

УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА

На правах рукопису

Кириленко Людмила Василівна

УДК 579.64:631.461.5: 633.31/37

**ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ
RHIZOBIUM GALEGAE – КОЗЛЯТНИК ЗА ДІЇ
ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ**

03.00.07 – мікробіологія

Дисертація

на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Науковий керівник:
Патика Володимир Пилипович,
доктор біологічних наук,
професор, академік НААН

Умань – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ НАПРЯМИ ДОСЛІДЖЕНЬ З ФОРМУВАННЯ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ <i>RHIZOBIUM GALEGAE</i> – КОЗЛЯТНИК ТА ВПЛИВУ ЕКОЛОГІЧНИХ ФАКТОРІВ НА РОЗВИТОК І ПРОДУКТИВНІСТЬ БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	11
1.1. Біологічні особливості і використання козлятнику	11
1.2. Формування симбіотичної системи <i>Rhizobium galegae</i> – козлятник	20
1.3. Роль генотипів макро- і мікросимбіонтів за утворення симбіотичних систем	25
1.4. Селекція високоефективних штамів бульбочкових бактерій	27
1.5. Біологічна фіксація азоту: види азотфіксаторів та їх розповсюдження у природі. Вплив екологічних факторів на розвиток і продуктивність бобово-ризобіального симбіозу	31
РОЗДІЛ 2. УМОВИ, ОБ’ЄКТИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	41
2.1. Ґрунтово-кліматичні умови Лісостепу правобережного	41
2.2. Об’єкти досліджень	45
2.3. Методи досліджень	51
2.3.1. Виділення бактерій із козлятнику східного та методи вивчення їхніх патогенних властивостей	51
2.3.2. Вивчення культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей виділених штамів бактерій, збудників бактеріальних хвороб козлятнику східного	52
РОЗДІЛ 3. ФОРМУВАННЯ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ <i>RHIZOBIUM GALEGAE</i> – КОЗЛЯТНИК	57

	3
3.1. Скринінг штамів <i>Rhizobium galegae</i> за їхньою здатністю утворювати ефективну симбіотичну систему з <i>Galega orientalis</i> Lam.	58
3.2. Виділення та добір нових ефективних штамів <i>Rhizobium galegae</i>	60
3.3. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості перспективного штаму <i>Rhizobium galegae</i> Л2	62
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ БІОПРЕПАРАТІВ НА МІКРОБНІ УГРУПОВАННЯ ҐРУНТУ РИЗОСФЕРИ КОЗЛЯТНИКУ СХІДНОГО	68
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ <i>RHIZOBIUM GALEGAE</i> – КОЗЛЯТНИК	80
5.1. Збудники бактеріальних хвороб козлятнику східного	80
5.2. Фітопатогенні гриби козлятнику східного	85
5.3. Вплив домінуючих фітопатогенних бактерій і грибів козлятнику східного на симбіотичну систему <i>Rhizobium galegae</i> – козлятник	89
РОЗДІЛ 6. ЕКОНОМІЧНА ТА ЕНЕРГЕТИЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ НАСІННЯ КОЗЛЯТНИКУ ШТАМОМ <i>RHIZOBIUM GALEGAE</i> Л2	98
6.1. Економічна ефективність передпосівної інокуляції насіння козлятнику східного штамом <i>Rhizobium Galegae</i> Л2	98
6.2. Енергетичне оцінювання технологій вирощування козлятнику східного за передпосівної інокуляції насіння штамом <i>Rhizobium Galegae</i> Л2	102
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	107
ВИСНОВКИ	113
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	115
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	116
ДОДАТКИ	150

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

КА – картопляний агар;

КУО/мл – колонієутворювальних одиниць в 1 мл;

МПБ – м'ясопептонний бульйон;

ПАР – поверхнево-активна речовина;

ПДА – подвійна дифузія в агарі;

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота;

МДж /га – мегаджоулі на 1 гектар;

Ср.бр – середня багаторічна температура повітря.

НІР – найменша істотна різниця – величина, що вказує на межу можливих випадкових відхилень в експерименті; це та мінімальна різниця в урожаях між середніми, яка в даному досліді визнається істотною при 5% ($НІР_{0,5}$) рівні значущості.

ВСТУП

Козлятник східний, як жодна з інших бобових культур, здатний покращити екологічний стан екосистеми країни завдяки збагаченню ґрунту біологічним азотом, який засвоюється з атмосфери бульбочковими бактеріями у симбіозі з козлятником.

Актуальність теми. Козлятник східний є надзвичайно перспективною культурою в сучасному екологічно орієнтованому сільському господарстві. Цінність його полягає не тільки у здатності до багаторічного зростання, резистентності до мінливих кліматичних умов, високому вмісті білка, вітамінів, поживних речовин, амінокислот, а й у здатності фіксувати біологічний азот великими кількостями, нагромаджуючи понад 300 кг/га його в орному шарі за вегетаційний період [12, 70, 156, 171]

Розв'язанню проблеми ефективності функціонування бобово-ризобіальної системи у різні часи було приділено багато уваги [65, 66, 89 – 91, 93] На формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу величезний вплив мають абіотичні, біотичні, та антропогенні фактори зовнішнього середовища. Серед біотичних особливу роль відіграють ґрунтові мікроорганізми, зокрема, фітопатогенні гриби, бактерії, які є збудниками хвороб козлятнику. Нагромаджуючись у ґрунті, вони пригнічують ріст рослин і знижують врожайність сільськогосподарських культур [21, 25, 45]. Проте, вплив фітопатогенних мікроорганізмів на азотфіксуючий потенціал козлятнику досліджено недостатньо.

Щоб підвищити резистентність рослин до впливу фітопатогенних мікроорганізмів потрібно досконало вивчити і зрозуміти механізм взаємодії в системі бобові рослини – бульбочкові бактерії – фітопатогенні мікроорганізми. Це дасть змогу навіть регулювати цими процесами, що значно покращить функціонування цієї системи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано відповідно до угоди про творчу науково-технічну співдружність

між Вінницьким національним аграрним університетом та Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (від 24.03. 2009 р.) у межах науково-дослідної роботи відділу фітопатогенних бактерій за темами: «Моніторинг і генетична різноманітність фітопатогенних бактерій в системі органічного землеробства» (ДР № 0112U002751, 2012–2016 рр.) та «Метаболічні профілі сапрофітних бактерій родів *Pantoea* і *Pseudomonas* при формуванні асоціативних взаємодій у системах мікроорганізм – рослина» (ДР № 0112U002747, 2012–2016 рр.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у дослідженні ефективності симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник східний за дії фітопатогенних мікроорганізмів.

Відповідно до поставленої мети було визначено такі завдання:

– виділити високоефективні штами бульбочкових бактерій з кореневої системи козлятнику, вивчити їхні культурально-морфологічні властивості і вплив на ростові процеси, функціонування симбіотичного апарату та кормову і насінневу продуктивність козлятнику;

– визначити чисельність та родовий склад фітопатогенних бактерій і грибів козлятнику, дослідити їхній вплив на процес формування бульбочок та активність симбіотичної фіксації азоту;

– вивчити взаємодію штамів *Rhizobium galegae* з фітопатогенними грибами і бактеріями, що спричиняють хвороби козлятнику;

– дослідити вплив інокуляції насіння козлятнику бульбочковими бактеріями на підвищення резистентності рослин до збудників хвороб та на амоніфікуючу і нітрифікуючу здатність ґрунту;

– дати економічну та енергетичну оцінку застосуванню передпосівної інокуляції насіння козлятнику активними штамми бульбочкових бактерій.

Об'єкт досліджень – дія фітопатогенних мікроорганізмів на азотфіксуючий потенціал у симбіотичній системі козлятник – бульбочкові бактерії.

Предмет досліджень – роль системи *Rhizobium galegae* – козлятник у підвищенні врожайності та якості і збереження високого азотфіксуючого потенціалу за дії фітопатогенних мікроорганізмів.

Методи дослідження – мікробіологічні, біохімічні, біотехнологічні, фізико-хімічні, статистичні, розрахунково-порівняльні – для визначення економічної та енергетичної ефективності технології вирощування козлятнику.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше визначено градацію штамів бульбочкових бактерій для створення ефективно функціонуючого бобово-ризобіального симбіозу *Rhizobium galegae* – козлятник східний за дії фітопатогенних бактерій і грибів.

Розширено уявлення про можливість формування високопродуктивної симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник східний шляхом координованої селекції макро- та мікросимбіонтів в умовах Лісостепу України.

Науково обґрунтовано та експериментально доведено, що за умов ефективної взаємодії макро- та мікросимбіонтів інокуляція насіння козлятнику активними штамми ризобій сприяє підвищенню урожайності та резистентності рослин до збудників хвороб.

Виділено новий штам *Rhizobium galegae* ЛІ2, який за впливом на ефективність приросту зеленої маси козлятнику східного та її якість значно перевершував виробничий штам *Rhizobium galegae* CIAM 0703 і еталонний штам *Rhizobium galegae* МС-1 №159.

Практичне значення одержаних результатів. До макросимбіонту козлятнику (*Galega orientalis* Lam.) підібрано комплементарний йому високоактивний штам *Rhizobium galegae* ЛІ2, який захищено патентом України (№ 95714, 2015 р.). Доведено можливість застосування цього штаму для підвищення урожайності насіння і поліпшення його якості за дії фітопатогенних мікроорганізмів. Отримані дані є потенційно важливими для

скринінгу вискоєфективних штамів бульбочкових бактерій в процесі створення мікробних препаратів для рослинництва.

Основні результати досліджень хвороб козлятнику східного, заходів захисту його від фітопатогенних мікроорганізмів та застосування біологічно активних препаратів природного походження використано у методичних рекомендаціях «Хвороби козлятнику східного: моніторинг, діагностика, профілактика», Вінниця, 2016. Результати дисертації рекомендовано використовувати при викладанні курсів «Фітопатологія», «Бактеріози рослин», «Біологічні методи захисту рослин», «Загальна мікробіологія» тощо у вищих навчальних закладах сільськогосподарського та біологічного профілю.

Основні результати наукових досліджень пройшли у 2014–2015 рр. виробничу перевірку в господарствах Оратівського району Вінницької області: СФГ «Надія М.В.» на площі 25 га, у СФГ «Ескіт» – на площі 23 га та у ТОВ «Скоморошківське» – на площі 35 га. Впроваджена технологія вирощування козлятнику забезпечила приріст урожаю 4,5 т/га, 4,2 і 5,3 т/га відповідно.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Здобувачем самостійно проаналізовано відповідну наукову літературу, розроблено програми досліджень, сплановано і проведено лабораторні, вегетаційні та польові дослідження, здійснено фенологічні спостереження. Експериментальні дослідження, статистичне оброблення одержаних результатів, підготовку наукових праць до друку, формулювання висновків проведено за безпосередньої участі здобувача під керівництвом д.б.н., професора, академіка НААН В.П. Патики, якому автор висловлює особливу подяку.

Вивчення культурально-біохімічних властивостей фітопатогенних бактерій, грибів та їхню ідентифікацію проведено спільно із співробітниками відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології

ім. Д.К. Заболотного НАН України д.б.н. Л.А. Пасічник і провідним інженером Н.В. Житкевич, за що автор висловлює їм щирю подяку.

Дослідження нових штамів *Rhizobium galegae* проведено спільно з д.б.н., професором, чл.- кор. НАН України С.Я. Коцем, якому автор щиро вдячна.

Ефективність нових штамів у вегетаційних і польових умовах визначено спільно з к.с.-г.н. Ю.М. Шкатулою, за що автор висловлює йому щирю подяку.

Висловлюємо щирю подяку к.с.-г.н. В.І Циганському за консультативну підтримку в розрахуванні економічної ефективності використання *Rhizobium galegae* Л2 для інокуляції насіння козлятнику східного.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертаційної роботи оприлюднені, обговорені та отримали позитивну оцінку на щорічних засіданнях вченої ради Вінницького національного аграрного університету (Вінниця, 2012–2014 рр.); на Всеукраїнській науково-практичній конференції: «Екологічні проблеми природокористування та охорона навколишнього середовища», (Рівне, 2013 р.); XIII з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Ялта, 2013); Міжнародній науковій конференції «Збереження біологічного різноманіття природних і аграрних ландшафтів та розбудова заповідних територій степового Придністров'я» (Дніпропетровськ, 2014 р.); Міжнародній науковій конференції «Проблеми і перспективи біологічного землеробства» (с. Рассвет (Росія), 2014 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Біологічна фіксація азоту» (Тернопіль, 2014 р.).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 15 наукових праць, з них 2 монографії, 6 статей у фахових виданнях (у тому числі 2 в зарубіжних виданнях, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 1 стаття у зарубіжній монографії, 3 – у матеріалах і тезах конференцій, 2 методичні рекомендації, 1 патент.

Обсяг та структура роботи. Дисертаційну роботу викладено на 164 сторінках комп'ютерного тексту. Робота складається зі вступу, огляду наукової літератури, опису матеріалів, методів та умов проведення досліджень, чотирьох розділів експериментальної частини, висновків, рекомендацій виробництву, додатків. Робота містить 22 таблиці, 10 рисунків. Список використаної літератури становить 305 джерел, з яких 83 латиною.

РОЗДІЛ 1

**ОСНОВНІ НАПРЯМИ ДОСЛІДЖЕНЬ З ФОРМУВАННЯ
СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ *RHIZOBIUM GALEGAE* – КОЗЛЯТНИК
ТА ВПЛИВУ ЕКОЛОГІЧНИХ ФАКТОРІВ НА РОЗВИТОК І
ПРОДУКТИВНІСТЬ БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ (ОГЛЯД
ЛІТЕРАТУРИ)**

1.1. Біологічні особливості і використання козлятнику

На особливу увагу науковців заслуговує нині бобова культура – козлятник східний. Взагалі, родина бобові (*Fabaceae*) налічує 1800 видів, що належать до 650 родів, у тому числі і рід козлятник (*Galega L.*) [141]. У складі роду налічується 8 видів козлятнику [31, 216]. Різні його види ростуть в Європі, на Балканах, на Кавказі, у Середземномор'ї, в Малій Азії та Ірані. Кілька видів зростають на американському континенті [30]. Щодо України, то в її природніх умовах можна зустріти козлятник лікарський (*Galega officinalis L.*) [209], який містить менше алкалоїдів, вид – козлятник східний (*Galega orientalis Lam.*) [30]. У дикорослому стані козлятник східний (*Galega orientalis Lam.*) росте в лісовій та передгірській зонах Кавказу на галявинах, узліссях лісу, серед чагарників, по схилах гір, уздовж доріг, частіше на пухких, багатих органічними речовинами а, також, нейтральних ґрунтах; у гірських районах Вірменії, Грузії, Дагестану, Азербайджану і в Криму [30, 48, 190].

Козлятник також має назву: галега з грецької «гала» – молоко і «агеїн» – діяти, тому що рослина вважається молокогінною [86].

Уперше випробування козлятнику східного як кормової рослини проведено на початку 20-х рр. ХХ ст. у Всесоюзному науково-дослідному інституті рослинництва, де його було вперше введено в культуру [31]. З цього періоду досконаліше вивчають його біологічні особливості.

Козлятник східний (*Galega orientalis* Lam.) – багаторічна бобова рослина родини бобових Fabaceae, роду *Galega* є високобілковою культурою, тому можна сміливо сказати, що йому належить важлива роль у зміцненні кормової бази тваринництва та відновленні родючості ґрунтів.

За типом кореневої системи козлятник належить до стрижнекорневих рослин [1, 30, 209]. Коренева система потужна, проникає у глиб ґрунту на 60–80 см [30, 209]. Головний корінь добре виражений, з численними бічними відгалуженнями, що закінчуються тонкими ниткоподібними корінцями [2]. На головному корені формується близько 18 і більше корневих паростків, які ростуть горизонтально, а потім, загинаючись під прямим або тупим кутом, виходять на поверхню ґрунту і утворюють стебло. Крім того, від кореневої шийки відростає від 3 до 7 стебел. До кінця вегетаційного періоду кожного року в підземній частині стебел утворюється 3–4 зимуючі бруньки. За рахунок зимуючих бруньок і корневих паростків відбувається вегетативне відновлення рослини. Завдяки здатності до вегетативного розмноження посіви козлятнику з роками не зріджуються, а, навпаки, загущуються, утворюючи щільний травостій [2, 30].

Козлятник східний сприяє підвищенню родючості ґрунтів. За виходом корневих рештків з 1 га він переважає конюшину і люцерну майже у 1,5 рази [19, 31].

Основна маса його коренів розташована в орному шарі і рясно постачає азотфіксуючі бульбочки (до 1500 шт. на рослину), які добре зв'язують атмосферний азот. На коренях козлятнику з фази стеблуння виникають бульбочки овальної форми розміром $2-4 \times 1,0-1,5$ мм, за різними даними від 5 до 200, від 142 до 270, і навіть до 1500 бульбочок [2, 31, 209]. Після укусу бульбочки здебільшого руйнуються через припинення надходження до них пластичних речовин. У міру відростання і появи нового листя бульбочки знову утворюються на молодих коренях [96, 192].

Азотфіксуючі бульбочки активно починають формуватися з першого року життя, посіви накопичують в орному шарі ґрунту понад 25,0 т/га

коренів і поживних рештків, близько 300 кг/га азоту, покращують аерацію і структуру ґрунту, очищають його від бур'янів, збудників хвороб і шкідників, відновлюють родючість [96, 137, 168, 176, 186].

Крім того, козлятник, збагачуючи ґрунт великою кількістю поживно-кореневих рештків, активізує діяльність ґрунтової біоти під культурами, які культивують після нього, що визначає його хорошим попередником [96, 100, 186].

На другий–третій рік життя рослина утворює 10–20 пагонів заввишки 100–150 см, на 1 м – близько 100 шт., а за сприятливих умов – до 2 м [2, 30, 183, 209]. Стебло прямостояче, порожнисте, трубчасте, з неглибокими борозенками, матово-зеленого забарвлення [31]. На стеблі до 14 міжвузлів, у верхній частині вони розгалужуються [30, 205]. У вузлах стебла розташовано велике, складне непарно-перисте чергове листя, завдовжки 15 – 30 см [31, 189], що складається з 9–15 яйцеподібних або видовжено-яйцеподібних листочків [2, 183]. Довжина листочка – 4–8, ширина – 2–5 см. Листя зверху темно-зелене, знизу жовтувато-зелене. Жилкування листочків сітчасте. Краї їх опушені дрібними волосками [31]. Верхня частина листочка має невеликий шипик завдовжки 0,5–1 мм. Довжина черешка нижніх листків 3–16, верхніх – 1–6 см. Листя при висиханні не обсипається, що дуже важливо для заготівлі сіна [97, 202]. У подальшому на пагонах формується непарноперисте листя з 5–7 листочків [3].

На кожному стеблі 3–4 суцвіття, які бувають одно-, дво- і трикитицеві. Число китиць варіює від 1 до 4, від 1 до 15, від 1 до 11, а число квіток у китиці – від 5 до 153, від 3 до 136, від 2 до 65 для пагонів 1-го, 2-го і 3-го порядків відповідно [172]. Довжина китиці 15–20 см і більше, в одній – по 25–75 синьо-фіолетових квіток [31, 48]. Квітки метеликового типу з 5-ти зубчастою чашечкою, великі, бузкові, блідо-голубі, блідо-фіолетові, іноді білі, завдовжки близько 1 см [2] з типовою для бобових будовою, але відкритіші, з неглибоким розташуванням нектарників [30, 172].

Плід – лінійний слабозігнений, загострений до кінця біб, довжиною 2–4 см, світло- або темно-коричневий. У плодах міститься 3–7 насінин, але може бути і 9–14, вони не опадають і не розтріскуються упродовж 2–3 тижнів, що запобігає втратам при збиранні [30, 209].

Насіння у козлятнику ниркоподібної форми, дуже нагадує насіння люцерни посівної, але значно більше. Щойно зібране зріле насіння жовтувато-зеленого або оливкового кольору, при зберіганні воно стає світло-коричневим, а потім темно-коричневим [30, 183, 209]. Маса 1000 насінин 5,0–9,0 г [30]. Насіння через тривале набрякання оболонки проростає повільно. Вимагає не тільки певної температури (16 °С і більше), а й високої ґрунтової вологості. Схожість воно зберігає до 8 років [27].

Козлятник має певну біологічну особливість – твердонасінність. Вона залежить від багатьох чинників і змінюється від 50 до 98% [171]. Твердонасінність сприяє збереженню виду в дикій формі, головним чином, за насінневого розмноження, зумовлюючи різночасове проростання насіння під час усього літа. Скарифікація насіння перед сівбою дає можливість збільшити його схожість до 95–100% [12, 19, 96, 102, 192]. Якщо перед сівбою насіння проскарифіковано, воно зійде через 8 – 15 діб [30], через 7–10 діб після появи сходів з'явиться перший справжній листок, а вже через 14–18 діб розпочинається стеблуння. Козлятник зацвіте на 70–75-ту добу другого року вегетації; у рік посіву в генеративну фазу переходить лише 5–7 % рослин [171]. Важливо, що для успішної зимівлі висота травостою козлятнику першого року вегетації залежно від ґрунтово-кліматичних умов має сягати 60–80 см і утворити зимуючі бруньки на кореневій шийці та корневі відростки з достатнім запасом пластичних речовин. Для цього період активної вегетації має бути не менше 85–90 діб (оптимально – 110–112 діб), інакше рослини очікує значна або повна загибель взимку [2, 30, 164].

Козлятник східний за своїми біологічними особливостями є рослиною озимого типу. В перший рік життя зацвітають лише окремі пагони через 70–

80 діб після сходів, цвітіння слабке і урожайність невисока [2, 96, 217]. У рік сівби цвіте в кінці літа, іноді дає насіння [31, 97, 164, 174, 192].

У другий і наступні роки козлятник відростає рано – наприкінці квітня. До першого скошування травостій козлятнику готовий 10–20 червня, до другого – через 55–60 діб. У першій декаді червня у нижній частині суцвіття козлятнику утворюються боби, а у верхній – триває цвітіння. На початку липня на рослинах буріє 40–50% бобів, а через 70–80 діб після сходів, до кінця липня, настає повна стиглість насіння [96, 194, 217, 300].

Важливою біологічною особливістю козлятнику є властива йому починаючи із другого року життя висока енергія росту і високопродуктивне використання зимових запасів води з ґрунту. Тому середньодобовий приріст рослин у висоту в середньому становить 2–4 см, а в період бутонізації і перед цвітінням він сягає 5–6, інколи 7 см [3, 30]. На другому році вегетації в 1,2–1,7 рази збільшується площа листкової поверхні [193].

