.	-	-	-	+
<i>R. phaseoli</i> – ФВ1, ФВ4, ФВ9, ФВ12, ФВ13, ФВ14	Україна, Вінницька обл.	-	+	-	-
<i>R. phaseoli</i> – ФВ2, ФВ3, ФВ5, ФВ6, ФВ7, ФВ8, ФВ10, ФВ11	Україна, Вінницька обл.	-	-	-	+

номаніттям характеризувалися штами бульбочкових бактерій квасолі (16 од.), вилучені з ґрунтів Чернігівської обл., які віднесені до двох серологічних груп – ФБ1 та ФД3. Лише два штами з цієї вибірки (*R. phaseoli* – ФМ1 та СА3) не були серологічно ідентифіковані. Також 43% штамів *R. phaseoli*, поширених у сірому лісовому ґрунті Вінницької обл., позитивно реагували з антисироваткою ФБ1, а інші ризобії відносились до неідентифікованих серогруп. Слід наголосити, що жоден із штамів (10 од.), вилучених із досліджуваної популяції ризобій квасолі в темно-сірому ґрунті Київської обл., не реагував з антисироватками ФБ1, ФД3 та 700.

В агроценозах України не виявлено бульбочкових бактерій квасолі, які належать до серогрупи 700, що, імовірно, обумовлено географічним походженням штаму *R. phaseoli* 700 (Мексика). Типовий штам ризобій квасолі *R. phaseoli* VKM В-1966 також не належить до серогруп ФБ1, ФД3, представники яких трапляються в ґрунтах України.

Отже, отримані нові штами бульбочкових бактерій квасолі мають істотні відмінності, і за складом соматичних антигенів розділяються на різні серологічні групи. Співвідношення штамів, що належать до різних серологічних груп, значно відрізняється залежно від територіальної зональності України. Найбільш серологічно різноманітними виявились ризобії квасолі, виділені з агроценозів Чернігівській обл.

Слід зауважити, що останнім часом для аналізу природних популяцій бульбочкових бактерій широко використовують методи молекулярної екології. Ідентифікацію мікроорганізмів здійснюють за допомогою детекції різних генів-маркерів. Метод, оснований на порівняльному аналізі послідовностей гена 16S рРНК, став популярним для проведення таксономічних досліджень. Проте використання цього гена як маркера доволі часто ускладнюється тим, що він може входити до складу геному бактерій у декількох копіях, піддаватися горизонтальному переносу і, зважаючи на високу консервативність його нуклеотидної послі-

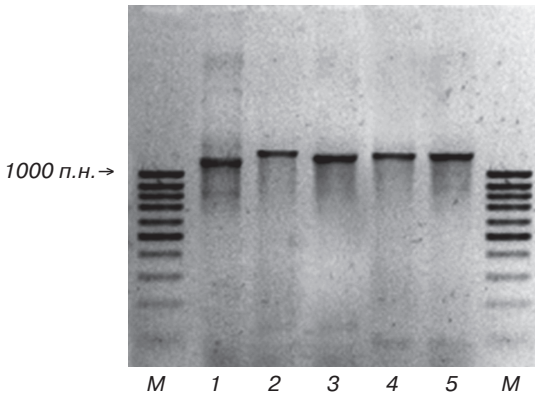


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації 16S-23S рДНК ITS-регіонів різних штамів бульбочкових бактерій квасолі: М — маркер молекулярної маси; штами *Rhizobium phaseoli*: 1 — VKM В-1966 (типовий штам), 2 — ФБ1, 3 — ФДЗ, 4 — ФМ1, 5 — ФА2

довності серед близьких видів, дає змогу ідентифікувати бактерії, в основному, на рівні роду. Дослідження міжгенного регіону 16S-23S рРНК (ITS-регіон) є більш перспективним для оцінки міжвидового та внутрішньовидового різноманіття бульбочкових бактерій.

Під час вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму штамів ризобій квасолі, що належать до різних серологічних груп, проводили рестрикційний аналіз ампліфікованої з використанням праймерів FGPS1490-72 і FGPL132-38 послідовності міжгенного ITS-регіону.

За ампліфікації ділянки спейсера в усіх досліджуваних штамів був отриманий один фрагмент розміром 1260–1450 п.н. (рис. 2), який потім порізно розщеплювали трьома ферментами ендонуклеазами рестрикції *MspI*, *HaeIII* та *NdeII*, що впізнають відповідні чотирихнуклеотидні послідовності C[^]CGG, GG[^]CC та [^]GATC.

Рестрикційні профілі ITS-регіонів штамів бульбочкових бактерій квасолі наведено на рисунку 3. Продемонстра-

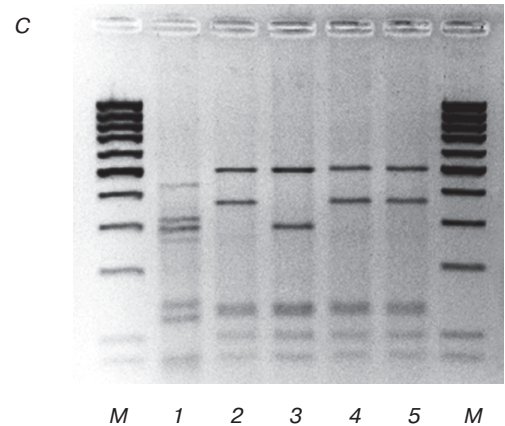
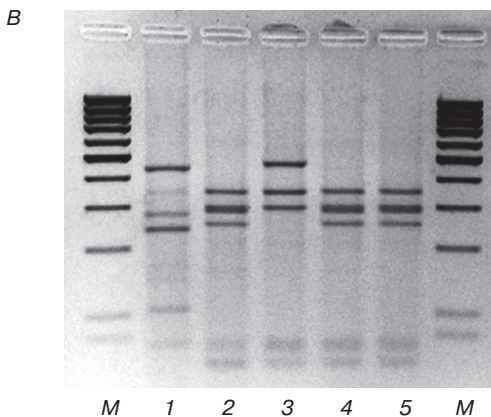
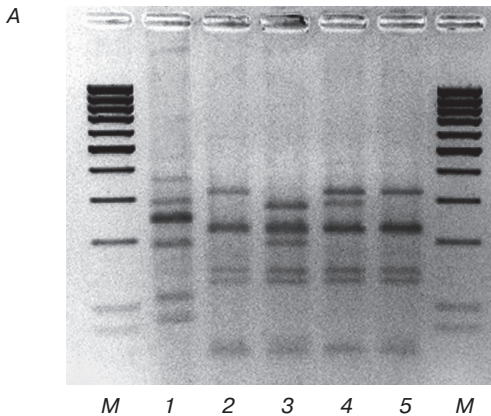


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції міжгенного спейсера 16S-23S рДНК штамів ризобій квасолі після обробки рестриктазами *MspI* (А), *HaeIII* (В), *NdeII* (С): М — маркер молекулярної маси; штами *Rhizobium phaseoli*: 1 — VKM В-1966 (типовий штам), 2 — ФБ1, 3 — ФДЗ, 4 — ФМ1, 5 — ФА2

но, що внаслідок незалежного розщеплення ампліфікатів 16S-23S рДНК трьома ферментами кількість утворених фрагментів ДНК варіювала у межах 5–7 од. Порівняння рестрикційних патернів свідчить, що за використання кожної рестриктази формувалася свій характерний набір фрагментів.

Встановлено, що кожний штам бульбочкових бактерій квасолі характеризувався унікальним фінгерпринтом, який мав різну кількість рестрикційних фрагментів ДНК з різною молекулярною масою (табл. 3).

Отримані дані демонструють високий ступінь гетерогенності досліджуваних штамів ризобій квасолі, які віднесено до різних ITS-типів. Так, штамми бульбочкових бактерій квасолі за схожістю рестрикційних профілів ДНК, отриманих унаслідок застосування рестриктази *MspI*, було розподілено

на чотири ITS-типи (MI–MIV). Типовий штам *R. phaseoli* VKM В-1966 характеризувався унікальним патерном, мав лише один спільний фрагмент (290 п.н.) із виділеними нами штамми *R. phaseoli* – ФДЗ та ФМ1 і був віднесений до MI ITS-типу. Штами *R. phaseoli* – ФБ1, ФДЗ, ФМ1 генерували різну кількість фрагментів і, незважаючи на наявність спільних фрагментів за рестрикційними профілями 16S-23S рДНК, утворювали різні ITS-типи (MII, MIII та MIV). Однаковими за організацією міжгенного спейсера виявилися штамми *R. phaseoli* – ФБ1 та ФА2.

Рестрикційний аналіз ITS-регіону за використання ферментів *HaeIII* та *NdeII* підтвердив виявлену гетерогенність штамів бульбочкових бактерій квасолі за цим генетичним маркером. Так, за допо-

Таблиця 3

ITS-типи та рестрикційні патерни, отримані під час ПЛР-RFLP аналізу 16S-23S рДНК ризобій квасолі