Щодо першого року життя козлятнику, необхідно відмітити характерну йому загальну закономірність – слабку фотосинтетичну діяльність і низьку врожайність біомаси, на другий і наступні роки життя спостерігається раннє і швидке наростання всіх показників фотосинтетичної діяльності рослин і формування високого врожаю зеленої і сухої маси через 70–80 діб після сходів [173].

Взагалі козлятник східний належить до геліофітів, тобто це культура дуже світлолюбна, яка негативно реагує на затінення, особливо в перші 40–50 діб після появи сходів: можуть знижуватися темпи зростання і розвитку рослин, погіршуватиметься формування кореневої системи, що призведе до загибелі значної частини рослин взимку і, як наслідок, зниження кормової і насінневої продуктивності [2]. Тому вирощування козлятнику під покривом інших культур призводить до сильного пригнічення і зрідження травостою, як в перший рік життя, так і у наступні [30, 115, 164, 234]. Цікаво, що ефективним виявилася сівба козлятнику під ячмінь при зниженій нормі висіву останнього [170, 234].

Незважаючи на своє південне походження, козлятник східний вирізняється високою холодо- і морозостійкістю, що зумовлено високим вмістом розчинних цукрів у зимуючих органах. Низка науковців [31, 164, 173, 176] зазначають, що рослини переносять безсніжні і суворі зими з морозами до -25 °С. А за високого снігового покриву козлятник може перенести до -52 °С [169]. Козлятник також легко переносить весняні та осінні приморозки до мінус $3-5$ °С [31, 193, 276]. Саме тому, на думку деяких авторів, його можна вважати перспективною кормовою рослиною для вирощування в Лісостепу України [2].

Насіння козлятнику розпочинає проростати за температури $5-6$ °С, оптимум перебуває у межах $10-12$ °С, навесні у фазі відростання листя витримує приморозки до $-5-6$ °С і короткочасний сніговий покрив [2]. Козлятник досягає укісної стиглості на $8-10$ діб раніше еспарцету, на $12-16$ – люцерни, на $15-20$ діб – конюшини, що дає можливість розширити виробництво сировини для заготівлі різних видів кормів [37, 96, 137, 167, 186, 276, 300].

Деякими авторами зазначено позитивний вплив сприятливих ґрунтово-кліматичних умов та дотримання агротехнічних вимог на біологічну продуктивність козлятнику: вона може становити $600-800$ і навіть 1000 кг/га [130]. Вирощування високих врожаїв зафіксовано у Білорусі, Росії, Україні, Фінляндії [33, 240, 272, 300].

Для отримання високих показників врожайності, козлятник рекомендують вирощувати на південних схилах, які рано звільняються від снігу і добре прогріваються, що сприяє найраннішому відростанню рослин та приросту врожаю зеленої маси і насіння [170].

Науковці висловлюють різні твердження щодо вибагливості козлятнику до ґрунту. Одні вважають, що ця рослина невибаглива до ґрунту, може рости як на легких супісках, так і на важких суглинкових ґрунтах [221], добре росте на чорноземах, сірих лісових, дерново-підзолистих ґрунтах різного механічного складу [2, 12]. Інші стверджують, що козлятник

вибагливий до родючості ґрунту: з 1 т сухої речовини він виносить до 35 кг азоту, 4 – фосфору і 10 кг – калію. Добре росте на родючих, пухких, водонепроникних ґрунтах із слабокислою і нейтральною реакцією різного гранулометричного складу. Його можна вирощувати на осушених торф'яниках і заплавних землях [100, 164, 197].

Реакція ґрунту має бути близька до нейтральної (рН 5,2–7,0). На кислих і бідних на поживні речовини ґрунтах козлятник росте погано, на коренях не розвиваються бульбочки, травостій слабкий і часто гине за першої перезимівлі [12].

Коренева система його розташована головним чином в орному шарі. Тому на важких ґрунтах з високим рівнем ґрунтових вод козлятник росте погано [4, 192].

Щодо вологи, то козлятник – мезофітна рослина і займає проміжне положення між люцерною і конюшиною. За даними Н.А. Сергєєвої [178], для набухання насіння козлятнику потрібно 112–140% води від його сухої маси. Найсприйнятливіші до нестачі вологи рослини першого року життя, особливо в період сходів – початку стеблуння, коли формується коренева система. На формування першого укусу козлятнику весняна посуха впливає менше, ніж у інших бобових трав, оскільки він використовує осінні і зимові запаси вологи ґрунту та опади [209]. Розмір другого укусу залежить від літніх опадів [31]. Однак при нестачі вологи врожайність отави буває низькою, різко знижується активність азотфіксації, відбувається руйнування бульбочок. Слід пам'ятати, що козлятник не виносить надмірного зволоження, за тривалого затоплення – понад 30 діб, – відбувається повна загибель рослин, а за менш тривалого – випаді травостою [84, 96, 164, 217, 300]. Незважаючи на це, козлятник може добре витримувати 12–18-добове затоплення водою і тому є перспективним для вирощування на заплавних ґрунтах у районах, де за рік випадає 450–550 мм і навіть більше опадів [30, 209].

Вчені дійшли висновку, що вирощувати козлятник східний слід поза сівозміною, оскільки його можна культивувати на одному полі понад 10 років без зниження продуктивності [2, 31].

Важливою біологічною особливістю козлятнику є більший вміст листя в зеленій масі, ніж у конюшини і люцерни [19, 73, 96, 177]. Саме це дає змогу заготовляти із козлятнику східного сіно, сінаж та інші корми [2, 12].

До цінних ознак козлятнику східного можна віднести і те, що листя як найцінніша кормова частина рослини, при збиранні та подальшому сушінні не обсипається, а залишається зеленим. Високий вміст листя у зеленій масі сприяє підвищеному вмісту в ній каротину і аскорбінової кислоти [178, 186].

Як вважають деякі автори [24], з 1 га посівів козлятнику за два укуси можна отримати 700–800 ц зеленої маси, 174 – сіна, 28 ц – перетравного протеїну [48].

В умовах Калмикії козлятник східний з другого року вирощування перевершив люцерну синьогібридну кількістю сухої речовини – 7,81 т / га, протеїну – 1,6 т / га, порівняно з 6,2 т / га та 1,3 т / га відповідно [15, 171].

Наведені дані підтверджено дослідями, проведеними в Національному ботанічному саду НАН України, які свідчать, що за вмістом сухої речовини та протеїну на початку цвітіння козлятник східний перевершив люцерну посівну, а вміст каротину у них на одному рівні [2]. Деякі автори [12] вважають, що використання козлятнику в кормовиробництві знизить на 50 % витрату концентратів завдяки близько 40 % протеїну в його сухій речовині.

За даними Є.І. Молоканцевої [131], в біомасі козлятнику міститься поживних речовин: 20–23% протеїну, 2–3 жиру, 21–23 клітковини.

Козлятник використовують як сировину для заготівлі вітамінно-трав'яного борошна, силосу, гранул, брикетів та у вигляді біологічно активних домішок до традиційних кормів [170, 221]. Його подрібнену зелену масу поїдають усі види сільськогосподарських тварин з часу весняного відростання, в періоди стеблуння, бутонізації та до початку цвітіння.

Козлятник має хорошу перетравність поживних речовин, містить активні речовини, стимулює секрецію молока і підсилює процеси кровообігу [19, 96].

Козлятник східний має повний набір амінокислот, серед яких 44% – незамінні, містить достатню кількість макро- і мікроелементів [244]. Амінокислотний склад протеїну налічує 18 незамінних амінокислот [1, 2, 24, 221]. А біологічна цінність білка козлятнику східного навіть перевершує еталон ФАО для кормових культур за вмістом лізину, треоніну, валіну, метіоніну, цистеїну, лейцину, ізолейцину, фенілаланіну, але вміст триптофану є нижчим [2].

Козлятник східний практично не містить галегіну – специфічного алкалоїду, характерного для козлятнику лікарського, тому жодної негативної дії на тварин навіть при тривалому годуванні він не спричиняє. Не спричиняє тимпанії [164].

Останніми роками надземну масу козлятнику використовують в якості біопалива. Наприклад, Н.І. Кулешов [98] розробив спосіб отримання екологічно чистого біопалива з гранул козлятнику з теплоутворюючою здатністю близько 19 МДж / кг.

Проте найважливішою властивістю козлятнику є забезпечення себе азотом завдяки симбіотичній фіксації його з атмосфери, і, як наслідок – збагачення ґрунту біологічним азотом. Завдяки симбіозу з бульбочковими бактеріями він може накопичувати у ґрунті впродовж року близько 300 кг азоту на 1 га. Козлятник східний залишає після себе багато корневих рештків у ґрунті – 282,5 ц/га завдяки своїй розвиненій кореневій системі, тим самим збагачуючи його значною кількістю органічної речовини [30, 183]. Важливо, що козлятник здатний природним шляхом покращувати структуру, родючість ґрунту, його аерацію. Завдяки могутній кореневій системі він перешкоджає вітровій і водній ерозії, відіграючи важливу ґрунтозахисну роль [12, 170, 222], і збагачує ґрунт мінеральними солями, які з часом засвоюються коренями з підґрунтя [2].

Саме тому козлятник східний є добрим попередником для інших культур, особливо злакових. І.В. Артемов зі співав. [12] вважають, що після козлятнику урожай таких культур як ячмінь може становити 14 – 19 ц/га, яра пшениця – 10, картопля – до 85 ц/га.

Козлятник характеризується ентомофільним ксеногамним способом запилення [172]. Запилювачами його є медоносні бджоли і джміль малий земляний. Фертильність пилку висока – 91–93% [99, 172]. Козлятник є прекрасним раннім медоносом, за нектаропродуктивності (близько 140 кг нектару з 1 га) не поступається еспарцету [96]. Продуктивність меду може сягати 135 кг/га. Закладання насінневих травостоїв поблизу пасік підвищує насіннєву продуктивність культури в 2–3 рази (з 450 до 920–1400 кг/га насіння) [2, 12, 55, 102, 170].

Зважаючи на все зазначене козлятник східний має величезний потенціал, який однозначно потребує подальшого вивчення і дослідження.

Малопоширеність цієї культури на полях України змушує замислитись над питанням: як сприяти розповсюдженню козлятнику східного в агросфері України?

1.2. Формування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник

Особливе значення козлятнику як представника бобових полягає у здатності за допомогою симбіозу з бульбочковими бактеріями засвоювати азот повітря. Адже бобово-ризобіальний симбіоз – це результат спільної роботи геномів макро- та мікросимбіонтів [46].

Сам процес формування симбіотичної взаємодії відбувається поетапно під генетичним контролем обома партнерами [47].

Спочатку бульбочкові бактерії потрапляють у корінь рослини на стадії проростків у концентрації, що забезпечить зараження козлятнику – близько 10^5 – 10^6 кл/г ґрунту) [89].

Генні продукти рослини-живителя і бульбочкових бактерій сприяють упізнаванню один одного. Адаже коріння рослини виділяє суміш флавоноїдів – речовин, які активізують в клітинах відповідних ризобіальних штамів гени нодуляції. Саме у цих генах закодовані білки, відповідальні за специфічність сприйняття рослини-живителя і подальші етапи формування симбіозу. Бактерії з активованими *nod*-генами виділяють *nod*-фактор – ліпополісахариди, що спричиняють поділ клітин кори кореня ще до його інфікування бактеріями. Спочатку кореневої волосок викривлюється і утворює кишню для бактерій, потім рецептори рослини – спеціальні молекули, що забезпечують багатоступеневе розпізнавання і послідовність перетворень, розпізнають поверхневі білки бактерії. Інший рецептор діє при проникненні бактерії в клітину живителя. Тільки тоді виникає інфекційна нитка [88–91], у трубчастій порожнині якої бактерії інтенсивно розмножуються і переміщуються по корі кореня. Вони сприяють поділу і поліплоїдизації рослинних клітин, тому на деяких ділянках кори кореня з’являються нарости – бульбочки. У бульбочках формується система судин, що сприяє обміну фіксованого азоту на поживні речовини рослин, необхідні бактеріям. Лише невелика частина інфекційних ниток ініціює утворення бульбочки, тому для успішного штучного зараження насіння потрібен надлишок бульбочкових бактерій: для дрібного насіння він становить $5 \times 10^2 - 1 \times 10^3$, для більшого – 7×10^4 клітин. Бактерії з інфекційної нитки виходять у цитоплазму рослинної клітини, де інтенсивно розмножуються. Водночас їх оточує перибактероїдна мембрана рослини-живителя. Через 3–4 тижні після інокуляції бульбочкові бактерії перетворюються на особливі симбіотичні форми – бактероїди. Обсяг бактероїдів у 3–10 разів перевищує обсяг бактерій і вони мають різноманітну форму. Саме бактероїди містять усі ферменти, необхідні для фіксації атмосферного азоту, включаючи і нітрогеназу. Інфекційна вакуоля з бактероїдами всередині – це своєрідна органела, яку називають симбіосомою. Наприкінці періоду росту козлятнику бактероїди

відмирають, а продукти розкладання їх клітин ним і поглинаються [88 – 91, 93].

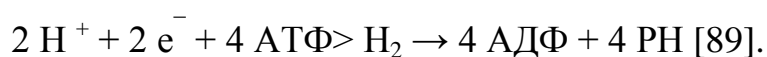
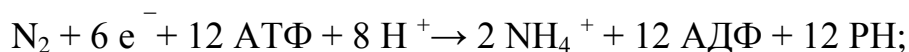
Цікаво, що у перибактероїдному просторі локалізовано унікальний білок леггемоглобін – продукт синтезу макро- і мікросимбіонта, що надає бульбам рожевого кольору. Саме цей білок захищає ферментний комплекс нітрогенази, який відіграє найважливішу роль у процесі азотфіксації, від інактивууючої дії надлишку кисню і водночас забезпечує бактероїди киснем. Взагалі, нітрогеназа є складним ферментативним комплексом, що каталізує АТФ-залежну реакцію відновлення N_2 до NH_4^+ [89]. Висока ефективність функціонування нітрогенази можлива тільки в анаеробних умовах при тісному обміні метаболітами між макро- і мікросімбіонтом. Нітрогеназний комплекс бактероїдів складається з двох залізо- і сірковмісних білків: Fe-білка з молекулярною масою 32–72 кД і більш складного MoFe-білка з молекулярною масою 180–235 кД залежно від мікроорганізму. Fe-білок функціонує як переносник електронів, які він отримує від флаводоксину. Відновлений Fe-білок зв'язується з Mg і АТФ, а потім передає електрон на MoFe-білок за рахунок енергії, що вивільняється при гідролізі АТФ до АДФ і неорганічного фосфату [88 – 91, 93].

Відновлення N_2 до NH_4^+ відбувається в активному центрі MoFe-білка в кілька етапів і пов'язане зі зміною валентності молібдену [89].

Основною відмінністю нітрогенази від інших ферментів є повільна її робота – для перетворення всього однієї молекули N_2 на іон амонію необхідно 1,5 с, тоді як більшість ферментів здійснює кожну секунду тисячі або сотні тисяч циклів. Причиною цього є велика інертність азоту [87 – 89].

Перш ніж азот приєднається до MoFe-білка, там повинен з'явитися H_2 , тому за допомогою нітрогенази утворюється не тільки NH_4^+ , а й H_2 [89].

А робота ферментного комплексу нітрогенази вимагає витрати великої кількості АТФ і має вигляд:



Таким чином, процес азотфіксації потребує затрат великої кількості енергії, але завдяки симбіозу мікросимбіонти для відновлення молекули азоту атмосфери отримують можливість використовувати енергію світла, перетворену фотосинтетичним апаратом рослини-живителя. А продукти азотфіксації, транспортуючись у надземну частину рослини, позитивно впливають на процес фотосинтезу, на розподіл азотовмісних речовин між органами рослини і, як наслідок, можуть знижувати або підвищувати продуктивність бобових рослин. Коефіцієнт використання енергетичних субстратів на азотфіксацію у бульбочкових бактерій становить 10–12%, що в 10–12 разів більше ніж у вільноживучих азотфіксаторів. Тому зниження вартості сільськогосподарської продукції завдяки азотфіксації означає, що рослині це обійшлося доволі дорого [87 – 91, 93].

Такою культурою є козлятник східний (*Galega orientalis* Lam.) [108, 113, 241, 252]. Однак його продуктивність повністю залежить від симбіозу зі специфічними бульбочковими бактеріями *Rhizobium galegae*. Тому необхідною умовою створення високоефективної мікробно-рослинної системи *R. galegae* – *Galega orientalis* Lam. є передпосівна інокуляція насіння козлятнику східного конкурентоспроможними ефективними штамми бульбочкових бактерій, що забезпечить додаткові переваги в харчуванні і розвитку рослини-живителя за його оброблення в різних ґрунтово-кліматичних умовах [83, 201]. Але бульбочкові бактерії *R. galegae* відрізняються від інших *Rhizobium* і *Bradyrhizobium* своєю унікальністю, яку виявлено за допомогою досліджень ДНК [238, 239, 261, 264, 275, 285, 303]. Взагалі, виявлено значний внесок вуглеводзв'язуючої послідовності лектину на формування специфічності зв'язку з ризобіальними *nod*-факторами [39]. Вивчення гена лектину рослин з групи перехресної інокуляції дало можливість виявити нуклеотидну послідовність, необхідну для формування активності цього білка [206].

Отже, *Rhizobium galegae* *bv. orientalis* є відокремленою групою мікроорганізмів усередині родини Rhizobiaceae. За даними порівняльного

аналізу 16S р-РНК та інших консервативних генів виявилось, що найближчим родичем цього виду є *Agrobacterium vitis* [285].

Відомо, що генетичні ознаки симбіозу є основним фактором розбіжності між різновидами (*biovars*) [265]. Серед штамів *R. galegae*, виділених з бульбочок різних видів рослин-живителів, встановлені різновиди в генах *nod D1*.

Максимальна різноманітність ризобій виявляється в центрах походження рослин-живителів. У районі Кавказу різноманітніші *R. galegae orientalis* bv. ніж *R. galegae officinalis* bv, що свідчить про еволюційний вплив на симбіотичні гени двох тісно пов'язаних різновидів *Rhizobium* [223].

У ґрунтах деяких регіонів України, Польщі, Литви, Росії не знайдено місцеві штами *R. galegae*, здатні інфікувати козлятник східний спочатку і пристосуватися до цього в результаті різних генетичних перебудов [108, 253].

Інокуляція насіння козлятнику східного виявилась ефективною в умовах ґрунтів Башкортостану колекційними штамми *R. galegae* Колекції культур бульбочкових бактерій Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології Російської академії наук (ВНДІСГМ РАН), С.-Петербург–Пушкін), де спочатку цей вид ризобій був відсутній взагалі [176].

В умовах ґрунтів, вільних від гомологічних ризобій типу *R. galegae*, всі бульбочки, що сформувалися, утворюються в результаті інфікування рослини інтродукованим штамом [240], тоді як при інокуляції насіння бобових штамми *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* або *R. leguminosarum* bv. *viceae* присутня конкуренція, так як вони – типові мешканці ґрунтів наших широт. Тобто виживання і ефективність застосування *R. galegae* повністю залежить від адаптації їх до ґрунтово-кліматичних умов району вирощування і сумісності з рослиною–живителем [262].

Тому особливості формування симбіозу між бульбочковими бактеріями *R. galegae* і козлятником східним у ґрунтово-кліматичних умовах, що відрізняються від умов центрів походження рослин-живителів, вимагають

широкого діапазону використовуваних методів і підходів до відбору макро- і мікросимбіонтів для створення високоефективних симбіотичних систем.

1.3. Роль генотипів макро- і мікросимбіонтів за утворення симбіотичних систем

Надзвичайне значення бобових культур як для сільського господарства, так і для покращення екологічного стану нашої планети в цілому, тісно пов'язане з життєдіяльністю бульбочкових бактерій, з якими ці рослини перебувають у симбіозі. Адже продуктивність бобових культур, їх урожайність, накопичення біологічного азоту і рослинного білка залежать від характеру взаємодії цих двох організмів у кожному конкретному випадку [9, 200, 204]. Ефективність бобово-ризобіального симбіозу визначається генотипами обох симбіонтів – бульбочкових бактерій і бобових рослин-живителів [89, 163]. Вплив цих генотипів на показники активності симбіозу істотно залежить від комплементарності сортів рослин і штамів бактерій. Існує певне «неконтрольоване» варіювання показників симбіотичної активності, яке часто впливає на них сильніше, ніж генотип рослин або бактерій. Деякі автори вважають [163], що джерелом цього варіювання слугує внутрішньовидова мінливість бобових культур за ознаками симбіозу. Інтенсивність симбіотичної азотфіксації залежить також від видових і сортових особливостей рослини-живителя, а особливо від активності штаму бульбочкових бактерій, що підтверджено дослідженнями науковців [62, 111, 126, 162, 230]. Встановлено, що штами з вузькою сортовою специфічністю є ефективнішими в симбіозі з відповідним сортом рослини-живителя, ніж штами з менш вираженою специфічністю щодо живителя [36, 196, 214].

Вченими доведено, що саме в рослині-живителі локалізовано генетичні чинники, які визначають розвиток і ефективність симбіозу [90, 94, 200, 213, 215]. А процес інфікування і результат азотфіксації, контролюється не одним, а групою генів [249, 269].

Рослина-живитель генетично контролює добір специфічного для себе штаму бульбочкових бактерій, і здатна змінити його конкурентоспроможність, а специфічність взаємодії між ними передбачає існування комплементарності генів у цих симбіонтів. Також гени рослини-живителя сприяють виникненню бульбочок, їх кількості і загальному обсягу бактероїдної тканини на одну рослину [87]. Адаже рослиною зумовлено кінцеву ефективність симбіотичної азотфіксації. Наприклад, у конюшини виявлено два гени, які сприяють утворенню неефективного симбіозу незалежно від властивостей використання штаму бульбочкових бактерій [89]. Потім бобова рослина, як і бактерії, бере участь у синтезі леггемоглобіну бульбочок і, нарешті, синтез нітрогенази в бактероїдах генетично детермінований у бактеріях [89], тому рослина несе генетичну інформацію, що сприяє синтезу цього ферменту [125, 213].

Слід наголосити, що для ефективного функціонування симбіотичного апарату важливим є генотип власне мікросимбіонту. Встановлено, наприклад, що у бактерій роду *Sinorhizobium* є кілька груп генів, які зумовлюють процес азотфіксації. Це *nod*-гени, що кодують процес утворення бульбочок, *nif*-гени, від яких залежить фіксація молекулярного азоту, і *fix*-гени, необхідні для симбіотичної азотфіксації [138, 256].

Важливою ознакою є специфічність мікросимбіонту, тобто здатність бульбочкових бактерій утворювати симбіоз з певними бобовими рослинами або їх групами [87].