Штами мікроорганізмів	Розмір фрагментів (п.н.)	Кількість фрагментів	рДНК ITS-типи
рестриктаза <i>MspI</i>			
<i>R. phaseoli</i> VKM В-1966	90, 110, 200, 260, 290, 380	6	MI
<i>R. phaseoli</i> ФБ1	70, 130, 150, 230, 340	5	MII
<i>R. phaseoli</i> ФДЗ	70, 130, 150, 200, 230, 290	6	MIII
<i>R. phaseoli</i> ФМ1	70, 130, 150, 230, 290, 340	6	MIV
<i>R. phaseoli</i> ФА2	70, 130, 150, 230, 340	5	MII
рестриктаза <i>HaeIII</i>			
<i>R. phaseoli</i> VKM В-1966	70, 110, 250, 290, 360, 460	6	HI
<i>R. phaseoli</i> ФБ1	60, 70, 260, 300, 360	5	HII
<i>R. phaseoli</i> ФДЗ	60, 70, 300, 360, 480	5	HIII
<i>R. phaseoli</i> ФМ1	60, 70, 260, 300, 360	5	HII
<i>R. phaseoli</i> ФА2	60, 70, 260, 300, 360	5	HII
рестриктаза <i>NdeII</i>			
<i>R. phaseoli</i> VKM В-1966	80, 120, 140, 260, 300, 320, 440	7	NI
<i>R. phaseoli</i> ФБ1	50, 80, 100, 130, 380, 520	6	NI
<i>R. phaseoli</i> ФДЗ	50, 80, 100, 130, 300, 520	6	NIII
<i>R. phaseoli</i> ФМ1	50, 80, 100, 130, 380, 520	6	NI
<i>R. phaseoli</i> ФА2	50, 80, 100, 130, 380, 520	6	NI

могою кожної з рестриктаз досліджувані штами ризобій квасолі були віднесені до трьох ITS-типів — *HI*, *III*, *III* та *NI*, *MI*, *MI* відповідно. Штами *R. phaseoli* — ФБ1, ФМ1 і ФА2 виявилися подібними за рестрикційними профілями (*III* і *MI* ITS-типи) і відрізнялися від штаму *R. phaseoli* ФДЗ, який віднесено до *III* та *MI* ITS-типів. Патерни типового штаму *R. phaseoli* VKM В-1966 істотно відрізнялися від патернів виділених нами штамів ризобій квасолі, що свідчить про їхню генетичну різноманітність.

Слід зауважити, що поділ штамів на ITS-типи за використання рестриктаз *HaeIII* та *NdeII* відповідає їх поділу на різні серологічні групи (ФБ1 та ФДЗ відповідно). Тобто отримані дані можуть свідчити про існування певного зв'язку між організацією ITS-регіону та антигенною структурою штамів бульбочкових бактерій квасолі.

Отже, отримані результати свідчать, що штами бульбочкових бактерій квасолі, вилу-

чені з досліджуваних популяцій ризобій, мають істотні генетичні відмінності. На основі рестрикційних профілів 16S-23S рДНК вони вперше розділені на різні ITS-типи.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що ризобії квасолі різного географічного походження істотно розрізняються за антигенним складом і відносяться до різних серологічних груп.

Із застосуванням методу ПЛР-RFLP ITS-регіону виявлено значний генетичний поліморфізм бульбочкових бактерій квасолі, поширених у агроценозах України. За рестрикційними профілями 16S-23S рДНК їх вперше розділено на різні ITS-типи.

Отримані результати є основою для подальшого вивчення серологічних та генетичних властивостей ризобій квасолі, що дасть змогу розширити уявлення про особливості формування популяцій мікросимбіонтів цієї культури в ґрунтах України та їх здатність адаптуватись до конкретних екологічних умов.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шерстобоева О.В. Екологічні, економічні та соціальні передумови біологічного землеробства // Агроекологічний журнал. — 2007. — № 1. — С. 67–70.
2. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation / J. Michiels, B. Dombrecht, N. Vermeiren et al. // FEMS Microbiol. Ecol. — 1998. — Vol. 26 (3). — P. 193–205.
3. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications / C. Silva, P. Vinuesa, L.E. Eguiarte et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 69. — P. 884–893.
4. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen / R.F. Dall'Agnol, R.A. Ribeiro, E. Ormeno-Orrillo, et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2013. — Vol. 63. — P. 4167–4173.
5. Большой практикум по микробиологии / Под общ. ред. Г.Л. Селибера. — М.: Высшая школа, 1962. — 491 с.
6. Берестецкий О.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности / О.А. Берестецкий. — Л., 1979. — 33 с.
7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part A + B + C / [Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley; Editor-in-chief G.M. Garrity]. — New York, NY: Springer SBM, 2nd ed., 2005. — Vol. 2. — 2800 p.
8. Кэбот Э. Экспериментальная иммунология / Э. Кэбот, Б. Мейер. — М.: Медицина, 1968. — 677 с.
9. *Ponsonnet C.* Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions / C. Ponsonnet, X. Nesme // Arch. Microbiol. — 1994. — Vol. 161. — P. 300–309.
10. ITS analysis of procaryotes / P. Normand, C. Ponsonnet, X. Nesme et al. // Mol. Microbial Ecology Manual. — 1996. — Vol. 5, No. 3 (4). — P. 1–12.
11. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. — М.: Агропромиздат, 1985. — 352 с.