У жодному разі не можна залишати поза увагою ґрунтову мікрофлору, яка може перешкоджати утворенню ефективного симбіозу. У зв'язку з цим штами мікросимбіонтів повинні мати високу конкурентоспроможність, тобто здатність утворювати на коренях рослин велику кількість бульбочок, ігноруючи вплив інших штамів одного і того самого виду, а також мікроорганізмів іншого роду та витіснити місцеві штами. Це відбувається завдяки вірулентності – властивості бульбочкових бактерій проникати в

тканину кореня бобової рослини і спричинювати утворення бульбочок [123, 218].

Важливою умовою є резистентність штамів до несприятливих екологічних умов. Ці властивості водночас зі здатністю бактерій підвищувати урожайність і покращувати його якість характеризують ефективність штамів. Ця ознака не є стійкою і може змінюватися під впливом багатьох чинників. Зниження або втрата ефективності може відбуватися у разі втрати клітинами плазмід, відповідальних за активність бульбочкових бактерій, та у разі їх блокування [89, 138].

Звичайно, зрозумілим є залежність процесу азотфіксації від синтезу нітрогенази, який відбувається в результаті діяльності *nif*-генів [162].

Враховуючи зазначене, можна із впевненістю сказати, що функціонування симбіотичної бобово-ризобіальної системи залежить водночас від генів як мікро- так і макросимбіонтів. А для підвищення результативності симбіотичної взаємодії рослини з бульбочковими бактеріями слід досконало і на всіх рівнях вивчити механізми їхньої взаємодії.

1.4. Селекція високоефективних штамів бульбочкових бактерій

Щоб отримати високу врожайність козлятнику східного, не застосовуючи хімічних добрив, необхідно забезпечити ефективне функціонування симбіотичної системи бульбочкові бактерії – бобова рослина. А це нереально без скрупульозного добору симбіотичних партнерів, який потребує постійного оновлення сортів бобових рослин і штамів бульбочкових бактерій. Донедавна всі штами отримували за допомогою методів аналітичної селекції, але їхня ефективність порівняно з вихідними була не більша ніж на 15–25% [23, 104, 126]. Зовсім нові можливості для отримання високоефективних штамів бульбочкових бактерій відкрито дослідженнями з використанням селекційно-генетичних методів і методів

генної інженерії [16, 18, 63, 251, 261]. Вони дали змогу не тільки дослідити будову і функції генів симбіозу, а й розробити основу для створення експериментальної селекції бульбочкових бактерій, яка об'єднує в собі генетико-селекційні та традиційні методи. Тому не дивно, що нині велику увагу приділяють створенню генетико-селекційними методами нових ризобіальних штамів [91, 268].

Визначено три основні види перенесення генів між бактеріями: трансформація, трансдукція і кон'югація. Деякі штами бульбочкових бактерій компетентні до трансформації – стабільного включення в бактеріальну клітину поглиненої ДНК, кількість якої зазвичай не перевищує 5% генома штаму-донора [260, 284]. Саме таким методом було здійснено перше перенесення спадкових факторів, які контролюють симбіотичні ознаки [89].

Проведення генетичної трансформації не можливе без отримання у штамі-реципієнті клітин, здатних поглинати ДНК штаму-донора [270].

Також передачу ДНК у бульбочкові бактерії можна здійснити методом електропорації, широко використовується для введення плазмід в агробактерії і для перенесення хромосомних маркерів між різними штамми [224, 284].

Дієвішим методом порівняно з трансформацією виявилась трансдукція – перенесення генетичного матеріалу за допомогою бактеріофагів. Бульбочковим бактеріям властива специфічна трансдукція, коли фаг переносить чітко визначений фрагмент бактеріальної хромосоми, і неспецифічна, коли відбувається передача довільної ділянки геному штаму-донора [91, 270]. Це дало можливість використовувати цей метод для детального внутрішньогенного картування мутацій, а також для функціонального тесту на алелізм [284, 298].

Найефективнішим методом нині є кон'югація, що забезпечує перенесення доволі великих фрагментів бактеріального генома і може

застосовуватися для виявлення розташування на плазмідах або хромосомі далеко розміщених один від іншого генів [91, 270].

Також для отримання мутантів бульбочкових бактерій використовували фізичний і хімічний мутагенез. Саме за допомогою хімічного мутагенезу науковцями [89 – 91] виділено ауксотрофні мутанти у *Rhizobium japonicum* та *Rhizobium phaseoli*. Але нітрозогуанідін у процесі мутагенезу призводить до множинних пошкоджень генома у бактерій, що ускладнює генетичний аналіз отриманих мутантів. А проведення ультрафіолетового мутагенезу ускладнено наявністю потужних систем фотореактивації, які за дії на клітини видимого світла повністю знімають мутагенний ефект [182].

Недоліки перелічених методів вимагали пошуку і створення нових, дієвіших методичних підходів для аналізу молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних процесів, що відбуваються в симбіотичних азотфіксуючих системах. Розв'язання проблеми отримання стабільних нереверсивних мутацій, які можна легко визначити в генетичних експериментах стало можливим завдяки застосуванню методу транспозонового мутагенезу [91, 248].

Транспозоновий мутагенез дає змогу отримувати штами бульбочкових бактерій із зміненими властивостями, що сприяє вирішенню низки наукових завдань, пов'язаних із дослідженнями процесу симбіотичної азотфіксації. Цим методом вже успішно скористалися науковці досліджуючи електрофоретичні профілі полісахаридів бульбочкових бактерій [242, 287]. Ними отримано мутанти швидкозростаючих бульбочкових бактерій сої *Rhizobium fredii* зі зменшеним синтезом загальної кількості екзополісахаридів і погіршеними симбіотичними властивостями порівняно з батьківським штамом [91], вивчено роль структурних компонентів бактеріальної клітини при формуванні симбіотичних азотфіксуючих систем [277], показано важливість β -ланцюгів ліпополісахаридів бульбочкових бактерій за інфікування коренів бобових [259], досліджено транспозонові інсерції в

генетичний апарат ризобій, що дають змогу розширити спектр рослин-живителів [226].

Але наукові дані свідчать [138], що використання відібраних після мутагенезу ризобій з підвищеною азотфіксуючою активністю не завжди сприяє збільшенню врожайності, накопиченню рослинної маси і вмісту білка. Враховуючи, що за селекціонування бульбочкових бактерій дослідники водночас працюють з великою кількістю різних штамів [10, 35], важливим є підбір методів, які б дали змогу в найкоротші терміни визначити доцільність їхнього використання. Найефективніші штами бульбочкових бактерій можна виділити з добре окультурених ґрунтів, зокрема чорноземів [89]. Доведено, що штами ризобій, виділені з нейтральних ґрунтів ефективніші, ніж ізольовані з кислих [89–91]. Певним критерієм для первинного добору ефективних штамів може слугувати показник дегідрогеназної активності культур [19, 16, 22, 46]. Деякі автори [26] вказують на можливість добору штамів бульбочкових бактерій у чистій культурі і на різних етапах формування симбіозу. Інші [159] показали, що в польових умовах, аналізуючи зростання пагонів інокульованої люцерни і співвідношення між масою пагонів і масою коренів, можна відібрати перспективні для селекції штами бульбочкових бактерій на 30-й – 50-й день після появи сходів. Під час первинного добору штамів критеріями може слугувати підвищений вміст у бульбах леггемоглобіну та інших поліпептидів [92, 259, 271]. А.Ф. Антипчук зі співав. [9] пропонують використовувати вміст хлорофілів у рослинах як один із критеріїв при доборі і селекції ефективних штамів бульбочкових бактерій.

Зрозуміло, що отримати високу врожайність за допомогою формування бобово-ризобіальної системи неможливо без спрямованої селекції сортів бобових рослин і комплементарних штамів бульбочкових бактерій з урахуванням конкретних ґрунтово-кліматичних і агротехнічних умов.

1.5. Біологічна фіксація азоту: види азотфіксаторів та їх розповсюдження у природі. Вплив екологічних факторів на розвиток і продуктивність бобово-ризобіального симбіозу

Підвищення родючості ґрунту – одне з найважливіших завдань сучасної науки, у вирішенні якого провідна роль належить біологічним факторам, у тому числі, фіксації атмосферного азоту симбіотичними і несимбіотичними мікроорганізмами [123, 207].

Фіксація молекулярного азоту є одним з основних процесів, які визначають біологічну продуктивність нашої планети, тому її вивчення має глобальне значення для населення. Основні запаси азоту (75–80%) зосереджено в атмосфері у молекулярному вигляді і недоступні рослинам. Масштабність цього процесу можна порівняти з фотосинтезом [89].

Азот входить до складу протеїнів, інших молекул, що є основою всього живого. Людині і тваринам він необхідний у вигляді протеїнів тваринного і рослинного походження, рослинам – солей азотної кислоти та іонів амонію [71, 95, 185].

Незважаючи на те, що над кожним квадратним метром земної поверхні в повітрі міститься 7–8 т азоту [222], потреби рослин, які ростуть на цій площі, у цьому елементі (10–20 г/рік) не задовольняються – вони часто відчують азотне голодування.

Тому життя на Землі значною мірою залежить від життєдіяльності азотфіксуючих мікроорганізмів, оскільки за рахунок симбіотичної і несимбіотичної фіксації у колообіг залучається найбільша частина природного азоту [18, 208, 247, 274].

Аналіз наукових публікацій свідчить, що інтерес до біологічної азотфіксації вже активно виявляється впродовж останніх десятиліть і продовжує зростати [5, 18, 29, 82, 246, 274]. Це пов'язано не тільки з визначальною роллю цього процесу в азотному балансі біосфери, а й з можливістю скорочення обсягів застосування промислового азоту в

технологіях вирощування польових культур за біологізації землеробства, із прагненням знизити енергетичні витрати на виробництво продукції рослинництва.

Організми, які фіксують атмосферний азот поділяються на дві групи: ті, що вступають у симбіоз з вищими рослинами і несимбіотичні [140, 284]. Серед несимбіотичних азотфіксаторів розрізняють вільноживучі, не пов'язані з кореневою системою рослини, та асоціативні, які живуть у ґрунті безпосередньо біля коренів, на поверхні коренів, листя і всередині рослин. У такому разі саме кореневі виділення рослин, які можуть сягати 50% сумарної продукції фотосинтезу, приваблюють азотфіксаторів. Їх можна зустріти у всіх ґрунтах, при цьому тільки симбіотичні азотфіксатори здатні асимілювати молекулярний азот завдяки взаємодії з рослинами [89]. Азот, який асимільований несимбіотичними азотфіксаторами, стає доступним рослинам тільки після відмирання і мінералізації мікробних клітин. Важливо, що несимбіотичні азотфіксатори можуть накопичувати 25–95 кг/га N_2 на рік. Яскравими представниками несимбіотичних азотфіксаторів, що роблять найбільший внесок у збагачення ґрунту азотом, є аероби *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Azospirillum* і анаероби – представники роду *Clostridium* [41, 129, 146, 148].

Продуктивність сільськогосподарських рослин у деяких країнах підвищують за допомогою препаратів із культур несимбіотичних азотфіксаторів, таких як азотобактерин, бактеріальне добриво на основі культури *Azotobacter chroococcum*, що позитивно діє на рослини у всіх аспектах: збільшує кількість доступного азоту і зменшує захворюваність рослин завдяки вмісту в ньому речовин, стимулюючих розвиток кореневої системи [40, 151].

Слід зазначити, що потенційні можливості симбіотичних азотфіксаторів значно вищі, ніж несимбіотичних. Симбіотичні азотфіксатори поширені в усіх ґрунтово-кліматичних зонах. До них належать ціанобактерії, які живуть у симбіозі із різними рослинними організмами; актиноміцети –

симбіонти різних деревних порід; бульбочкові бактерії – симбіонти бобових рослин [89].

Синьо-зелені водорості (ціанобактерії) є водночас фотосинтетиками і азотфіксаторами, здатні жити в різних, навіть у дуже несприятливих умовах, фіксувати азот як самостійно, так і в симбіозі з іншими організмами: грибами, саговниками, водними папоротями. Найактивнішими азотфіксаторами є представники родів *Anabaena* і *Nostoc*. У симбіозі з грибами ціанобактерії утворюють лишайники, які здатні фіксувати азот навіть при температурному діапазоні від 0°C і нижче. Наприклад, ціанобактерія *Anabaena azollae* вступаючи у симбіоз із водною папороттю *Azolla* може забезпечити рисове поле 100 кг/га накопиченого азоту [87, 93].

Уже давно було встановлено здатність низки дводольних покритонасінних дерев і чагарників утворювати бульби і фіксувати молекулярний азот. Найвідомішими є такі актиноризні рослини: вільха, обліпіха, олива, казуарина, що здатні фіксувати від 27 до 300 кг/га за рік залежно від віку. Використання актиноризних рослин має величезне значення для лісового господарства, для освоєння засолених ґрунтів та ін. [87 – 89].

Проте головна роль у збагаченні ґрунтів зв'язаним азотом належить саме симбіозу бульбочкових бактерій з бобовими рослинами, адже розміри симбіотичної азотфіксації можуть сягати 130–390 кг/га фіксованого азоту для зернобобових культур і 270–550 кг/га азоту – для багаторічних бобових трав [87, 94, 122].

Бульбочкові бактерії – це аеробні грамнегативні рухомі гетеротрофні палички, які не утворюють спор. Вони можуть перебувати у ґрунті як сапрофіти поза рослиною-живителем, проте, не відомо чи впливають вони за таких обставин на азотний баланс ґрунту. Бульбочкові бактерії тільки після формування симбіозу з бобовими рослинами і утворення на їхніх коренях бульбочок починають фіксувати атмосферний азот [89–91].

За систематикою бульбочкові бактерії поділяють на шість родів, які різняться між собою культурально-біохімічними ознаками і генетичною

організацією: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mezorhizobium* і *Allorhizobium*. Під *Rhizobium* поділяють на три види і кілька підгруп – біоварів. Деякі види ризобій високоспецифічні та інфікують лише один рід рослини-живителя, але більшість з них здатні спричиняти утворення бульбочок у кількох рослин-живителів. Наприклад, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* – це бульбочкові бактерії, що інфікують вику, горох, кормові боби, сочевицю і чину [129, 263].

Ефективність симбіотичної системи рослина – мікроорганізм визначається вірулентністю та активністю мікросимбіонту. Дійсно вірулентним штамам властива нодуляційна активність, основана на здатності формувати повноцінні бульбочки [123]. Бульбочка – це складно організований орган рослини, що в основному складається з інфікованої бактеріями тканини, в якій відбувається фіксація молекулярного азоту, провідної тканини, меристеми, завдяки якій відбувається зростання бульбочки [46, 284].

На певних етапах становлення бобово-ризобіального симбіозу проявляються інші важливі властивості бактерій, такі як азотфіксуюча активність – швидкість відновлення N_2 в NH_3 ; симбіотична ефективність – здатність рослин інтенсивно розвиватися, використовуючи симбіотрофне харчування азотом [46, 148]; специфічність – здатність бактерій вибірково вступати у взаємодію з певним видом або групою рослин. Ризобії, наприклад, поділяють на активні, малоактивні і неактивні. Слід зазначити, що вірулентність і активність бактерій можуть залежати від особливостей штаму, виду і сортової специфічності рослин, ґрунтово-кліматичних умов і низки інших факторів [123, 284]. Важливе значення має також конкурентоспроможність. Більш вірулентні штами активніше за інших інокулюють кореневу систему специфічних для них рослин. Різні автори мають не однакові погляди у визначенні поняття конкурентоспроможності бактерій. Одні вважають, що це здатність конкурувати зі спонтанно

інокулюючими рослинні штамми, інші – протистояти місцевій сапрофітній мікрофлорі і витіснити місцеві штамми [29, 181].

Також відомо, що кінцевий результат роботи азотфіксаторів у польових умовах залежить не тільки від перерахованих чинників, а й від властивостей ґрунту, водного і температурного режимів, а також рівня агротехніки. Зміна характеристик будь-якого з цих факторів спричинює гальмування або стимулювання біологічної фіксації азоту в агроценозах [89, 90].

Особливу увагу слід звернути на те, що симбіотичні і асоціативні системи рослин і діазотрофів – це природні еволюційно сформовані специфічні взаємодії живих організмів, вивчення яких нині є особливо актуальним для забезпечення екологізації землеробства. Адже зв'язування і засвоєння азоту мікроорганізмами і є фіксацією молекулярного азоту повітря біологічним шляхом, що має грандіозне значення для екосистеми планети, оскільки виробництво хімічних азотних добрив вимагає значних витрат енергоресурсів і призводить до забруднення навколишнього середовища. Вивчення цієї проблеми спонукає до розроблення нових ефективних біологічних препаратів, які дадуть можливість не тільки підвищити якість і врожайність культур, а й значно зменшити антропогенне навантаження на екосистему. Використання біопрепаратів дає також можливість регулювати чисельність і активність корисної мікрофлори в ризосфері, забезпечувати рослини азотом, фіксованим з атмосфери. Як приклад, для вирішення проблеми дефіциту протеїну варто застосовувати вирощування козлятнику східного, проте в ґрунтах, на яких ця культура вирощується вперше, зазвичай відсутні або знаходяться в невеликій кількості специфічні для неї бульбочкові бактерії (до 20 од/г ґрунту) [149].

Здавна відомим є значний вплив на процес симбіотичної азотфіксації умов навколишнього середовища. Тому, вивчення дії абіотичних, біотичних і антропогенних факторів на ефективність симбіозу бобово-ризобіальних систем дає змогу розробити способи оптимізації його формування і функціонування.

На формування симбіотичних систем бобово-бульбочкових бактерій і ріст рослин неоднозначно впливають засоби захисту рослин від бур'янів і шкідників [81, 132, 288]. Наприклад, на ділянках із застосуванням гербіцидів дуала і тілама припинялося утворення бульбочок на коренях люцерни та знижувалася їхня маса [89].

Однак, результати досліджень, проведених в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України показали, що бульбочкові бактерії мають різну сприйнятливість до деяких гербіцидів, а за комплексного застосування їхня ефективність збільшується [92].

Отже, щоб запобігти порушенню симбіотичної азотфіксації необхідно особливо ретельно підбирати гербіциди, нетоксичні щодо бобово-ризобіального симбіозу.

Важливим фактором для активного симбіозу є рН ґрунту, впливу якого на життєдіяльність і активність бульбочкових бактерій було присвячено достатньо праць [89, 90, 228, 302, 304]. Адже підвищена кислотність ґрунту – основний фактор, що обмежує симбіоз. Амплітуда рН для різних видів і штамів бульбочкових бактерій дещо різниться, проте відмінний симбіотичний апарат у більшості бобових культур розвивається на слабокислих і нейтральних ґрунтах (рН 6,5–7) [123]. За цих умов формується багато червоних бульбочок із високим вмістом леггемоглобіну. Вже за величини рН 3,5 гинуть бактерії всіх штамів *Rhizobium*, за рН 4,5–8 зростання їх затримується [32, 104]. Є дані про зростання і розвиток бульбочкових бактерій на кислих ґрунтах після внесення кальцію або вапна, наприклад, на коренях люцерни при рН 5,5 спостерігалось слабе бульбочкоутворення тільки у 12% рослин, проте після внесення вапна чисельність бульбочкових бактерій та їхня ефективність значно підвищилися [127, 294]. Але позитивний ефект внесення CaCO_3 пов'язаний, насамперед, на 80% з нейтралізацією ґрунту, і тільки на 20% – із впливом кальцію на бульбочкоутворення. Для козлятнику оптимальною реакцією ґрунту є показник рН 6,8–7,1 за якого культура здатна засвоювати максимальну кількість азоту повітря і забезпечувати найбільшу продуктивність [144, 166].

Особливим і найважливішим чинником, що визначає величину і активність симбіотичного апарату, є вологість ґрунту. Негативний вплив водного дефіциту на розвиток бульбочкових бактерій та ефективне функціонування бобово-ризобіального симбіозу спостерігали багато вчених [6, 50, 85, 210].

Мінімальна вологість ґрунту для можливого розвитку ризобій становить близько 16% його повної вологоємності (ПВ), оптимальна – 40–50 або 70–90% ПВ [123]. Показано, що бульбочки утворюються за вологості 40–80% ПВ, оптимальною слід вважати 60–70% ПВ [89, 90].

Саме виживаність і активність ризобій залежать від їх природного середовища існування, типу ґрунту та його вологості [279, 280, 283]. Наслідком водного стресу у ризобій є зміни в їхній будові і морфології [234, 291]. За недостатньої вологості ґрунту погіршуються також процеси інфікування і бульбочкоутворення бобових [89, 250]. Наприклад, зниження водозабезпечення змінювало кількість інфекційних ниток, сформованих у корневих волосках, і пригнічувало нодуляцію конюшини та кормових бобів [305]. Проте надмірне зволоження ґрунту, як і дефіцит ґрунтової вологи, негативно впливає на ефективність бобово-ризобіального симбіозу [89, 329]. Для бульбочкоутворення і активної азотфіксації найважливіша оптимальна вологість ґрунту навесні і в першій половині літа [34, 302, 278].

Бульбочкові бактерії є аеробами, тому ступінь аерації ґрунту грає особливо важливу роль [123]. Зниження доступу кисню в кореневу систему спричиняє зменшення вмісту леггемоглобіну в бульбочках і зниження кількості азотовмісних сполук серед продуктів екзоосмосу. Ступінь аерації відбивається також на розподілі бульбочок у різних горизонтах ґрунту, відповідно, чим глибше шар, тим менше кількість бульбочок. Є дані, що брак кисню змінює антигенні властивості бульбочкових бактерій [299]. За слабкої аерації навіть ефективні раси *Rhizobium* розмножуються слабо та утворюють дрібні бульбочки [89].

Значну роль для розвитку бобово-ризобіального симбіозу відіграє температурний фактор [22]. Оптимальною температурою в зоні помірного

клімату вважають 24–26°C, у тому ж температурному діапазоні в бульбочках більшості бобових найкраще утворюється леггемоглобін [89 – 91]. Але енергія процесу засвоєння азоту різко знижується за різких температурних коливань, що призводить до зменшення на 50% активності нітрогенази [267].

Козлятник східний резистентний до мінусових температур, але найкраще процес азотфіксації у нього проходить за температури ґрунту 20–24°C. Взагалі, температурний оптимум розвитку бобових рослин не є постійним, він може зміщуватися залежно від форми наявного азоту. На молекулярному азоті рослини краще ростуть за нижчої температури, а за температури 30°C і більше, бульбочки утворюються, але азотфіксація не відбувається [1, 12, 89].

Говорячи про вплив ґрунтових чинників на розвиток бобово-ризобіального симбіозу, неможна не відзначити величезне значення ґрунтової структури. У структурі ґрунту завжди багато некапілярних проміжків. Волога дощів легко всмоктується порами ґрунту і розсмоктується по капілярах. У такому ґрунті завжди сприятливе співвідношення води і повітря. Також у структурованому ґрунті легше поширюється коренева система рослин [43].

Засолення ґрунтів теж спричиняє неабиякий вплив на формування і функціонування симбіотичних систем – різко знижується ріст рослин, утворення бульб і азотфіксуюча активність, зменшуються вміст води і водний потенціал [89, 289, 290].

Значний вплив на утворення бульбочок та їхню біохімічну активність спричинює застосування добрив. Азот, особливо в нітратній формі, чинить негативний вплив на утворення бульбочок і азотфіксацію, за винятком резистентних до нітратів супербульбочкових форм [49, 180].

Проте, деякі автори вважають за необхідне застосування великих норм азоту для отримання високих врожаїв незважаючи на його негативний вплив на симбіотичну азотфіксацію [192, 205], і, на жаль до їхніх праць усе ще дослухаються. Інші ж автори пропонують внесення невеликих доз мінерального азоту (20–30 кг/га), необхідного на перших етапах розвитку

бобових рослин [22, 23]. А деякі автори взагалі пропонують уникати внесення мінерального азоту [7, 125, 159].

Якими б не були суперечливі твердження авторів щодо застосування азотних добрив під бобові, питання впливу мінерального азоту на розвиток симбіотичних відносин з бульбочковими бактеріями вирішено: внесення мінерального азоту знижує рівень використання молекулярного азоту пропорційно застосованій дозі [7, 145, 148], спричиняє пізніше утворення бульбочок на рослині із меншою їх кількістю [89, 90]. У низці експериментів спостерігали зменшення кількості, погіршення якості білка [90].

Внесення фосфорних добрив сприяє збільшенню азотфіксуючої здатності бобових культур [243, 272]. За оптимальної дози фосфорних добрив значно зростає нітрогеназна активність бульбочкових бактерій. Якщо вміст фосфору в ґрунті низький, то бактерії в корінь рослини проникають, але бульбочки при цьому не утворюються. Фосфор підсилює позитивний вплив молібдену на процес засвоєння азоту. А внесення молібдену без забезпечення фосфорного живлення рослин може навіть знизити число бульбочок [254, 272].

Окрім фосфорних добрив важливу роль відіграють калійні, особливо фосфорно-калійні добрива. За їх використання тривалість накопичення азоту бобовими рослинами істотно зростає [6, 106, 142].

Специфічним для симбіотичної системи є кальцій, який не може бути замінений іншими елементами. Нестача кальцію негативно позначається на фізіологічних властивостях і розмноженні бульбочкових бактерій [127, 225]. Потреба в кальції може компенсуватися у *Rhizobium* стронцієм, але не магнієм і не барієм. Разом з тим кальцій необхідний бульбочковим бактеріям у дуже малих кількостях [89].

Внесення в ґрунт кобальту помітно підвищує врожай бобових рослин, а дефіцит цього елемента призводить до порушення діяльності деяких ферментів [133, 197]. Молібден у поєднанні з міддю підвищує вміст вільної глютамінової кислоти в бульбочках кормових бобів, а в бульбочках люпину – вміст аспарагіну [34]. За відсутності міді пригнічується синтез леггемоглобіну

і амінокислот, порушуються функції вуглеводного обміну бобових рослин. За дефіциту міді, зазвичай, утворюються дрібні, розкидані по кореневій системі бульбочки. Ванадій впливає на азотфіксацію, а також додатково підсилює дію молібдену [89].

Бор відіграє важливу роль у синтезі вуглеводів і необхідний для встановлення нормального симбіозу між бульбочковими бактеріями і рослиною. За дефіциту цього елемента різко знижується поріг рН, при якому формуються бульбочки, не утворюються судинні пучки [8].

Одним із шляхів підвищення ефективності симбіотичної азотфіксації є внесення органічних добрив, наприклад, соломи або свіжого гною. Подібні речовини швидко розкладаються у ґрунті, значно поліпшують вуглеводне харчування рослин і покращують структуру ґрунту [29, 38].

Виявлено наявність прямої залежності інтенсивності азотфіксації бобових від ваги, обсягу, кольору і розташування бульбочок та зворотної – від їх кількості [75]. Також встановлено, що фіксація азоту залежить від розміру бульбочок – вона інтенсивніша у великих бульбочках, тобто їхня ефективність пов'язана з обсягом інфекційних тканин, тривалістю їх функціонування і наявністю в цій тканині леггемоглобіну [133]. За даними науковців бульбочкові бактерії з найвищою азотфіксуючою активністю утворюють зазвичай великі бульбочки, розташовані на головному корені і навколо нього. Бактерії, що утворюють дрібні бульбочки, розосереджені по кореневій системі, зазвичай фіксують мало азоту або зовсім не фіксують його, паразитуючи на рослині. Іноді вони навіть знижують урожайність [32]. Тому вкрай важливо забезпечити гармонійне функціонування симбіотичної системи бобова рослина – ризобії.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МЕТОДИ ТА УМОВИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Ґрунтово-кліматичні умови Лісостепу правобережного

Формування кормової продуктивності козлятнику східного залежить, окрім технології вирощування, ще й від ґрунтово-кліматичних умов. Тому, вивчивши ґрунтово-кліматичні умови території, де вирощується культура, можна пояснити низку особливостей росту і розвитку та її потенційні можливості у цьому регіоні.

Зона Лісостепу простягається із заходу на схід, займає центральну частину України і становить 34,6% її території. У складі її земельного фонду 80% сільськогосподарські угіддя, в тому числі 66%—рілля [20, 195]. Лісостеп займає третину України і має значний відсоток орної землі, на якій вирощується широкий діапазон сільськогосподарських культур. Основними галузями тваринництва є м'ясо-молочне скотарство, свинарство та птахівництво, що потребує добре розвиненого рослинництва та кормовиробництва [195].

Згідно із сучасною структурою природно-сільськогосподарського та ґрунтового районування України зона Лісостепу поділяється на три провінції: Лісостеп західний, Лісостеп правобережний та Лісостеп лівобережний [135].

Лісостеп правобережний займає центральну частину Лісостепу і включає всю Вінницьку область, східну половину Хмельницької, південну—Житомирської та Київської, північну—Одеської, північно-західну—Кіровоградської та майже всю Черкаську область за винятком правобережної смуги Дніпра.

Рельєф Лісостепу правобережного рівнинний, але трапляються горбисті території. У західній частині провінції простягається Волино-Подільська височина, яка на схід поступово переходить у Дніпровські тераси.

Внаслідок таких особливостей рельєфу орні землі у правобережному Лісостепу значною мірою зазнають водної ерозії [13, 161]. Ґрунотвірними породами виступають лес і лесоподібні суглинки. Ґрунтові води на більшій частині провінції залягають на глибині 10 – 15 м, на терасах річок – 5–10 м, а в низовинах – 2,5–3 м [20]. Ступінь родючості ґрунту значною мірою залежить від його механічного складу. В Лісостепу правобережному переважають суглинкові ґрунти: на півночі–легко- і середньо-, а на півдні–важкосуглинкові. Ґрунтовий покрив порівняно однорідний. Найпоширеніші сірі опідзолені ґрунти та чорноземи. Сірі опідзолені ґрунти є малородючими. Вміст гумусу в них невисокий – 2,0 – 2,5% і зосереджений переважно в гумусово-елювіальному горизонті, тому запаси його незначні – 150 – 200 т/га. Реакція ґрунтового розчину кисла: рН сол 4,5–5,5, гідролітична кислотність висока – 2,5–4,0 мг-екв./100 г, ступінь насиченості основами – 70–80%. Сума обмінних основ – 12–14 мг-екв./100 г ґрунту [53]. Ці ґрунти бідні на легкодоступний азот – 3,4 – 4,5 мг/100 г, рухомий фосфор – 10 – 15, та обмінний калій – 10 – 15 мг/100 г [20]. Вони безструктурні, запливають і утворюють кірку.

Клімат Лісостепу помірно-континентальний з тривалим і теплим літом та короткою помірно холодною зимою. Середньорічна температура повітря становить 7,0°C, найнижча середньомісячна температура взимку становить мінус 6,0°C, найвища–влітку–18°C. Взимку спостерігаються тривалі інтенсивні відлиги. Мінімальна температура – мінус 38°C. Літо характеризується високими сталими температурами. Найвища температура сягає 38°C.

За багаторічними метеорологічними спостереженнями перехід середньодобової температури через 5°C навесні відбувається на початку квітня, а восени – наприкінці жовтня – на початку листопада. Отже, тривалість вегетаційного періоду становить 200 – 205 днів [161]. Перші приморозки на поверхні ґрунту спостерігаються наприкінці вересня, останні

приморозки – в середині травня. Середньорічна температура ґрунту становить 8,4°C.

Середньорічна сума опадів – 580–630 мм, за вегетаційний період випадає 432 мм опадів. Найбільше вологи припадає на літо – 80–90 мм/міс., найменше – на зиму – 30–35 мм/міс.

Середньорічна температура повітря–7°C, абсолютний мінімум її становить мінус 38°C, максимум–38°C. Середньорічна температура ґрунту – 8,4°C, глибина його промерзання–0,4 м.

Середня висота снігового покриву сягає 16 см. Тривалість сонячного сяйва становить 889-1975 год/рік.

Переважають західні, південні і північно-західні вітри. Їхня середня швидкість становить 1,7-3,3 м/с.

Експериментальну частину роботи виконували впродовж 2011 – 2016 рр. у польових умовах дослідного поля Вінницького національного аграрного університету і Вінницької державної сільськогосподарської дослідної станції Інституту кормів та сільського господарства НААНУ у с. Агрономічне Вінницького району за 7 км на південь від м. Вінниця.

За агрокліматичним районуванням територію дослідного господарства віднесено до першого, помірно теплого вологого району (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Кліматичні показники впродовж вегетаційного періоду, 2012 р.

Дата	Травень		Червень		Липень		Серпень		Вересень		Жовтень	
	t, °C	опаді, мм.	t, °C	опаді, мм.	t, °C	опаді, мм.	t, °C	опаді, мм.	t, °C	опаді, мм.	t, °C	опаді, мм.
I декада	18,6	10,5	18,1	51,1	24,7	2,8	22,9	3,9	17,1	2,9	13,2	16,1
II декада	15,8	5,0	21,4	5,6	20,2	29,8	16,2	41,4	17,0	0,5	9,3	6,8
III декада	17,2	7,6	19,8	15,1	22,5	21,4	19,5	40,0	14,7	8,3	7,1	20,0
За місяць	17,2	23,1	19,8	71,8	22,5	54,0	19,5	85,3	16,3	11,7	9,8	42,9
Ср.бр	13,6	63	16,7	77	18,7	76	17,8	72	12,9	47	7,5	44

У Лісостепу правобережному часто трапляються посушливі періоди. В середньому за рік спостерігається чотири бездощових та з неефективними опадами періоди, тривалістю близько 10 днів, два періоди тривалістю близько 15 днів, один – близько 20 днів та кожні 2 роки тривалістю понад 25 днів. Кожен третій – четвертий дощ у червні – липні має зливовий характер, тому значна частина вологи стікає в низини, а на поверхні ґрунту утворюється кірка.

Дослідження проводились впродовж 2012–2014 рр. на спільному дослідному полі Вінницького національного аграрного університету і Вінницької державної сільськогосподарської дослідної станції Інституту кормів та сільського господарства НААНУ у с. Агрономічне Вінницького району за 7 км на південь від обласного центру м. Вінниці.

Дослідне поле знаходиться в центрі Вінницької області і розташовано майже на межі двох геоморфологічних районів: Летичівсько-Літинської давньоалювіальної і водно-льодовикової западини та Вінницької денудаційно-аккумулятивної хвилястої рівнини Придністровської височини.

Територія господарства має рівнинний рельєф, що характеризується незначним підняттям і слабким розчленуванням території. Абсолютні висоти сягають 298 м над рівнем моря. Перепад висот між найвищою частиною вододілів і зниженням балок становить 25–30 м.

Ґрунт на дослідній ділянці – сірий лісовий середньосуглинковий. За даними агрохімічного обстеження вміст гумусу в орному шарі низький – 3%. Вміст легкогідролізованого азоту (за Корнфілдом) низький – 7,0–8,0 мг/кг, рухомого фосфору (за Чириковим) високий – 16,0–19,4 мг/кг, обмінного калію (за Чириковим) підвищений – 9,5 мг/кг ґрунту.

Гідролітична кислотність висока і становить 4,32 мг-екв/100г ґрунту. За обмінною кислотністю рН сол. 5,0–5,4 ґрунт середньоокислий.

Отже, ґрунт дослідної ділянки та його агрохімічні показники є типовими для цієї зони і придатні для вирощування козлятнику східного на насіння.

У цілому Лісостеп правобережний характеризується помірно теплим і вологим кліматом, що є сприятливим для росту і розвитку козлятнику східного [161].

Експериментальну частину роботи виконували впродовж 2011 – 2016 рр. також у вегетаційних та лабораторних умовах відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України у смт. Глеваха, Васильківського району, Київської області.

Характеристика ґрунту дослідної ділянки Інституту фізіології рослин і генетики НАН України: вміст гумусу (за Тюрінім) – 1,75%; гідролітична кислотність (за Каппеном) – 1,6 – 1,8 мг-екв/100 г ґрунту; рН (за методом ЦІНАО) – 5,5; легкогідролізований азот (за Тюрінім – Коновою) 80 мг/кг; P₂O₅ (за Чириковим) – 96 мг/кг; K₂O (за Масловою) – 140 мг/кг ґрунту; валовий азот – 0,2 – 0,5%; P₂O₅ – 0,15 – 0,30%; K₂O – 2,0 – 2,5%.

2.2. Об'єкти досліджень

Об'єктами досліджень було 6 штамів *Rhizobium galegae* Л1, Л2, Л3, Л4, Л5, Л6, виділених нами у різні роки з бульбочок козлятнику східного та еталонний виробничий штам *Rhizobium galegae* CIAM 0703 (зберігається у Колекції культур бульбочкових бактерій (ВНДІСГМ РАН), та еталонний штам *Rhizobium galegae* МС-1 №159 української селекції, а також 55 штамів, збудників бактеріозу козлятнику східного, виділених нами з уражених бактеріозами рослин у різні періоди з досліджуваних регіонів України, а також 14 колекційних штамів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049 (80036), 820, 8050, 8147, 8148, 8149, 8154, 8156, 8157, УКМ В-7001 (8158), 8159, 8160, 8161; 7 колекційних штамів *Pseudomonas fluorescens*, а саме: *P. fluorescens* УКМ В-17^T=АТСС 13525 (одержаний з перед фільтру ферментера, Кіпріанова Є.А.), *P. fluorescens* ІМВ В-8573=NCPPB 1163

(Англія, 1971), *P. fluorescens* УКМ В–28 (одержаний з ризосфери коноплі рудеральної *Cannabis ruderalis*, Бойко О.І.), *P. fluorescens* ІМВ В–36 (одержаний з ґрунту, Кіпріанова Є.А.), *P. fluorescens* ІМВ В–41=АТСС12983 (Кіпріанова Є.А.), *P. fluorescens* ІМВ В–52 (одержаний з ризосфери пшениці м'якої *Triticum aestivum*, Бойко О.І.), *P. fluorescens* ІМВ В–53 (одержаний з ризосфери люпину багаторічного *Lupinus perennis*, Бойко О.І.), колекційні штами *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* ІМВ В–9175=УСМР3555 (Новозеландська колекція), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В–1027^Т=АТСС 19310 (виділений з гілки бузку звичайного *Syringa vulgaris*, Мурач В.А.), *P. syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 (УКМ В-1027), *Pectobacterium carotovorum* subs. *carotovorum* УКМ В–1075^Т=АТСС 15713 (виділений з картоплі бульбоносною *Solanum tuberosum*, Мурач В.А.) з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. У роботі також використовували штами бактерій роду *Bacillus* з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України – *Bacillus subtilis* ІМВ В–7243, *Bacillus subtilis* УКМ В–5137 (ІМВ В–7101) і *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ В–5017 (ІМВ В–7100).

У дослідженнях використовували 3 сорти козлятнику східного (табл.2.2).

При вирощуванні козлятнику застосовували загальноприйнятту агротехніку для безпокровних посівів кормових багаторічних бобових культур. Після збирання попередників наприкінці вересня– на початку жовтня проводили глибоку оранку. Навесні здійснювали передпосівне оброблення ґрунту: розпушування поверхневого шару до дрібногрудкуватого стану, вирівнювання його та знищення бур'янів. Впродовж першого року вегетації проводили міжрядне оброблення. Посіви оброблялися вручну, без застосування гербіцидів.

При плануванні польового дослідження застосовували суцільний спосіб розміщення повторень. Розташування варіантів послідовне [56].

Таблиця 2.2

Характеристики сортів козлятнику східного, використаних у дослідженнях

Рослина	Сорт	Характеристика
Козлятник східний <i>Galega orientalis</i> L.	Кавказький бранець	Виведений у Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України. Зимо- і посухостійкий, вирощується на одному місці 10–12 років. На корінні однієї рослини налічують до 1100 бульбочок різної форми. Урожайність зеленої маси за два укоси становить 80–85 т/га, насіння–1 т/га. Вміст протеїну залежно від фази розвитку–24–27%. Маса 1000 насінин 7 – 9 г. Щороку фіксує з повітря 500–900 кг азоту і залишає в ґрунті з кореневими і стерньовими рештками 150 кг азоту, а це рівноцінно внесенню 40 т/га гною.
Козлятник східний <i>Galega orientalis</i> L.	Салют	Оригіатор – Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України. Характеризується раннім відростанням, добре утворює пагони, зимо- і посухостійкий, вирощується на одному місці 10–15 років. За два укоси врожайність зеленої маси–80–90 т/га, насіння близько 0,8 т/га. За властивостями фіксувати азот повітря близький до сорту Кавказький бранець
Козлятник східний <i>Galega orientalis</i> L.	Донецький 90	Виведений у виробничо-науковому центрі «Гетерозис» АР Крим. Маса 1000 насінин – 7,6 г. Урожайність зеленої маси за два укоси – 70,2 т/га, насіння–0,3–0,4 т/га. Щорічно фіксує понад 600 кг азоту повітря і залишає в ґрунті понад 130 кг.

Перед сівбою насіння козлятнику скарифікували перетиранням його з чистим прожареним річковим піском, стерилізували 20 хв 70 % етанолом і промивали водопровідною водою. Безпосередньо перед висіванням його

інокулювали відповідно до схем дослідів штамми *Rhizobium galegae* Л2, виробничим штамом CIAM 0703 та штамом еталоном МС–1 №159.

Норма висівання козлятнику – 20 кг/га насіння. Спосіб сівби - широкорядний (із шириною міжрядь 45 см), глибина загорання - 1,5-2 см. Сівбу проводили в період, коли ґрунт на глибині загорання насіння прогрівався до +5-6 °С, був достатньо вологий і легко розроблявся до дрібногрудкуватого стану. Посів здійснювали в третій декаді квітня – на початку травня. Після сівби ділянки коткували з метою ущільнення ґрунту навколо насіння і забезпечення надходження до нього вологи з нижніх шарів ґрунту.

Польові дослідження з вивчення впливу бульбочкових бактерій на функціонування бобово-ризобіального симбіозу, ростові процеси, формування урожаю надземної маси та насінневу продуктивність козлятнику східного проводили у 2012 – 2014 рр. На трьох зазначених сортах козлятнику за такою схемою:

Таблиця 2.3

Схема польового дослідів 1

Фактор А – сорти	Фактор В – інокуляція
1. Салют; 2. Донецький 90; 3. Кавказький бранець.	1. Контроль (без інокуляції); 2. <i>Rhizobium galegae</i> CIAM 0703; 3. <i>Rhizobium galegae</i> МС–1 №159; 4. <i>Rhizobium galegae</i> Л2.

Вплив мінеральних добрив і ризобіофіту на мікробіоценоз ризосфери досліджували за схемою, яка наведена табл. 2.4.

Вплив зазначених факторів на кількість і масу бульбочок та їхню азотофіксуючу активність визначали впродовж перших трьох років онтогенезу козлятнику, беручи проби три – чотири рази під час першого року вегетації, а також у фазах стеблуння, бутонізації, цвітіння та відростання

надземної маси і стеблуння рослин другого укосу на другий і третій роки вегетації.

Таблиця 2.4

Схема польового досліджу 2

Фактор А - сорти	Фактор В - удобрення
4. Салют; 5. Донецький 90; 6. Кавказький бранець.	1. Контроль (без удобрення); 2. N ₃₀ P ₃₀ K ₃₀ ; 3. N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀ ; 4. ризобофіт; 5. ризобофіт+ N ₃₀ P ₃₀ K ₃₀ .

Вплив зазначених факторів на кількість і масу бульбочок та їхню азотофіксуючу активність визначали впродовж перших трьох років онтогенезу козлятнику, беручи проби три – чотири рази під час першого року вегетації, а також у фазах стеблуння, бутонізації, цвітіння та відростання надземної маси і стеблуння рослин другого укосу на другий і третій роки вегетації.

Укоси надземної маси здійснювали в кінці першого року вегетації, а у дослідях із козлятником другого і третього років вегетації у фазі бутонізації–початку цвітіння та у кінці вказаних років вегетації. Починаючи з другого року вегетації частину рослин кожного варіанту в польових дослідях залишали для обліку врожаю насіння.

Повторність польових дослідів 4-разова. Облікова площа ділянок 30 м².

Веgetаційні дослідження проводили у 2012 році у спеціально обладнаному приміщенні Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, м. Київ.

Визначення вірулентності та нітрогеназної активності штамів *Rhizobium galegae* у симбіозі з козлятником східним сорту Кавказький бранець першого року вегетації здійснювали за схемою:

1. Контроль (без інокуляції)+пісок;
2. Штам еталон виробничий СІАМ 0703+пісок;
3. Штам еталон МС–1 №159+пісок;
4. Штам *Rhizobium galegae* Л1+пісок;
5. Штам *Rhizobium galegae* Л2+пісок;
6. Штам *Rhizobium galegae* Л3+пісок;
7. Штам *Rhizobium galegae* Л4+пісок;
8. Штам *Rhizobium galegae* Л5+пісок;
9. Штам *Rhizobium galegae* Л6+пісок.

Структуру врожаю козлятнику східного сорту Кавказький бранець при інокуляції бульбочковими бактеріями та за дії фітопатогенних мікроорганізмів визначали за схемою:

1. Контроль (інокуляція *Rh. galegae* Л2);
2. Культуральна рідина *Ps. syringae* pv. *syringae*;
3. Культуральна рідина *Ps. syringae* pv. *syringae*+*Rh. galegae* Л2;
4. Культуральна рідина *Xanthomonas* sp. P14;
5. Культуральна рідина *Xanthomonas* sp. P14 + *Rh. galegae* Л2;
6. Культуральна рідина *Uromyces galegae* P15;
7. Культуральна рідина *Uromyces galegae* P15 + *Rh. galegae* Л2.