REFERENCES

1. Sherstoboeva O. (2007). *Ekolohichni, ekonomichni ta sotsialni peredumovy biolohichnoho zemlerobstva* [Ecologic, economic and social ground of biological agricultural]. *Ahroekolohichniy zhurnal* [Agroecological journal], No. 1, pp. 67–70 (in Ukrainian).
2. Michiels J., Dombrecht B., Vermeiren N., Xi C.W., Luyten E., Vanderleyden J. (1988). *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation, FEMS Microbiol. Ecol. Publ., Vol. 26 (3), pp. 193–205 (in English).

3. Silva C., Vinuesa P., Eguiarte L.E., Martinez-Romero E., Souza V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum nodulate* common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications, Appl. Environ. Microbiol. Publ., Vol. 69, pp. 884–893 (in English).
4. Dall'Agnol R.F., Ribeiro R.A., Ormeno-Orrillo E., Rogel M.A., Delamuta J.R.M., Andrade D.S., Martinez-Romero E., Hungria M. (2013). *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Publ., Vol. 63, pp. 4167–4173 (in English).
5. Seliber G.L. (1962). *Bolshoy praktikum po mikrobiologii* [Large workshop in microbiology]. Moskva: Vysshaja shkola Publ., 491 p. (in Russian).
6. Berestetskiy O.A. (1979). *Metodicheskie rekomendatsii po polucheniiu novykh shtammov klubenkovykh bakteriy i otsenke ikh effektivnosti* [Guidelines for the preparation of new strains of nodule bacteria and assess their effectiveness]. Leningrad Publ., 33 p. (in Russian).
7. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part A + B + C*, New York, NY: Springer SBM, Vol. 2, 2800 p. (in English).
8. Kebot E., Meyer B. (1968). *Eksperimentalnaya immunologiya* [Experimental immunology] Moskva: Medicina Publ., 677 p. (in Russian).
9. Ponsonnet C., Nesme X. (1994). Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions, Arch. Microbiol., Vol. 161, pp. 300–309 (in English).
10. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X., Neyra M., Simonet P. (1996). ITS analysis of prokaryotes, Mol. Microbial Ecology Manual. Vol. 5, No. 3.4, pp. 1–12 (in English).
11. Dospheov B.A. (1985). *Metodika polevogo opyta* [Methodology of field experience]. Moskva: Agropromizdat Publ., 352 p. (in Russian).

УДК 579.26: 631.461.5

АЗОТФІКСУВАЛЬНЕ МІКРОБНЕ УГРУПОВАННЯ КОРЕНЕВОЇ ЗОНИ ТА ПРОДУКТИВНІСТЬ ГРЕЧКИ ЗА ВПЛИВУ ГРИБА *CHAETOMIUM COCHLIODES*

Є.П. Копилов, А.С. Йовенко

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН

Встановлено, що обробка насіння гречки посівної ґрунтовим сапротрофним грибом Chaetomium cochliodes 3250 забезпечує підвищення чисельності діазотрофів у кореневій зоні культури. Так, у ризосфері рослин збільшується кількість бактерій родів Azospirillum та Azotobacter, у ризоплані зростає чисельність всіх досліджуваних груп мікроорганізмів, що супроводжувалось активізацією процесу фіксації молекулярного азоту. В ризосферному ґрунті нітрогеназна активність підвищувалась в 1,3 раза, в ризоплані гречки — у 11,3 раза. Використання гриба сприяло зростанню врожайності культури на 12,6%.

Ключові слова: гречка посівна, *Chaetomium cochliodes* 3250, азотфіксувальне мікробне угруповання, нітрогеназна активність.

Поліфункціональні властивості грибів роду *Chaetomium* та перспективність їх використання в сільськогосподарському виробництві заслуговують на увагу дослідників. Серед грибів цього роду виявлено активні агенти біологічного впливу, що пригнічують ріст бактерій та грибів шля-

хом прямої конкуренції, мікропаразитизму або антибіозу. Так, гриби роду *Chaetomium* успішно використовуються для боротьби з кореневими гнилями цитрусових, чорного перцю, полуниці [1, 2]. Мікроміцет *C. globosum* здатен продукувати антибіотичну речовину хетомін, що пригнічує збудника захворювання цукрових буряків *Pythium ultimum* [3], та хетовіридин (*Chaetoviridin*),

© Є.П. Копилов, А.С. Йовенко, 2016