Амінокислотний склад протеїну зеленої маси зазначених сортів козлятнику східного у фазі стеблуння за передпосівної інокуляції *Rh. galegae* Л2 та дії фітопатогенної бактерії *Ps. syringae* pv. *syringae* визначали за схемою:

1. Контроль (без інокуляції);
2. Інокуляція *Rh. galegae* Л2;
3. Інокуляція *Ps. syringae* pv. *syringae*;
4. Інокуляція *Ps. syringae* pv. *syringae* + *Rh. galegae* Л2.

Виробничі дослідження ефективності застосування для передпосівної інокуляції насіння козлятнику східного сорту Кавказький бранець штаму *Rhizobium galegae* Л2, тобто удосконаленої технології вирощування козлятнику східного, проведено на агрополях Оратівського району Вінницької області у 2014 – 2015 рр. за схемою:

1. Контроль (інокуляції штамом еталоном МС–1 №159);
2. Запропонований штамм *Rhizobium galegae* Л2.

2.3. Методи досліджень

2.3.1. Виділення бактерій із козлятнику східного та методи вивчення їхніх патогенних властивостей

Бактеріологічний аналіз відібраних нами зразків уражених надземних органів рослин козлятнику східного здійснювали шляхом промивання у струмені водогінної води шматочків ураженої тканини упродовж 20 хв у спеціальних лійках. Потім зразок викладали у стерильну ступку, розтирали в краплі стерильної водогінної води та висівали на картопляний агар (КА) методом виснажливого штриха з подальшим інкубуванням упродовж 44 або 58 год, залежно від збудника. Колонії, що вирости на КА описували та відсівали для подальшого дослідження [117, 153]. Первинний скринінг патогенних властивостей виділених ізолятів проводили шляхом штучного зараження рослин козлятнику східного у фазі формування розетки листків до періоду бутонізації та цвітіння. У дослідженнях використовували 3 сорти козлятнику східного – Кавказький бранець, Салют, Донецький 90. Для штучного зараження використовували однодобову бактеріальну суспензію щільністю 1×10^7 КУО/мл. Контролем слугувала стерильна водогінна вода. Рослини інокулювали потрійним уколом тканини з подальшим нанесенням бактеріальної суспензії на місце уколу. Облік штучного зараження проводили на сьомий день після інокуляції рослин за розробленою 10-бальною шкалою,

а саме: 7–9 балів – хлороз 70–90 % листкової поверхні та стебла та його загнивання, 5–7 балів – хлороз 50–70 % листкової поверхні та стебла, 1–5 балів – хлороз 10–50 % листкової поверхні та стебла. Отже, відповідно до розробленої у відділі фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України шкали, штами з агресивністю 7–9 балів вважали агресивними, 5–7 балів – середньоагресивними та 1–5 балів – низько агресивними [67].

Статистичне оброблення отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами [117].

2.3.2. Вивчення культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей виділених штамів бактерій, збудників бактеріальних хвороб козлятника східного

Вивчення культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак *Rhizobium galegae*, зокрема морфологію колоній на картопляному агарі (КА), колір та консистенцію колоній, фарбування за Грамом проводили згідно загальноприйнятих у ґрунтовій мікробіології методів [116 – 118, 227].

Біохімічні властивості вивчали за характером росту на МПБ, молоці та желатині, протеолітичні властивості, згортання або пептонізацію молока, здатність розщеплювати білок та пептон до індолу тощо вивчали згідно загальноприйнятих [117].

Редукцію нітратів до нітритів виявляли за допомогою додавання реактиву Грісса до МПБ, що містив 0,1% азотнокислого калію, на якому було вирощено бактеріальну культуру. Почервоніння бактеріальної суспензії свідчило про здатність бактерій редукувати нітрати до нітритів. Оксидазну активність визначали за методами, описаними у відповідних методичних посібниках [116 – 118, 121, 157].

Каталазну активність культур визначали за здатністю каталази розкладати пероксид водню з виділенням бульбашок газу. Реакцію ставили з

охолодженою до кімнатної температури добовою культурою на стерильному предметному склі. Ізольовану колонію, взятую з поверхні поживного середовища, розтирали на склі і піпеткою наносили краплю 3%-го розчину пероксиду водню. Якщо через 30–60 с на склі з'являлися пухирці газу, результати реакції вважали позитивними.

Здатність засвоювати вуглеводи, спирти, органічні кислоти або амінокислоти, що були єдиним джерелом живлення, визначали за ростом бактерій та зміною забарвлення середовища Омелянського, яке в якості єдиного джерела вуглецю містило 0,5% відповідного досліджуваного вуглеводу. Як вуглецеве джерело використовували: моносахариди – (глюкозу, галактозу, арабінозу, манозу, фруктозу, ксилозу, рамнозу); дисахариди: (лактозу, мальтозу, сахарозу); трисахариди: (рафінозу) [116 – 118, 121, 157]. В якості єдиного джерела вуглеводного та азотного живлення використовували розчини багатоатомних спиртів: дульцитолу та манітолу та ароматичного спирту саліцину (0,1 % розчин). Облік результатів здійснювали на 3, 7, 14 та 21 добу культивування за зміною кольору індикатору, яка відбувалася в результаті зміни величини рН [61].

Мікробіологічні аналізи проводили за допомогою методики розведення ґрунтових суспензій з використанням живильних селективних середовищ [11, 61]. Враховувалась загальна чисельність амоніфікуючих бактерій на м'ясо-пептонному агарі (МПА), спороутворюючих бактерій – м'ясо-сусловому агарі (МПА+СА), стрептоміцетів і бактерій, що засвоюють мінеральний азот – на крохмале-аміачному агарі (КАА), олігонітрофільних мікроорганізмів – на середовищі Ешбі, целюлозоруйнуючих – на середовищі Гетчінсона, мікроскопічних грибів – на сусло-агарі (СА), крім того, враховувалась чисельність бактерій, що ростуть на агаризованій ґрунтовій витяжці.

При вивченні видового складу неспорівих бактерій використовували живильне середовище такого складу: 1 л капустияного відвару (100 г капусти на 1 л води), 25 мл пивного суслу, 1,25 мл кукурудзяного екстракту, рН середовища 7,0–7,2 [61, 116].

Поживні середовища для вирощування і зберігання бульбочкових бактерій, зокрема *Rhizobium galegae* Л2:

1. Бобовий агар I, г/дм³: бобовий відвар – 1 дм³; цукроза – 2,0 г; агар–агар – 20 г; рН – 7,0; стерилізація при 120°C (1 атм) 20 хв.

2. Бобовий агар II, г/дм³: бобовий відвар – 1 дм³; цукроза – 2,0 г; КН₂РО₄–1,0 г; MgSO₄ · 7Н₂О – 0,3 г; агар–агар – 15 – 20 г; рН – 7,0; стерилізація при 120°C (1 атм) 20 хв.

Бобовий відвар: 50 г бобів (горох, біла квасоля) заливають 1 дм³ водогінної води і варять 30–40 хв до набухання і розтріскування оболонки насіння (але боби не повинні розваритись). Відвар фільтрують через ватно-марлевий фільтр і доводять водою до 1 дм³.

3. Манітно-дріжджовий агар (МДА), г/л: маніт – 10,0; КН₂РО₄ – 0,5; MgSO₄ · 7Н₂О – 0,2; агар–агар – 16,0; рН – 6,6–7,2; стерилізація при 120°C (1 атм) 20 хв.

Мікробну біомасу вираховували на основі даних за кількістю і розміром клітин, приймаючи їх питому вагу за 1,08 г/см³ [11, 61, 116]. Продуктивність бактеріальних клітин і продуктивність біомаси бактерій визначали, підсумовуючі всі достовірні підйоми чисельності або, відповідно, біомаси бактерій за період спостережень [61, 117].

Для з'ясування типових і домінуючих видів мікроорганізмів використовували усереднені зразки ґрунту, складених з 25–30 проб, взятих у різних місцях досліджуваної ділянки. За визначення типових і домінуючих видів використовували показники частоти трапляння і рясності видів [297]. Типовими умовно вважали види, що виділялись більш ніж з третини всіх зразків (трапляння понад 33%), а домінуючі – види, які становили не менше 10% від усіх інших видів.

Якісний склад бактерій визначали відповідно до характеристик, наведених у визначнику Берджі [227], мікроскопічні гриби – за стандартними методиками [61, 297]. Неспороутворюючі бактерії визначали за В.В. Смірновим та Е.А. Кіпріановою [187], стрептоміцети – за Е.В. Валагуровою зі співав. [33].

Виділення і культивування фітопатогенних бактерій, визначення патогенних властивостей ізолятів та агресивності штамів, їхніх культурально-фізіологічних властивостей досліджували за класичними методами [117, 153].

Для дослідження впливу на азотфіксуючу активність системи козлятник східний – бульбочкові бактерії, фітопатогенну бактерію *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* вирощували на м'ясо пептонному бульйоні (МПБ) протягом 48 годин, фільтрували під вакуумом через фарфоровий фільтр і у фільтраті замочували протягом трьох годин корені козлятника з бульбочками. Аналогічно проводили роботу з *Uromyces galegae* P15. Фітопатогенний гриб вирощували на рідкому середовищі Чапека протягом 120 годин (5 діб).

Активність азотфіксації (нітрогеназної активності) в бульбочках козлятнику східного визначали ацетиленовим методом, який базується на низькій субстратній специфічності нітрогеназного ферментного комплексу здатного відновлювати ацетилен до етилену. Проби аналізували на газовому хроматографі «Chromatograf 504» (Польща) у режимі полум'яно-іонізаційного детектування [61]. Визначення специфічності, вірулентності та конкурентоспроможності бульбочкових бактерій проводили за методикою, описаною у монографії за редакцією В.В. Волкогона [61].

Накопичення азоту культурами і загального азоту в сухому рослинному матеріалі визначали мікрометодом Кьельдаля [62].

Для визначення амінокислотного складу аналізовані зразки гідролізували з 6 N HCl впродовж 24 год при 105°C за загальноприйнятою методикою [62]. Амінокислотний склад зразків визначали на автоматичному аналізаторі ААА-81 (Чехія), сірковмісні амінокислоти – в гідролізатах з попередньою оксидацією над мурашиною кислотою.

Визначення амоніфікуючої нітрифікуючої здатності ґрунту здійснювали за методикою, описаною у монографії за редакцією В.В. Волкогона [61].

Інтенсивність «дихання» ґрунту визначали за виділенням CO_2 газохроматографічним методом у системі ґрунт – атмосфера [61].

Економічну ефективність застосування нового штаму *Rhizobium galegae* Л2 розраховували відповідно до «Економіки сільського господарства» [69] на основі технологічних карт, складених за існуючими нормативами витрат на створення та використання травостоїв козлятнику східного. Перехідні затрати на прийоми створення травостоїв подано в сумі за три роки. Ціну на вартість насіння, добрив, біопрепаратів, пально-мастильних матеріалів, тарифну сітку на оплату праці взято станом на 01.01.2014 р. Під час розрахунків економічної ефективності визначали вартість продукції за виходом сіна відповідно до його класу за діючим стандартом [59].

Енергетичне оцінювання досліджуваних технологічних прийомів проводили згідно методики О. К. Медведовського та П. І. Іваненка [113]. Оцінку на інтенсивність досліджуваних моделей технології для визначення напрямку їх розвитку оцінювали за методикою А.Д. Гарькавого, В.Ф. Петриченка та А.В. Спіріна [44].

Математичне оброблення експериментальних даних проводили за методикою Б.О. Доспехова [56] за t-критерієм Стьюдента ($p=0,05$) із застосуванням програми Excel.

РОЗДІЛ 3

ФОРМУВАННЯ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ *RHIZOBIUM GALEGAE* – КОЗЛЯТНИК

Зважаючи на гостру необхідність вирішення нагальних питань відновлення і збереження ґрунтової родючості, одержання екологічної продукції, безпечної для здоров'я людини, цілком зрозумілим є постійно зростаючий інтерес дослідників до питань, пов'язаних із процесом біологічного перетворення молекулярного азоту. Це перетворення здійснюють діазотрофні мікроорганізми в симбіозі і асоціаціях із рослинами у природних екосистемах та агрофітоценозах, створених людиною. Останніми десятиліттями відбувся значний прогрес у сфері біологічної азотфіксації, пов'язаний з розробленням інструментальних методів, що дають можливість здійснювати комплексні дослідження, які охоплюють різні рівні організації та функціонування рослинно-мікробних систем: генетичний, молекулярний, клітинний, організменний, системний. При цьому нові методи молекулярної біології, біотехнології та генетичної інженерії поряд із класичними методами мікробіології, фізіології рослин, генетики й агрохімії дають можливість як вирішувати фундаментальні питання щодо особливостей формування та функціонування фітобактеріальних систем різної ефективності, так і розкривають практичні шляхи корекції взаємодії симбіотичних партнерів для створення вискоелективних симбіозів, спрямованих на підвищення існуючого рівня біологічного перетворення азоту атмосфери на органічні азотовмісні сполуки [89–91, 93, 148].

Найбільше практичне значення у збагаченні ґрунтів азотом завдяки його засвоєнню з повітря мають бульбочкові бактерії, які фіксують молекулярний азот у симбіозі з бобовими рослинами, широко розповсюджені в ґрунтах різноманітні вільноживучі азотфіксуючі бактерії та виявлені останніми роками нові форми мікроорганізмів, що здатні засвоювати

молекулярний азот в асоціаціях із кореневою системою небобових рослин [156].

У зв'язку з цим останніми десятиліттями дедалі більше уваги приділяють системі землеробства, що ґрунтується на максимальному використанні біологічного азоту. Козлятник східний (*Galega orientalis* Lam.) – культура з високим симбіотичним потенціалом. Проте, оскільки в Україні він інтродукований порівняно недавно, в ґрунтах відсутні дикі раси його бульбочкових бактерій. Тому важливою і обов'язковою умовою за його вирощування є інокуляція насіння перед сівбою специфічним штамом бульбочкових бактерій. Завдяки цьому заходу продуктивність посівів козлятнику підвищується на 32–59 %, збільшується вміст протеїну в зеленій масі, підвищується зимостійкість рослин [65, 78, 109, 140].

Ось чому застосування передпосівної бактеризації насіння бобових культур високоактивними конкурентоздатними штамми бульбочкових бактерій є важливою умовою отримання високих урожаїв. У зв'язку з цим, виникає потреба в проведенні систематичної роботи як щодо пошуку активних штамів ризобій, так і щодо підвищення ефективності функціонування бобово-ризобіального симбіозу [147]. Відомо, що взаємодія макро- та мікросимбіонтів з огляду на їхні генетичні відмінності не завжди супроводжується підвищенням рівня азотфіксувальної активності. Азотфіксувальний потенціал бобово-ризобіальних систем максимально реалізується за комплементарності партнерів симбіозу [47]. Тому, високоефективні симбіотичні системи можна сформувати шляхом цілеспрямованого добору генетично сумісних пар: сорт рослини-живителя та штам бульбочкових бактерій з урахуванням ґрунтово-кліматичних та агротехнічних умов [92].

3.1. Скринінг штамів *Rhizobium galegae* за їхньою здатністю утворювати ефективну симбіотичну систему з *Galega orientalis* Lam.

Оскільки культура козлятнику східного, незважаючи на свої цінні властивості, ще не набула необхідної посівної популярності і є відносно

новою для України культурою, тому в більшості ґрунтів відсутні активні «аборигенні» штами бульбочкових бактерій, здатні формувати високопродуктивний симбіоз з цією рослиною. Проте, у Вінницькій і Тернопільській областях дещо раніше за інші регіони України, культура козлятнику все ж таки здобула свій ареал вирощування, тому скринінг штамів бульбочкових бактерій ми зосередили у зазначених регіонах. Адже на практиці пошук штаму бульбочкових бактерій, що взаємодіє би з максимально можливим спектром районованих і перспективних у певному регіоні видів і сортів бобових рослин, покращуючи їх живлення та підвищуючи продуктивність, має важливе значення для виробництва біопрепаратів [218].

У період 2011–2012 рр. проаналізовано близько 300 зразків рослин козлятнику східного з відносно великою кількістю бульбочок на корінні рослини.

Найефективнішими виявилися 6 штамів *Rh. galegae*, виділених нами у різні роки з бульбочок козлятнику східного і залучених до досліджень, виробничий штам *Rh. galegae* CIAM 0703 ВНДІСГМ РАН, еталонний штам *Rh. galegae* МС–1 №159 української селекції) (табл.3.1) [143].

Таблиця 3.1

Високоєфективні штами *Rhizobium galegae*, виділені з бульбочок козлятнику східного

Штами	Джерело виділення	Ґрунт, місце виділення
<i>Rhizobium galegae</i> : Л1	козлятник східний сорту Кавказький бранець	сірий лісовий середньосуглинковий ґрунт Вінницької державної сільськогосподарської дослідної станції Інституту кормів та сільського господарства НААНУ
Л2	козлятник східний сорту Кавказький бранець	те саме
Л3	козлятник східний сорту Кавказький бранець	те саме

Продовження табл. 3.1

Л4	козлятник східний сорт Салют козлятник східний сорт Донецький 90	чорнозем опідзолений середньосуглинковий на лесах агроділянки Тернопільського державного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка
Л5	козлятник східний сорт Салют	те саме
Л6	козлятник східний сорт Салют козлятник східний сорт Донецький 90	те саме
Штам-еталон виробничий CIAM 0703	0703 (зберігається у Колекції культур бульбочкових бактерій ВНДІСГМ РАН, С.-Петербург–Пушкін) російської селекції	
Штам-еталон №159	штам <i>Rhizobium galegae</i> МС–1 №159 української селекції	

Найголовнішими критеріями добору найефективнішого штаму *Rhizobium galegae* для створення високопродуктивного симбіозу з козлятником східним є висока вірулентність, тобто здатність до утворення справжніх бульбочок, висока азотфіксуюча активність, конкурентоздатність, технологічність та ефективність симбіотичної системи, які перевіряли у вегетаційному досліді на прожареному піску [61].

3.2. Виділення та добір нових ефективних штамів *Rhizobium galegae*

Важливим етапом нашої роботи було проведення досліджень обраних штамів на здатність до утворення справжніх бульбочок і нітрогеназну активність. Як свідчать дані, наведені в табл. 3.2, усі досліджувані штами ризобій утворювали бульбочки на коренях рослин, але вони мали різну кількість та масу. Найвищими, порівняно з іншими штамми, були показники кількості та маси бульбочок штаму Л2, виділеного із козлятнику східного сорту Кавказький бранець.

Таблиця 3.2

Утворення справжніх бульбочок та нітрогеназна активність штамів *Rhizobium galegae* у симбіозі з козлятником східним сорту Кавказький бранець (вегетаційний дослід, пісок)

Варіант, штам	Кількість бульбочок, шт/рослину	Маса бульбочок, мг/рослину	Активність азотфіксації, мкмоль $C_2H_4 \times \text{росл}^{-1} \text{ год}^{-1}$ [138]	Суша надземна маса	
				мг/рослину	приріст до контролю, %
Контроль (без інокуляції)	–	–	–	524,3	–
Інокуляція штамом					
Л1	16,9±1,25	108,8±5,80	2,55±0,24	697,3	33,0
Л2	26,9±2,08	153,5±7,10	3,07±0,29	793,9	51,4
Л3	20,1±0,99	125,0±3,03	2,84±0,40	699,8	33,5
Л4	16,1±0,57	87,1±5,28	2,02±0,12	610,4	16,4
Л5	13,3±0,75	83,4±4,07	1,95±0,20	617,7	17,8
Л6	18,7±2,01	103,0±4,2	2,25±0,15	715,0	36,4
Штам-еталон виробничий СІАМ 0703	14,9±1,40	194,0±5,80	1,08 ± 0,08	711,8	35,6
Штам-еталон №159	16,0±1,24	127,0±5,0	1,83 ± 0,20	720,0	37,3
*НІР _{0,5}	4,6			38,24	

*НІР_{0,5} – найменша істотна різниця за 5% рівня значущості

Децо нижчим було утворення справжніх бульбочок (табл. 3.2) у штаму *Rh. galegae* Л3, виділеного з сорту козлятнику Кавказький бранець та *Rh. galegae* Л6, виділеного з бульбочок сорту Салют. Найменша кількість бульбочок сформувалась на коренях дослідних рослин, насіння яких було оброблено штамми *Rh. galegae* Л4, Л5. На коренях рослин у контрольному варіанті бульбочки не утворились. Сформовані у дослідних варіантах бульбочки в розрізі мали рожеве забарвлення, що свідчить про наявність у

них леггемоглобіну та можливість активного функціонування симбіотичної системи. Встановлено, що інтродуковані штами бульбочкових бактерій утворили з козлятником східним сорту Кавказький бранець бобово-ризобіальні симбіози, які вирізнялись різною азотфіксуючою активністю 2,55 – 3,07 мкг/год азоту на рослину. Найвищим цей показник був за інокуляції рослин штамом Л2 – 3,07. Активно фіксували азот атмосфери і штами, ізольовані із бульбочок козлятнику східного сорту Салют: Л4–2,02 мкг/год, Л5–1,95 та Л6 – 2,25 мкг/год азоту на рослину.

Фенологічні спостереження не виявили різниці між варіантами на початкових фазах розвитку рослин. Проте на 25–30 добу після сівби рослини в контрольному варіанті відставали у рості та мали світліше забарвлення листя, ніж у варіантах з інокуляцією. Стерильний пісок, на якому проводили досліди, є селективним середовищем з мінерального азоту і продуктивність рослин за цих умов визначається ефективністю симбіотичної азотфіксації. Дані з продуктивності рослин показали неоднакову ефективність досліджуваних штамів у симбіозі з рослинами різних сортів козлятнику східного. Приріст сухої надземної маси козлятнику східного сорту Кавказький бранець коливався від 697,3 до 793,9 мг/рослину, для сорту Салют – від 610,4 до 715,0 мг/рослину. Як свідчать наведені в табл. 3.2 дані, *Rhizobium galegae* Л2 був ефективнішим за інші досліджувані штами, в тому числі і за виробничий і стандартний штами *Rh. galegae* CIAM 0703 і 159.

3.3. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості високоефективного штаму *Rhizobium galegae* Л2

Штам ідентифіковано за визначником бактерій Бергі [227]. Штам *Rh. galegae* Л2 зберігається в колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України під №Л2.

Штам *Rhizobium galegae* Л2 характеризується наступними культурально-морфологічними властивостями: культура бактерій не

спороносна, грам-негативна, клітини мають форму дрібних паличок, розміром 1–2 мкм, палички рухливі. Бактерії пігмент не продукують. Культура швидкоросла.

Поживними середовищами для вирощування бульбочкових бактерії є бобовий агар I та II (БА), манітно-дріжджовий агар (МДА).

Фізіолого-біохімічні властивості. Симбіонт. Макросимбіонт – бобова рослина козлятник (*Galega orientalis* Lam.). Відношення до кисню – аероб, але здатний рости при зниженому вмісту кисню. Температурний діапазон росту: 25-35⁰С. Оптимальна температура росту: 28⁰С. При 40⁰С ріст відсутній. Діапазон рН 5,5-8,5. Оптимальна рН 7,0.

В якості джерела вуглецю штам *Rh. galegae* Л2 може використовувати глюкозу, сахарозу, маніт, ксилозу, мальтозу, рамнозу, сорбіт, лактозу, галактозу, а також ацетати, N-ацетиглюкозоамін, пірувати.

Поряд із засвоєнням азоту атмосфери може використовувати амонійний та нітратний азот. Відновлює нітрати до нітритів. Крохмаль не гідролізує. Целюлозу не розкладає. Желатин не розріджує. Молоко з лакмусом не пептонізує, слабо підлуговує. Штам Л2 зберігається на МДА (рН 7,0) або бобовому (гороховому) агарі при 6–8⁰С і пересівається 1 раз на 4–5 місяців.

Отже за морфолого-біохімічними ознаками штам *Rh. galegae* Л2 ідентичний стандартному еталонному виробничому штаму бульбочкових бактерій козлятнику східного СІАМ 0703 та штаму еталонному 159.

Оцінку симбіотичних властивостей штаму Л2 – азотфіксуючої активності, ефективності симбіозу (табл.3.3) та якості (амінокислотний склад) білка надземної маси козлятнику проводили в умовах вегетаційних та польових дослідів.

Як видно з табл. 3.3, штам *Rh. galegae* Л2 вступав в ефективний симбіоз з козлятником сорту Кавказький бранець, активно фіксував атмосферний азот і за азотфіксуючою здатністю в умовах вегетаційного досліді перевищував штам-еталон виробничий СІАМ 0703 у 2,8, а еталонний №159 –

в 1,7 раза. Урожай зеленої маси козлятнику зростав при цьому на 54,9 – 67,5% порівняно з контролем і на 14,1 й 38,4 – порівняно зі штамом-еталоном виробничим CIAM 0703 та №159 відповідно.

Таблиця 3.3

Врожайність зеленої маси козлятнику сорту Кавказький бранець у вегетаційному досліді, 2011 р.

Варіант, штам	Середній урожай, г/посудину	Приріст до контролю		Приріст до CIAM 0703		Приріст до №159		Активність азотфіксації, мкмоль C ₂ H ₄ ×росл ⁻¹ год ⁻¹
		г/посудину	%	г/посудину	%	г/посудину	%	
Контроль (без інокуляції)	26,8 ± 2,0	0	0	0	0	0	0	0
Штам еталон виробничий <i>Rh. galegae</i> CIAM 0703	59,5 ± 2,3	32,7	54,9	0	0	–	–	1,08 ± 0,08
Штам еталон <i>Rh. galegae</i> №159	70,7 ± 3,1	43,9	62,1	11,2	15,8	0	0	1,83 ± 0,20
Запропонований штам <i>Rh. galegae</i> Л2	82,4 ± 2,8	55,6	67,5	22,9	38,4	11,7	14,1	3,07 ± 0,29
НІР _{0,5} , г/посудину	–	6,77						–

Результати хімічного аналізу сухої речовини козлятнику східного залежно впливу запропонованого штаму Л2 у польових дослідях наведено в табл. 3.4.

Як свідчать дані табл. 3.4, використання в якості мікросимбіонтів для сорту козлятнику східного Кавказький бранець штамів *Rh. galegae* 0703, 159 і Л2 сприяло істотному і достовірному збільшенню вмісту сирого протеїну і

азоту в сухій речовині козлятнику. Оброблення зазначеними штамми забезпечило вміст сирого протеїну – 26,87–29,79 і азоту – 2,68–3,00%.

Таблиця 3.4

Вміст сирого протеїну і азоту в сухій речовині козлятнику східного сорту Кавказький бранець, 2011 р.

Варіант, штами	Вміст, %	
	сирого протеїну	азоту
Контроль (без інокуляції)	20,32	1,95
0703	26,87	2,68
159	27,80	2,87
Л2	29,79	3,00
НІР _{0,5}	1,67	0,75

Дослідження з визначення біологічної цінності білків, зокрема з амінокислотного складу, показали (табл.3.5), що передпосівне оброблення

Таблиця 3.5

Амінокислотний склад білка зеленої маси козлятнику східного, ммоль/г сухої зеленої маси

Амінокислоти	Контроль (без інокуляції)	Штам 0703	Штам 159	Штам Л2
Валін	4,3	7,2	8,1	9,5
Глютамінова	8,8	67,3	80,5	112,4
Ізолейцин	3,3	5,9	6,4	7,9
Лейцин	3,5	6,9	7,3	8,7
Лізін	5,6	8,4	9,5	11,3
Метіонін + цистин	3,0	5,1	5,9	6,7
Треонін	4,8	8,8	10,3	15,5
Фенілаланін + тирозин	7,6	15,4	19,5	24,9
Сумарна кіль- кість дослід- жених аміно- кислот	40,9	125,0	147,5	196,9

насіння козлятнику досліджуваними штамми *Rh. galegae* 0703, 159 і Л2 сприяло різкому збільшенню у зеленій масі глютамінової кислоти та деяких інших амінокислот. Різниця між амінокислотними гідролізатами проб отриманими за інокуляції насіння козлятнику, і контролем (без інокуляції) була особливо відчутною, зокрема за оброблення штамом *Rh. galegae* Л2 (табл.3.5). Так, сумарна кількість досліджуваних амінокислот була найвищою для штаму Л2 – 169,9 ммоль/г сухої зеленої маси, у контролі 40,9, що в 4,2 раза більше. Висока сумарна кількість була за оброблення штамом 0707 – 125,0, штамом 159 – 147,5 ммоль/г сухої зеленої маси. Проте, загальна кількість амінокислот для кожного зі штамів була нижчою за *Rh. galegae* Л2.

Висновки до розділу

У результаті проведених досліджень виділено та ідентифіковано високоактивний і конкурентоздатний штам *Rhizobium galegae* Л2 для підвищення урожайності козлятнику східного, який формує ефективний симбіотичний апарат з сортом козлятнику східного Кавказький бранець. Польові дослідження, проведені на сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті, засвідчили, що новий штам *Rh. galegae* Л2 за умови високої насиченості ґрунту аборигенними бульбочковими бактеріями формує ефективний симбіотичний апарат із сортом козлятнику східного Кавказький бранець. При цьому зазначений штам у симбіозі з рослиною активно фіксував молекулярний азот, його використання в якості мікросимбіонтів для сорту козлятнику східного Кавказький бранець сприяло істотному і достовірному збільшенню вмісту сирого протеїну і азоту в зеленій масі козлятнику. Так, оброблення цим штамом забезпечило вміст сирого протеїну сухій речовині козлятнику – 29,79, азоту – 3,00%, у контролі ці значення становили відповідно 20,32 і 1,95%, а також сприяло різкому збільшенню глютамінової кислоти у зеленій масі та деяких інших амінокислот.

На штам *Rh. galegae* Л2 одержано патент України [144]. Він зберігається в колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України під №Л2.

Отже, передпосівне оброблення насіння козлятнику східного азотфіксуючими і штамми бульбочкових бактерій дає можливість розробити екологічно безпечні технології вирощування цієї багаторічної бобової культури, що сприятиме не тільки одержанню високих сталих урожаїв, а й збалансованому забезпеченню рослин азотом, зменшенню витрат мінеральних добрив, зниженню вмісту нітратів у зеленій масі, відтворенню родючості ґрунтів [78].

Основні результати досліджень з вивчення ефективності штаму *Rh. galegae* Л2 опубліковано в наукових статтях, тезах та рекомендаціях з ефективного застосування мікробних препаратів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур [27, 75 – 80, 144 153, 211, 212, 219, 256, 257].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ БІОПРЕПАРАТІВ НА МІКРОБНІ УГРУПОВАННЯ ҐРУНТУ РИЗОСФЕРИ КОЗЛЯТНИКУ СХІДНОГО

Важливою функціональною ланкою системи ґрунт – мікроорганізм – рослина є мікробіоценоз ризосфери – складне угруповання різноманітних мікроорганізмів, які взаємодіють на основі екологічних і трофічних потреб і зв'язків [43, 154, 266].

Відомо, що визначальним фактором мікробного ценозу ризосфери є рослина [11, 43]. Проте, мікробне угруповання є сприйнятливим щодо дії будь-яких чинників навколишнього середовища [151, 154]. Для мікробного ценозу ризосфери характерна здатність стабілізувати рівновагу. Дія ж абіотичних і біотичних чинників порушує цю рівновагу [152, 266].

Досліджуючи кількісний та якісний склад мікробних угруповань ризосфери козлятнику східного, властивості домінуючих видів, можна зрозуміти процеси, які відбуваються у ґрунті ризосфери. Наприклад, розповсюдження в ґрунті видів, які засвоюють мінеральні форми азоту, свідчить про активний перебіг процесів мінералізації органічних речовин. Показником родючості ґрунту може бути превалювання ферментативно активних видів, які розріджують желатин, пептонізують молоко, гідролізують крохмаль тощо. Домінування у ґрунті факультативно-анаеробних видів може вказувати на погіршення умов аерації ґрунту. Про підсилення фунгістатичного потенціалу ґрунту свідчить наявність сприятливих умов для розмноження бактеріальної мікробіоти. Наявність спорових бактерій свідчить про забезпеченість ґрунту органічним джерелом азоту та про активність мінералізаційних процесів [134, 207].

Важливими є питання формування мікробного оточення, яке сприяє реалізації ефективної взаємодії козлятнику східного з асоціативними мікроорганізмами. Такі дослідження впливу інтродукованих мікроорганізмів на кількісний і якісний склад мікробіому ризосфери козлятнику східного та його активність мають сприяти ширшому застосуванню біопрепаратів при вирощуванні багаторічних бобових культур.

Прикладом зазначеного є наукова праця Л. Симочко зі співав. [184] про роль перцю *Capsicum annuum* L. у формуванні мікробіоти дерново-підзолистих ґрунтів Закарпаття. Авторами встановлено, що еколого-трофічні групи ґрунтових мікроорганізмів по-різному реагували на вирощування перцю за різних видів і норм добрив. Праця В.П. Патики зі співав. [155] теж узагальнює дані щодо впливу ріпаку озимого на склад і біологічну активність ґрунтових мікроорганізмів за вирощування його в сівозміні і беззмінно.

У наших дослідженнях біомаса бактерій при застосуванні мінеральних добрив збільшувалася порівняно з варіантом без добрив у понад 1,42 раза, при застосуванні ризобофіту та ризобофіту з $N_{60}P_{60}K_{60}$ – в 1,84 і 1,78 раза відповідно. Чисельність олігонітрофільних бактерій, що беруть участь у трансформуванні рештків органічної речовини в 1,56 раза, а стрептоміцетів – у 2,9 раза. Слід також зазначити, що ґрунт варіанта з ризобофітом та ризобофітом з мінеральним добривом характеризувався максимальним вмістом целюлозоруйнівних мікроорганізмів у 8,5 і 8,7 раза вищим, порівняно з контролем відповідно. Вміст мікроскопічних грибів мав тенденцію до збільшення від контролю до мінерального фону і до варіантів із застосуванням ризобофіту (табл. 4.1).

Підвищення чисельності бацил і стрептоміцетів у ґрунті із застосуванням ризобофіту і мінеральних добрив свідчить про глибшу деструкцію органічної речовини. Ці групи мікроорганізмів засвоюють сполуки, які часто недоступні для неспорних бактерій, а розвиваються на субстраті бідному на доступні сполуки [151, 155, 184, 273]. Якщо порівнювати з контролем варіанти із застосуванням ризобофіту і мінеральних добрив за різних норм, то вони поступаються зазначеним варіантам. Показником мобілізаційних процесів у ґрунті є також целюлозоруйнівні мікроорганізми. Вміст цих мікроорганізмів у 8,5 і 8,7 раза вищий за внесення різних добрив і норм порівняно з контролем. Внесення різних норм мінеральних добрив значно поступається за кількістю целюлозоруйнівних мікроорганізмів варіантам з використанням ризобофіту.

Таблиця 4.1

Кількість і біомаса мікроорганізмів у сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті при вирощуванні *Galega oritntalis L.* за різних видів добрив і норм їх унесення (середні дані за 2012–2014 рр.)

Варіант	Біомаса бактерій, т/га	Бактерії				Мікроскопічні гриби	Стрептоміцети	Целюлозоруйнівні
		амоніфікуючі	спороутворюючі	педотрофні	олігонітрофільні			
		*МПА	МПА + СА	*ГА	Середо- вище Ешбі			
10 ⁶ КУО/г сухого ґрунту							тис/г сухого ґрунту	
Контроль – без добрив	5,0	12	4,2	92	223	3,9	52	4,8
N ₃₀ P ₃₀ K ₃₀	6,2	21	8,1	168	288	4,8	85	12,2
N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	7,1	30	8,2	180	302	4,9	102	25,3
N ₉₀ P ₉₀ K ₉₀	7,4	34	8,9	184	299	4,1	116	26,9
ризобофіт	9,2	48	10,2	242	341	4,7	143	40,8
Ризобофіт + N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	8,9	51	10,9	253	350	5,1	151	41,7
НІР _{0,5}	1,0	3,5	1,5	17	25	0,5	21	2,1

*Примітка. МПА – м'ясопептонний агар; СА – сусло-агар; КАА – крохмаль-аміачний агар; ГА - агаризована ґрунтова витяжка.

Отримані результати досліджень підтверджують, що мобілізаційні процеси у ґрунті з застосуванням добрив та ризобіофіту позитивно впливають на життєдіяльність ґрунтових мікроорганізмів [145, 160].

Аналогічні зміни виявлено і в динаміці чисельності мікрофлори, що, вочевидь, зумовлено певними процесами надходження і розкладання органічної речовини. Найчисленніша група сапрофітних мікроорганізмів – бацили (рис. 4.2) переважають у ґрунті за сумісного застосування мінеральних добрив і ризобіофіту у фазі цвітіння козлятнику на 2-й та 3-й рік вирощування, проте кількість олігонітрофільних бактерій (рис. 4.1) водночас зменшується. Для мікроскопічних грибів різниця у варіантах досліджу незначна (рис. 4.3).

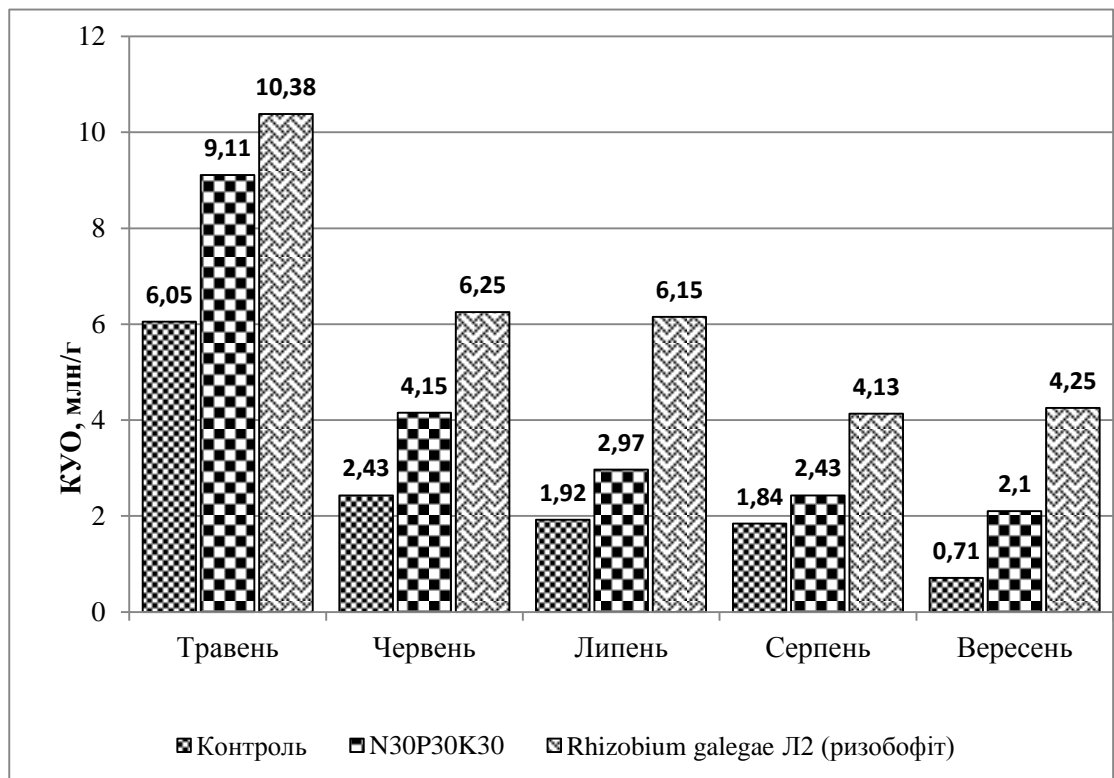


Рис. 4.1 Динаміка чисельності олігонітрофілів у сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті при вирощуванні *Galega orientalis* L. за різних видів добрив

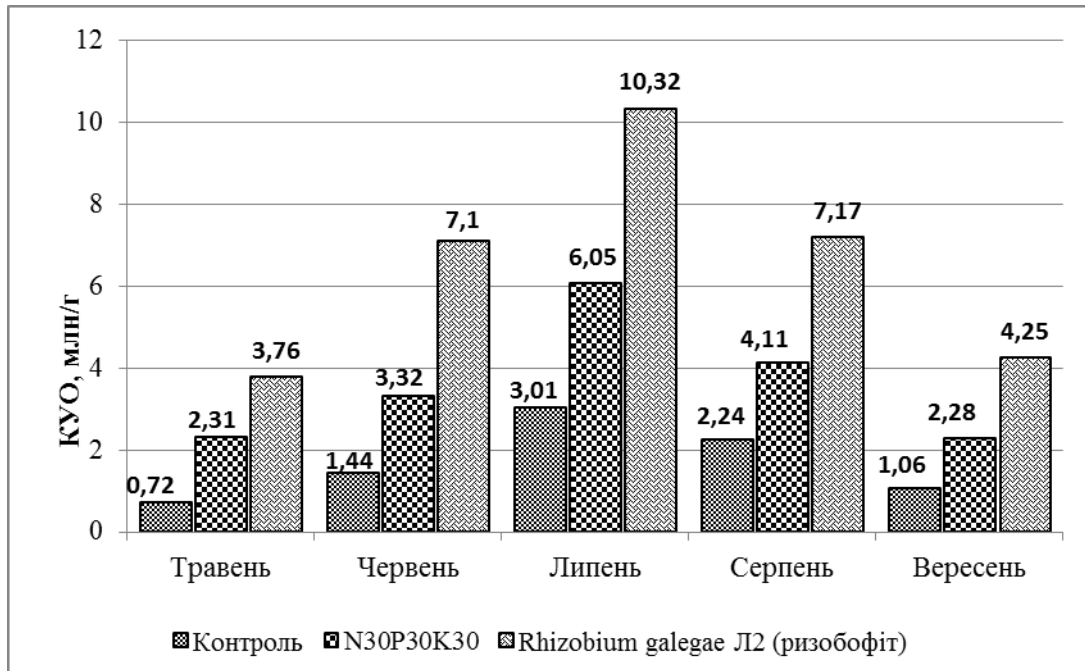


Рис. 4.2 Динаміка чисельності бактерій роду *Bacillus* у сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті при вирощуванні *Galega oritntalis* L. за різних видів добрив

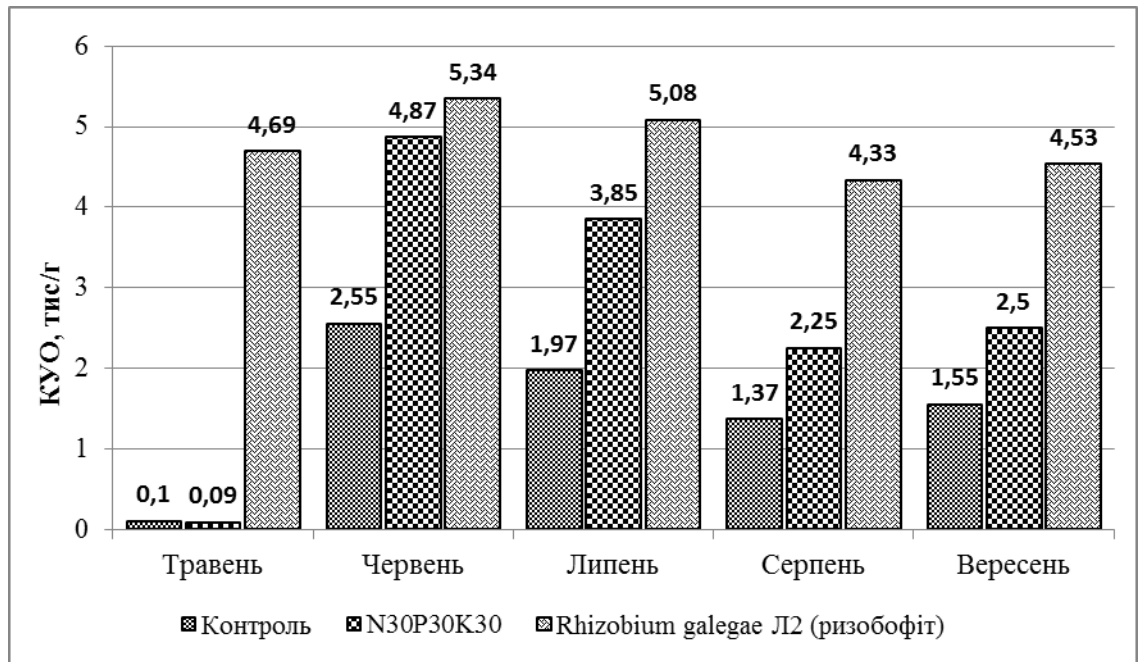


Рис. 4.3 Динаміка чисельності мікроскопічних грибів у сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті при вирощуванні *Galega oritntalis* L. за різних видів добрив

Дослідження амоніфікуючої та нітрифікуючої здатності ґрунту при вирощуванні козлятнику східного показали, що використання ризобіофіту позитивно впливає на цей показник. Порівняно з контролем амоніфікуюча здатність зросла на 158 мг NH_3 /100 г ґрунту.

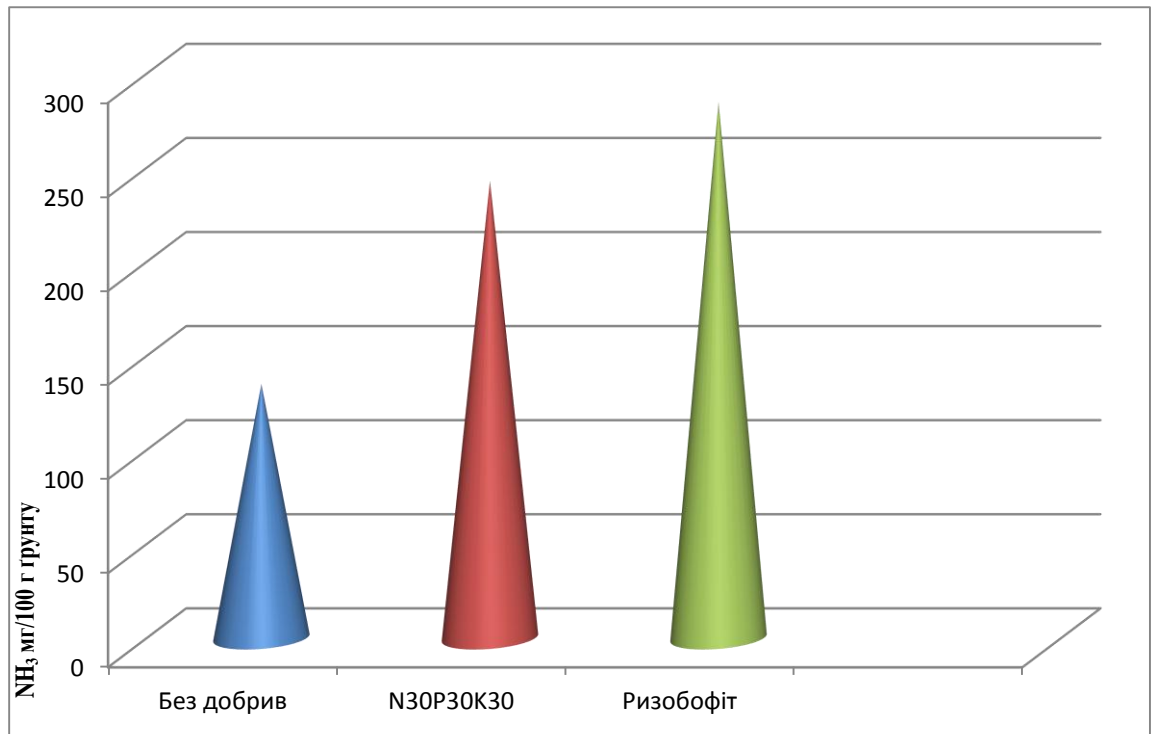


Рис. 4.4 Амоніфікуюча активність сірого лісового середньосуглинкового ґрунту при вирощуванні *Galega orientalis* L. за різних видів добрив, NH_3 мг/100 г ґрунту

Дослідження ж нітрифікуючої здатності ґрунту при вирощуванні козлятнику східного також показали позитивний вплив ризобіофіту на цей показник – нітрифікуючи здатність ґрунту порівняно з контролем зросла на 24 мг NO_3 /100 г ґрунту (рис. 4.5).

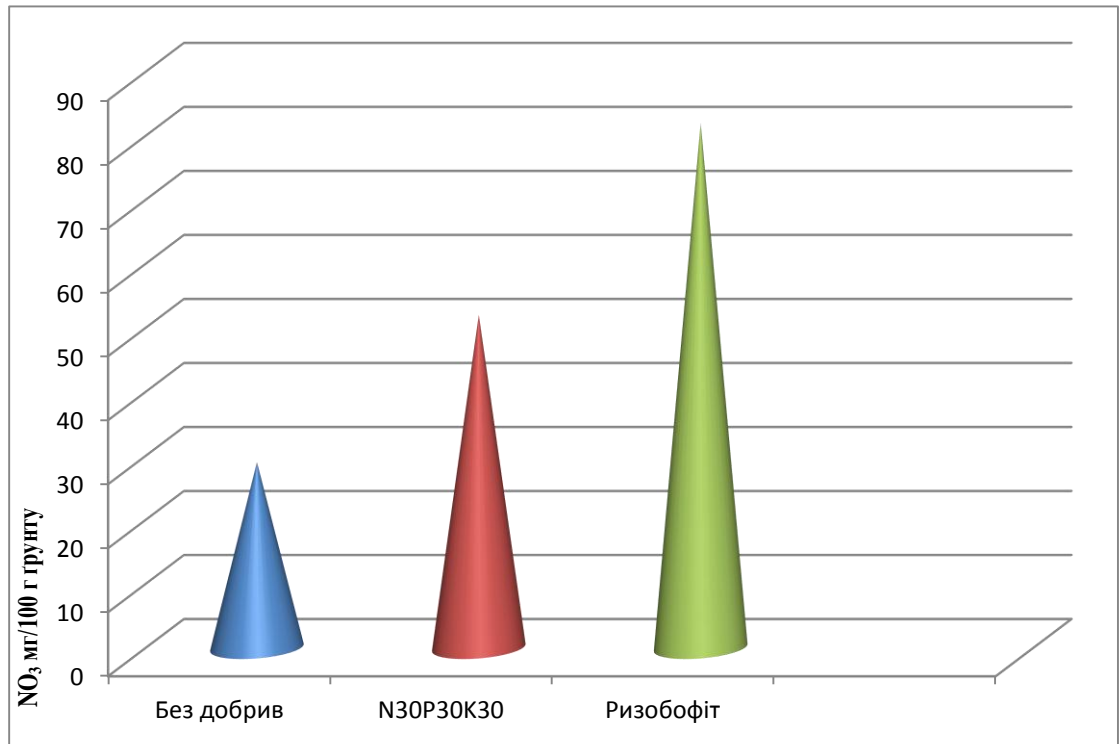


Рис. 4.5. Нітрифікуюча активність сірого лісового середньосуглинкового ґрунту при вирощуванні *Galega orientalis* L. за різних видів добрив, NO₃ мг/100 г ґрунту

Результати досліджень показали, що застосування ризобіфіту при вирощуванні козлятнику східного сприяє збільшенню виділення CO₂ у 2 рази порівняно з контролем (табл. 4.2). Такі самі закономірності спостерігали і за визначення поглинання O₂.

Таблиця 4.2

Інтенсивність виділення CO₂ і поглинання O₂ сірим лісовим середньосуглинковим ґрунтом при вирощуванні *Galega orientalis* L. за різних видів добрив

Варіант	Інтенсивність, мкг/г·год	
	виділення CO ₂	поглинання O ₂
Контроль (без добрив)	2,8	2,3
N ₃₀ P ₃₀ K ₃₀	4,1	4,5
Ризобіфіт	5,7	5,9

Вивчення видового складу бактерій (табл. 4.3) показало, що здебільшого ті самі види зустрічались при вирощуванні козлятнику східного без добрив. Спільними для двох досліджуваних варіантів удобрення були шість видів ризосферних неспорівих бактерій: *Agrobacterium radiobacter*, *Arhtrobacter globiformis*, *Arhtrobacter tumescens*, *Flavobacterium diffusum*, *Nocardia rubropertincta*, *Pseudomonas fluorescens*, які є сталою мікрофлорою досліджуваного ризосферного ґрунту, незалежно від застосування ризобофіту. Коефіцієнт видової спільності неспорюутворюючих бактерій у ризосфері козлятнику східного становить понад 30%.

Таблиця 4.3

Типові і домінуючі види неспорівих бактерій у ризосфері *Galega oritntalis L.* за різних видів добрив

Вид	Контроль – без інокуляції		Ризобофіт	
	I*	II*	I*	II*
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	3	4	12	3
<i>Arhtrobacter globiformis</i>	55	20	32	5
<i>Arhtrobacter oxydans</i>	–	–	71	12
<i>Arhtrobacter pascens</i>	45	10	–	–
<i>Arhtrobacter simplex</i>	76	5	–	–
<i>Arhtrobacter tumescens</i>	63	4	63	7
<i>Arhtrobacter ureafaciens</i>	–	–	45	4
<i>Brevibacterium fuscum</i>	34	2	–	–
<i>Flavobacterium diffusum</i>	47	5	24	3
<i>Flavobacterium harrisonii</i>	43	5	–	–
<i>Flavobacterium suaveolens</i>	–	–	65	6
<i>Mycobacterium lacticum</i>	58	6	–	–
<i>Nocardia albicans</i>	–	–	42	4

<i>Nocardia rubropertincta</i>	17	2	29	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	94	11	70	7
<i>Pseudomonas fragi</i>	62	8	–	–
<i>Pseudomonas putida</i>	44	5	–	–
<i>Pseudomonas rathonis</i>	–	–	47	3
<i>Serratia plymuthica</i>	–	–	34	4

*Примітка: I – частота трапляння виду, %; II – частка виду, %.

У ризосфері не виявлено шести видів неспоруютьючих бактерій, що зустрічалися у ризосферному ґрунті при використанні ризобіофіту, а саме: *Arhtrobacter oxydans*, *Arhtrobacter ureafaciens*, *Flavobacterium suaveolens*, *Nocardia albicans*, *Pseudomonas rathonis*, *Serratia plymuthica*.

Щодо спорууютьючих бактерій, то у варіантах з ризобіофітом зростала частота трапляння і частка *B. subtilis* і *B. megaterium* (табл. 4.4).

Збільшення у ґрунті із ризобіофітом питомої ваги у складі спорууютьючих бактерій видів (табл. 4.4), здатних використовувати мінералізований азот, вказує на те, що мобілізаційні процеси при застосуванні ризобіофіту відбуваються значно інтенсивніше, ніж у варіантах без нього.

При вирощуванні сільськогосподарських культур з використанням ризобіофіту у ґрунті складаються сприятливіші умови для життєдіяльності мікроорганізмів, у результаті чого підвищується його біологічна активність.

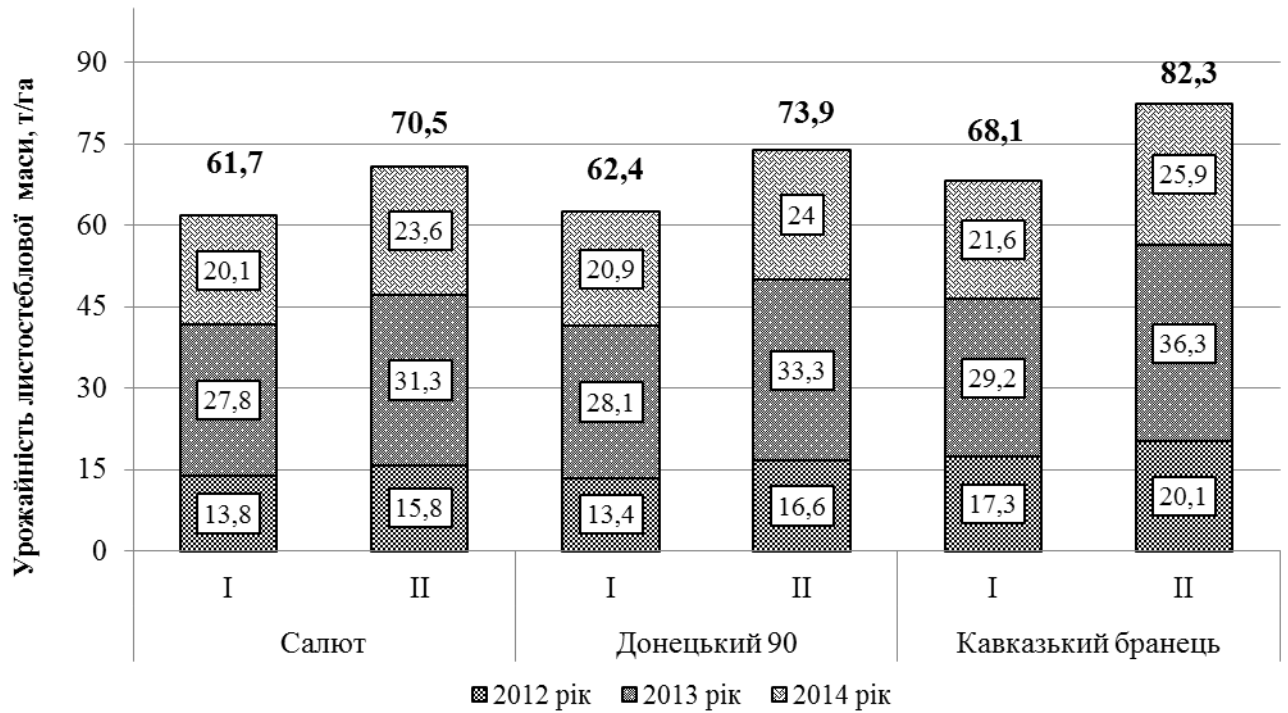
На основі проведених досліджень встановлено, що урожайність листостеблової маси козлятнику східного у рік сівби на контрольному варіанті становила 13,8 т/га у сорту Салют, 13,4 т/га у сорту Донецький 90 і 17,3 т/га у сорту Кавказький бранець, проведення передпосівної інокуляції насіння забезпечило зростання рівня урожайності на 17 – 23 %. Така ж тенденція збереглася і в наступні роки досліджень.

Типові і домінуючі види спорових бактерій у ризосфері *Galega oritntalis L.* за різних видів добрив

Вид	Контроль – без інокуляції		Ризобофіт	
	I*	II*	I*	II*
Ризосфера				
<i>Bacillus cereus</i>	90	18	80	21
<i>B. macerans</i>	90	64	100	34
<i>B. megaterium,</i>	43	6	60	8
<i>B. subtilis</i>	70	8	86	30
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	67	20	70	28
Міжряддя				
<i>Bac. macerans</i>	90	45	50	19
<i>Bac. cereus</i> + <i>Bac. mycoides</i>	90	19	96	35
<i>Bac. megaterium</i>	55	10	90	15
<i>Bac. subtilis</i>	70	20	93	40
<i>Bac. idosus</i>	17	7	19	4

*Примітка: I – частота трапляння виду, %; II – частка виду, %

Результати досліджень показали, що приріст урожаю листостеблової маси козлятнику східного у варіанті з обробленням насіння ризобофітом порівняно з контролем у сумі за три роки вирощування становив для сорту Кавказький бранець 14,2 т/га, сортів Салют – 8,8 т/га і Донецький 90 – 11,5 т/га (рис 4.6).



Примітка: I – без інокуляції; II – інокуляція насіння ризобіотом (штам Л12).

Рис. 4.6 Урожайність листостеблової маси сортів козлятнику східного та її розподіл за роками досліджень залежно від проведення інокуляції, 2012-2014 рр.

Застосування ризобіоту позитивно вплинуло на урожайність козлятнику східного, де виділяються 2 сорти – Кавказький бранець і Донецький 90. Приріст урожаю щодо контролю становив 18,4 %, і 20,8 % відповідно, що майже на третину більше порівняно з варіантом без інокуляції.

Висновки до розділу

Важливою функціональною ланкою системи ґрунт – мікроорганізм – рослина є мікробіоценоз ризосфери. Дослідження складу мікробіому ґрунту ризосфери козлятнику східного показали, що вони сприяють реалізації ефективної взаємодії козлятнику східного з асоціативними мікроорганізмами. У наших дослідженнях біомаса бактерій при застосуванні мінеральних добрив збільшувалася порівняно з варіантом без добрив у понад 1,42 раза, при застосуванні ризобіоту та ризобіоту з $N_{60}P_{60}K_{60}$ – 1,84 і 1,78 раза відповідно. Чисельність олігонітрофільних бактерій, що беруть участь у

розкладанні рештків органічної речовини збільшилась в 1,56 раза, а стрептоміцетів – у 2,9 раза. Варіант з ризобіофітом та ризобіофітом з мінеральним добривом характеризувався максимальним вмістом целюлозоруйнівних мікроорганізмів у 8,5 і 8,7 раза вищим порівняно з контролем відповідно. Вміст мікроскопічних грибів мав тенденцію до збільшення від контролю до мінерального фону і до варіантів із застосуванням ризобіофіту. Використання ризобіофіту позитивно вплинуло на амоніфікуючу та нітрифікуючу здатність ґрунту: амоніфікуюча порівняно з контролем зросла на 158 мг $\text{NH}_3/100$ г ґрунту, а нітрифікуюча – на 24 мг $\text{NO}_3/100$ г ґрунту. Вирощування козлятнику східного з використанням ризобіофіту сприяє збільшенню виділення CO_2 у 2 рази порівняно з контролем, те саме спостерігали і за визначення поглинання O_2 .

Вивчення видового складу бактерій показало, що здебільшого ті самі види зустрічались при вирощуванні козлятнику східного без добрив. При вирощуванні сільськогосподарських культур з використанням ризобіофіту у ґрунті складаються сприятливіші умови для життєдіяльності мікроорганізмів, у результаті чого підвищується його біологічна активність.

Приріст врожаю козлятнику східного у варіанті з ризобіофітом порівняно з контролем становив для сорту Кавказький бранець 14,2 т/га, сортів Салют – 8,8 т/га і Донецький 90 – 11,5 т/га.

Отже, вирощування козлятнику східного з використанням ризобіофіту істотно впливає на формування ґрунтової мікробіоти, при цьому у ґрунті відбувається збільшення її біомаси. Збільшується чисельність спороутворюючих, олігонітрофільних і целюлозоруйнівних мікроорганізмів. Підвищується рівень біологічної активності ґрунту, зокрема інтенсивності виділення CO_2 і поглинання O_2 , а також амоніфікуючої та нітрифікуючої активності. Певні зміни спостерігали і в динаміці чисельності мікроорганізмів, що зумовлено своєрідністю перебігу процесів надходження і розкладання органічної речовини у варіантах з ризобіофітом. Отримані дані свідчать, що мобілізаційні процеси у ґрунті з ризобіофітом відбуваються інтенсивніше, ніж за вирощування козлятнику східного без добрив.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ *RHIZOBIUM GALEGAE* – КОЗЛЯТНИК

Різноманітні шкідники та збудники хвороб рослин, зокрема гриби, бактерії, можуть завдавати істотної шкоди посівам козлятнику. Якщо не вживати заходів за появи перших ознак хвороб, їх патогенна дія спричиняє істотне зниження приросту зеленої маси козлятнику на 32–42%, а урожайності насіння на 15–30% [153, 209].

Найбільш вивчені в світі комахи – шкідники та грибні хвороби козлятнику. Останні донедавна переважали серед фітопатогенів. Слід зазначити, що бактеріальні хвороби козлятнику вивчені недостатньо, що пояснює обмежену кількість захисних препаратів цього класу на ринку засобів захисту. Проте останніми роками значну увагу дослідники приділяють хворобам сільськогосподарських культур, які спричинені фітопатогенними бактеріями [45, 153]. Адже не визначено коло бактеріальних збудників рослини, не визначено ризику перехресного зараження козлятнику та інших зернобобових, які широко культивуються в Україні.

Хвороби дуже шкодять козлятнику тим, що уражують наземні частини рослин, спричиняючи передчасне опадання листя. Це знижує урожайність та погіршує якість зеленої маси і насіння. Насіння на уражених рослинах здебільшого плюскле або низької життєздатності. Тому моніторинг хвороб, їх діагностика і захист посівів козлятнику східного від різних захворювань має велике практичне значення [1, 112].

5.1 Збудники бактеріальних хвороб козлятнику східного

Нами встановлено, що основним збудником бактеріозу козлятнику, який уражує усі надземні частини рослини, є *Pseudomonas syringae*

pv. syringae – поліфаг, що спричинює чорно-коричневі некротичні плями, тому назва хвороби має такі синоніми: бактеріальна плямистість, чорна плямистість, коричнева дрібна плямистість [45, 187].

Встановлено, що *Pseudomonas syringae pv. syringae* уражує усі наземні частини рослини. Захворювання проявляється спочатку на верхівках молодих листків у вигляді дрібних темних прозорих плям, які швидко зливаються і охоплюють значну площу листової пластинки, а згодом і всю площу листка. Уражена верхівка листка закручується або згинається. Захворювання спричиняє відмирання значної кількості листків рослини. За ураження стебла та черешків бактерії рухаються до судинних пучків і проникають у насіння. Часто на стеблах з'являються невеликі (2–5 мм у діаметрі) чорні сухі некротичні плями, які згодом збільшуються і розповзаються у смуги. Стебло скручується і може переломитися [45].

При проведенні моніторингу бактеріальних хвороб козлятнику на науково-дослідних та промислових посівах у Вінницькій області було визначено ще низку симптомів ураження рослин, які були спричинені бактеріальними фітопатогенами [112, 209]:

1. світло-коричневі плями (2–4 мм у діаметрі) неправильної форми із хлорозною облямівкою;
2. світло-коричнева облямівка листка;
3. некротичні світло-коричневі плями;
4. дірчастість із світло-бежевою облямівкою;
5. «опік» кінчика листка;
6. сухі бежеві просвічуючі плями;
7. чорні сухі некротичні плями;
8. почорніння і в'янення по жилці із розтіканням;
9. чорна перетяжка черешка листка.

Проведено бактеріологічний аналіз уражених зразків козлятнику, зібраних у Вінницькій області. Характеристику виділених ізолятів наведено у табл. 5.1, що може бути прикладом для первинного визначення і відбирання

збудників бактеріозів. За низкою візуальних ознак і вірулентністю відібрано ізоляти типу *Xanthomonas* за моніторингу козлятнику у Вінницькій області (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Фітопатологічний аналіз зразків козлятнику (бактеріальні ізоляти з посівів Вінницької області)

Роки	Кількість, шт.			Колонії ізолятів на агаризованому середовищі за морфологічними ознаками, шт.			
	зразків рослини		штами				
	проаналізовані	з яких ізольовані бактерії	відібрані для подальшого вивчення	жовтопігментні		сіро-білі, напів-прозорі, типу <i>Pseudomonas</i>	білі, непрозорі, типу <i>Bacillus</i>
			типу <i>Pan-toea agglomerans</i>	типу <i>Xanthomonas</i>			
2011	17	11	9	2	2	3	2
2012	17	13	10	4	2	3	1
2013	15	12	9	4	1	2	2
2014	10	3	8	3	2	2	1
2015	9	7	7	3	1	1	2
Усього	68	46	43	16	8	11	8

Збудник бактеріозу козлятнику роду *Xanthomonas* – рухливі палички грамнегативні, оксидазонегативні, каталазопозитивні. Клітини мають капсулу. Колонії 5–8 мм у діаметрі, округлі, опуклі, гладенькі, блискучі, непрозорі з рівними краями, мають жовто-зелену пігментацію.

Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей відіграє важливу роль в ідентифікації бактерій. Критерієм для класифікації є здатність бактерій використовувати ті чи інші субстрати для енергетичного обміну або виділяти

характерні продукти метаболізму. Фізіолого-біохімічні тести широко використовують для проведення аналізу та залишаються основою ідентифікації більшості мікроорганізмів.

Тому для подальшої ідентифікації збудників, виділених з уражених рослин, досліджували їхні фізіолого-біохімічні властивості.

Збудники бактеріозів козлятнику *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та визначені авторами *Pseudomonas* sp. і *Xanthomonas* sp. мають здатність розщеплювати вуглеводи на альдегіди і кислоти з утворенням вуглекислоти і води.

Виявлено, що штами *Pseudomonas* sp. використовують в якості єдиного джерела вуглецю такі вуглеводи: глюкозу, сахарозу, ксилозу, галактозу, фруктозу, рафінозу, гліцерол і манітол. Не ферментують лактозу, мальтозу, рамнозу, дульцитол (табл.5.2).

Таблиця 5.2

Фізіолого-біохімічні властивості збудників бактеріозів козлятнику

Тести	Роди та види збудників		
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
Колір колоній	сірувато-білі, опалесцентні	зеленувато-жовті, світлі	сірі, напівпрозорі
Фарбування за Грамом	–	–	–
Рухливість	+	+	+
Оксидаза	–	–	–
Редукція нітратів	–	–	–
Лакмусова сироватка	Л	редукція	Л
Використання молока	–	–	–
Утворення H ₂ S	–	–	–
Гідроліз желатину	–	+	–

Продовження табл. 5.2

Ріст на МПА	рівномірний ріст, кільце	ріст, кільце, плівка	рівномірний ріст
Використання:			
Глюкози	К	–	К
Глюкози анаеробно	–	–	–
Лактози, мальтози	–	–	–
Сахарози	К	–	К
Ксилози	К	К	К
Рамнози, манози	–	–	–
Галактози	К	–	К
Дульцitolу	–	–	–
Гліцеролу	К		К
Фруктози	К	К	К
Рафінози, манітолу	К	–	К
Щавлевої кислоти	Л	Л	Л
Реакція надчутливості	+	–	+

Примітка: «–» – відсутність ознаки; «+» – наявність ознаки; К – утворення кислоти; Л – луг.

За морфолого-культуральними ознаками частина виділених нами бактерій *Pseudomonas*– це прямі, рухомі палички, розташовані поодинокі або парами, грамнегативні, спор не утворюють. На м'ясопептонному бульйоні ростуть у вигляді слабкого шовковистого помутніння з утворенням тонкої ніжної плівки. В аеробних умовах ці ізоляти споживають як єдине джерело вуглецю: глюкозу, манітол, сорбітол, ксилолу, фруктозу, арабінозу, галактозу. Та не ферментують лактозу, дульцитол, інουλін, саліцин та не редукують нітрати.

Усі досліджені ізоляти за основними властивостями не відрізнялися від типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* NCPPB 281. На підставі вивчених властивостей цю групу бактерій, виділених з уражених рослин козлятника східного, ідентифіковано як *P. syringae*. Інші ізоляти, які не давали реакції мікроаглютинації з антисироватками до штамів п'яти серологічних груп, які зустрічаються на зернових культурах, віднесені до *Pseudomonas* sp. [45, 187].

Козлятник східний, як і інші представники роду бобових, може уражуватися збудниками бактеріозів бобових культур, до яких можна віднести *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (бура плямистість), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (бактеріальний опік) та *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (кутаста плямистість) – найпоширеніші збудники, які завдають значних економічних збитків. Інші види: *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, *Pseudomonas syringae* pv. *vignae*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Xanthomonas heterocea*, *Agrobacterium tumefaciens* теж можуть паразитувати на козлятнику східному. Зустрічаються у поодиноких випадках також *Pectobacterium carotovora* та *Pseudomonas putrefaciens*.

Крім цих збудників на бобових, включаючи козлятник східний, паразитують, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Ralstonia solanacearum* та бактерії, які виявлено деякими авторами у поодиноких випадках – *Pseudomonas viridiflava*, *Xanthomonas heterocea* [211].

Усі перераховані збудники бактеріальних хвороб бобових культур можуть бути потенційними збудниками хвороб козлятнику східного [1, 209].

5.2. Фітопатогенні гриби козлятнику східного

Серед хвороб культурних рослин грибні вважають найрозповсюдженішими. По-перше, через численність їх збудників, яких нараховують близько 20 тис., по-друге – у зв'язку із порівняно легким проникненням у рослину-живителя через природні отвори та можливістю уражувати рослини упродовж усіх фаз розвитку [171]. Ураженість

козлятнику східного грибними хворобами може бути істотною, сягаючи майже 30 % [165]. Водночас, технологічною особливістю вирощування кормових трав, до яких належить козлятник східний (*Galega orientalis L.*) є їх укуси, яких за вегетацію при вирощуванні галеги може бути 2–3. Цим пояснюється переважання бактеріального опіку, збудники якого потрапляють у рослинні тканини через пошкоджену поверхню.

В основі механізму патогенної дії фітопатогенних грибів лежить порушення трофічних ланцюгів, оскільки при проникненні до організму рослини-живителя ці фітопатогени стають акцепторами рослинних асимілятів, створюючи їх дефіцит, а по-друге – вони здатні виділяти токсини та численні ферменти, що руйнують або розріджують вуглеводні полімери клітинних стінок. Негативним наслідком такої взаємодії стає спотворення рослинного метаболізму. Паренхіматозні і судинні ураження, некротизація деяких тканин чи органів внаслідок мікозів перетворює рослину на джерело розповсюдження грибної інфекції. Відмерлі рештки рослин створюють інфекційний фон, що призводить до подальшого розповсюдження патогенів. І, хоча, механізми патогенної дії різних видів грибів можуть істотно вирізнятися, всі вони завдають значної шкоди сільськогосподарському виробництву, знижуючи урожай господарсько цінних органів, його якість та терміни зберігання [68, 121].

Нами встановлено, що найрозповсюдженішими грибними хворобами козлятнику східного є іржа, бура плямистість, рамуляріоз, церкоспороз, це при тому, що козлятник вважають достатньо резистентною рослиною [209, 211]. Наші дані співпадають з даними літератури [85, 134, 157].

Іржа. Збудниками є відділ *Basidiomycetes*, клас *Urediniomycetes*, родина *Russiniaceae*, рід *Uromyces*, вид *Uromyces galegae*.

Хвороба з'являється наприкінці червня – початку липня. У зазначений час нами наприкінці червня зі зразків козлятнику східного з симптомами ураження виділено ізолят *Uromyces galegae*, якому присвоєно номер P15. Зразки козлятника мали чисельні засохлі листя. На стеблах і листках були

бурі уредінії, які порошили. Уредоспори бурі розміром 23 – 25 мкм. Найсильніше хвороба проявляється після рясних дощів, поширюється уредоспорами за допомогою повітряних течій. Для розвитку потрібно близько двох–трьох декад, температура 19 – 21°C й висока відносна вологість. Гриб зимує у вигляді телейтоспори (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Иржа козлятнику східного

Бура плямистість (філостикоз). Збудниками є відділ *Ascomycota*, клас *Deuteromycetes*, порядок *Botryosphaeriales*, родина *Botryosphaeriaceae*, рід *Phyllosticta*, вид *Phyllosticta galegae*.

На листках з'являються видовжені плями із коричневою облямівкою та через певний проміжок часу на ураженій поверхні з'являються чорні крапки, що є пікнідами гриба, що розсіяні, поодинокі, плескато-кулястої форми, діаметром близько 150 мкм. Пікноспори циліндричні, еліпсоподібні, звужені з одного кінця, трішки зігнуті або прямі, безбарвні (рис. 5.2).



Рис. 5.2. Бура плямистість (філостикоз) козлятнику східного

Рамуляріоз. Збудниками є відділ *Ascomycota*, клас *Deuteromycetes*, порядок *Hyphomycetales*, родина *Mycosphaerellaceae*, рід *Ramularia*, вид *Ramularia galegae*.

Захворювання має вигляд вохряних або бурих дрібних плям 2–3 см у діаметрі з обох боків листка. За підвищеної вологості плями покриваються конідіальним спороношенням у вигляді рідкого білого нальоту. Конідієносці трохи загнуті з кількома зубчиками на верхівці та зібрані у пучки, що з обох боків листка утворюють білий наліт. Конідії одноклітинні, видовжено-веретеноподібної форми (рис. 5.3).

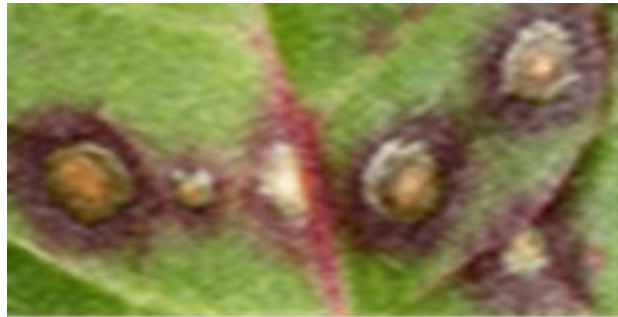


Рис. 5.3. Рамуляріоз козлятнику східного

Розповсюджується збудник конідіями. Проте джерелом потенційної інфекції слугують рослинні рештки. До осені на листках утворюються щільні склероцієподібні строми, в цій стадії гриб зимує.

Церкоспороз. Відділ *Ascomycota*, клас *Deuteromycetes*, порядок *Hyphomycetales*, родина *Mycosphaerellaceae*, рід *Cercospora*, вид *Cercospora galegae*.

Буруваті плями на листі, які згодом білють, з бурою облямівкою. Конідіальне спороношення збудника – світло-димчасті дернинки на поверхні ураженої тканини за підвищеної вологості. Конідієносці горбкуваті, блідо-димчасті, зібрані у пучки. Конідії паличкоподібні, веретеноподібні, зігнуті, на верхівці загострені, з багатьма перегородками, безбарвні (рис.5.4).



Рис. 5.4. Церкоспороз козлятнику східного

Взимку гриб зберігається у вигляді строматичних утворень на яких навесні при підвищеній вологості і за сприятливої температури повітря до 15°C і вище утворюються конідієносці з конідіями. Розповсюджується конідіями на опалому листі.

5.3. Вплив домінуючих фітопатогенних бактерій і грибів козлятнику східного на симбіотичну систему *Rhizobium galegae* – КОЗЛЯТНИК

Козлятник східний – багаторічна трав'яниста рослина з полікарпічним циклом розвитку. Фаза цвітіння настає на другому році життя, але за сприятливих умов поодинокі рослини цвітуть першого року [1, 165, 171, 203].

На ранніх етапах розвитку надземні органи козлятнику ростуть швидше підземних. У цей час рослини вступають у період інтенсивного росту надземних пагонів, у фазі четвертого справжнього листка починають утворюватись бокові пагони, які розташовані в пазухах першого і другого справжніх листків. Зміцнюється коренева система, зростає кількість бульбочкових бактерій. Вони з'являються на 25–30 добу після появи сходів, тобто в період інтенсивного росту рослин. У фазі стеблуння їхня кількість становить 40–55 штук масою 150–200 мг/рослину. Кількість і маса бульбочок залежить від фази розвитку рослин. За оптимальних умов симбіозу ці показники сягають максимуму у фазі бутонізації – початок цвітіння (від 110

до 160 штук масою відповідно від 320 до 450 мг/рослину). У цю фазу проводять скошування травостою. До другого укосу кількість і біомаса бульбочкових бактерій зростає відповідно до 310 і більше штук, 700 – 720 мг [1].

На другий рік вегетації (фаза бутонізації – початок цвітіння) кількість бульбочок збільшується незначно до 330, а біомаса майже удвічі. На третій рік вегетації кількість і біомаса не збільшується, а на четвертий – тенденція до зниження. Отже, дані щодо кількості, біомаси і азотфіксуючого потенціалу бульбочкових бактерій у роботі наведено нами за другий рік вегетації.

Інокуляція насіння *Rh. galegae* Л2 стимулювала ріст надземних і підземних органів. Дані наведено в табл.5.3.

Таблиця 5.3

Вплив інокуляції *Rhizobium galegae* Л2 на ріст рослин козлятнику східного другого року життя, см

Фаза	Довжина коренів		Висота надземних органів	
	контроль – без інокуляції	з інокуляцією	контроль – без інокуляції	з інокуляцією
Повна бутонізація	25,4	33,1	91,0	101,5
Повне цвітіння	46,7	55,9	142,1	163,9
НІР _{0,5}	3,1	1,9	2,8	3,5

Як видно з табл. 5.3 корені інокульованих рослин у фазі повної бутонізації на 7,7 см довші порівняно з контролем, повного цвітіння – на 9,2 см. Висота надземних органів у фазі повної бутонізації на 10,5 см довша порівняно з контролем, повного цвітіння – на 28,1 см. Це пов'язано з тим, що інокульовані рослини мали в 1,5 раза і більше бульбочкових бактерій, які забезпечували живлення рослин екологічно безпечним біологічним азотом і стимулювали ріст кореневої і надземної частин.

Передпосівна інокуляція насіння біологічним препаратом бульбочкових бактерій підвищувала урожайність насіння (табл. 5.4).

Як видно з даних табл. 5.4 кожен квадратний метр посіву інокульованим насінням давав більше врожаю на 32,2 г, або на 52,7% перевищував контроль. Урожай зеленої маси також одержано на 45,3% більше порівняно з контролем. Наші дослідження щодо ефективності інокуляції підтверджують дані інших дослідників [42, 66, 166].

Таблиця 5.4

Вплив передпосівної інокуляції на урожайність зеленої маси та насіння козлятнику східного, г/м²

Варіант	Урожайність насіння, г	Приріст		Урожайність зеленої маси, г	Приріст	
		г	%		г	%
Контроль (сівба не інокульованим насінням)	61,1	–	–	4832	–	–
Сівба інокульованим насінням	93,3	32,2	52,7	7023	2191	45,3
НІР _{0,5}	1,4			5,5		

Основною функцією бобово-ризобіальної системи є процес азотфіксації, тому важливо було з'ясувати вплив бактеріальних й грибних метаболітів на нітрогеназну активність бульбочок. Оскільки фітопатогенна бактерія *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* і фітопатогенний грибок *Uromyces galegae* P15 викликали значне ураження рослин козлятника східного, то вони і були досліджені за впливом на азотфіксуючу активність системи козлятник східний – бульбочкові бактерії.

Фітопатогенну бактерію *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* вирощували на м'ясо пептонному бульйоні (МПБ) протягом 48 годин, фільтрували під вакуумом через фарфоровий фільтр і у фільтраті замочували протягом трьох годин корені козлятника з бульбочками. Аналогічно проводили роботу з

Uromyces galegae P15. Фітопатогенний гриб вирощували на рідкому середовищі Чапека протягом 120 годин (5 діб). Азотфіксуючу активність проводили за методикою, описаною у монографії за редакцією В.В. Волкогона [61].

Встановлено, що фільтрати культуральних рідин *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas* sp. P14 та *Uromyces galegae* P15 негативно впливали на симбіотичну систему козлятник східний – бульбочкові бактерії. При замочуванні бульбочок у культуральних рідинах зазначених фітопатогенних мікроорганізмів значно знижувалась їхня нітрогеназна активність порівняно з контрольним варіантом (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Вплив культуральної рідини фітопатогенних бактерій і грибів на нітрогеназну активність бульбочок козлятнику східного сорту Кавказький бранець

Варіант	Нітрогеназна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /год	
	на 1 рослину	на 1г бульбочок
Контроль (поживне середовище для бактерій – МПБ)	4,45 ± 0,39	5,03 ± 0,43
Контроль (поживне середовище для грибів рідке середовище Чапека)	3,14 ± 0,28	3,57 ± 0,15
Культуральна рідина <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ,	0,09 ± 0,04	відсутня
Культуральна рідина <i>Uromyces galegae</i> P15	0,04 ± 0,01	відсутня

Отже дія фітопатогенних бактерій і грибів на симбіотичний апарат козлятнику східного була негативною, знижуючи до мінімуму нітрогеназну активність рослини, а у бульбочок вона була відсутня.

Вплив *Ps. syringae* pv. *syringae* та *U. galegae* P15 на бобово-ризобіальний симбіоз козлятнику східного сорту Кавказький бранець

вивчали за умов вегетаційного дослідження на сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті, інокульованому колоніями (КУО) бактерій (10^7) та спорами гриба (10^6).

З даних табл. 5.5 видно, що досліджувані фітопатогенні мікроорганізми значно знижують азотфіксуючу активність, а при замочуванні бульбочок у культуральній рідині *Ps. syringae* pv. *syringae* і *U. galegae* P15 азотфіксація взагалі відсутня. Як показали результати вегетаційного дослідження, рослини козлятнику східного, що вирощували за інокуляції насіння *Ps. syringae* pv. *syringae* і *U. galegae* P15, помітно відставали від контрольних.

Як свідчать дані, наведені в табл. 5.6, висота рослин зменшувалась на 31,9 % і більше, надземна маса рослин у перерахунку на суху речовину – на 25,7, а маса кореневої системи – на 24,6 % порівняно з контрольним варіантом.

Таблиця 5.6

Структура урожаю козлятнику східного за інокуляції бульбочковими бактеріями та за дії фітопатогенних мікроорганізмів

Варіант	Висота рослин, см	Кількість, шт.				Маса 1000 насінин, г
		стебел	суцвіть на стеблі	бобів на стеблі	насіння у бобі	
Контроль (інокуляція <i>Rh. Galegae</i> Л2)	131,1	16	8	160	5	8,8
Культуральна рідина <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ,	75	9	4	87	2	5,6
Культуральна рідина <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> + <i>Rh. galegae</i> Л2	89,3	11	5	101	3	6,1
Культуральна рідина <i>Uromyces galegae</i> P15	57,8	8	5	76	3	5,4
Культуральна рідина <i>Uromyces galegae</i> P15 + <i>Rh. galegae</i> Л2	75,4	10	7	81	3	6,0
НІР _{0,5}	3,4					0,5

Інокуляція насіння козлятнику східного активним штамом бульбочкових бактерій *Rh. galegae* Л2 дещо пом'якшувала негативний вплив фітопатогенів на рослини.

Дослідження з визначення біологічної цінності протеїну зеленої маси козлятнику східного нами було ідентифіковано 18 амінокислот.

Показано, що за передпосівного оброблення насіння козлятнику східного *Rh. galegae* Л2 різко зростала кількість глютамінової кислоти, яка є у всіх досліджуваних сортів, але позитивно виділявся сорт Кавказький бранець (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

Амінокислотний склад протеїну зеленої маси різних сортів козлятнику східного за передпосівної інокуляції *Rh. galegae* Л2 та за дії фітопатогенної бактерії *Ps. syringae* pv. *syringae* (фаза стеблуння)

Сорт	Варіант	Глутаміно ва кислота	Аспарагіно ва кислота	Незамінні амінокислот и	Сума амінокисло т
Кавказьки й бранець	контроль без інокуляції	8,9	9,1	153,1	177,3
	Інокуляція <i>Rh. galegae</i> Л2	29,8	23,4	167,7	195,1
	інокуляція <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	4,7	5,2	99,8	147,5
	Інокуляція <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> + <i>Rh. galegae</i> Л2	11,6	10,7	140,6	161,3
Салют	контроль без інокуляції	7,7	8,3	155,5	175,4
	інокуляція <i>Rh. galegae</i> Л2	22,4	21,1	161,0	187,6
	інокуляція <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	3,7	6,9	128,7	139,0
	інокуляція <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> + <i>Rh. galegae</i> Л2	14,2	14,7	119,8	15,4
	<i>syringae</i> pv. <i>syringae</i> + <i>Rh. galegae</i> Л2				

Донецький 90	контроль без інокуляції	8,5	7,6	135,4	151,2
	Інокуляція <i>Rh. galegae</i> Л2	21,2	19,5	165,4	181,3
	інокуляція <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	8,1	7,3	122,0	143,5
	інокуляція <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> + <i>Rh. galegae</i> Л2	13,1	13,9	136,7	161,3

Передпосівна інокуляція насіння козлятнику східного сприяла підвищенню суми амінокислот (особливо сорт Кавказький бранець). У інших досліджуваних сортів спостерігали таку саму закономірність, але у кількісному вираженні вона дещо поступалась сорту Кавказький бранець.

Кількість глютамінової, аспарагінової й суми амінокислот різко зменшувалася за бактеріальної інфекції *Ps. syringae* pv. *syringae*. Особливої уваги заслуговують показники глютамінової кислоти, яка бере участь у азотному циклі і є індикатором у ефективності біологічної фіксації азоту повітря. Передпосівна інокуляція насіння козлятнику східного дещо нівелювала дію фітопатогенної бактерії, проте повне відновлення деяких амінокислот та їх суми не відбувалось.

Висновки до розділу

Шкідники та хвороби – комахи, гриби, бактерії, мікоплазми спричиняють істотну шкоду посівам козлятнику, патогенна дія призводить до зниження приросту зеленої маси козлятнику на 32–42%, а насіння на 15–30% [112, 209].

Нами встановлено, що основним збудником бактеріозу козлятнику, який уражує усі надземні частини рослини, є *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* – поліфаг, що спричинює чорно-коричневі некротичні плями,

тому назва хвороби має такі синоніми: бактеріальна плямистість, чорна плямистість, коричнева дрібна плямистість [209, 211].

Проведено аналіз уражених зразків козлятнику. Виявлено і охарактеризовано ряд штамів фітопатогенних бактерій, які є збудниками бактеріальних хвороб козлятнику східного. Виявлено і охарактеризовано штами *Pseudomonas* sp. За біохімічними показниками виділені ізоляти можуть бути ідентифіковані як *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, що є основним збудником бактеріальних хвороб козлятнику.

Передбачено, що також й інші потенційні збудники бактеріальних хвороб бобових культур – *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, *Pseudomonas syringae* pv. *vignae*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Xanthomonas heterocea*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovora*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Ralstonia solanacearum* та бактерії, які виявлено деякими авторами у поодиноких випадках – *Pseudomonas viridiflava*, *Xanthomonas heterocea*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* [211], можуть уражувати і козлятник східний.

Встановлено, охарактеризовано і проілюстровано найрозповсюдженіші грибні хвороби козлятнику східного, якими виявилися іржа, бура плямистість, рамуляріоз, церкоспороз, хоча козлятник вважають достатньо резистентною рослиною [209].

Показано позитивний вплив інокуляції на ріст рослин козлятнику східного другого року життя: корені інокульованих рослин у фазі повної бутонізації на 7,7 см довші порівняно з контролем, повного цвітіння – на 9,2 см. Висота надземних органів у фазі повної бутонізації на 10,5 см довші порівняно з контролем, повного цвітіння – на 28,1 см. Інокульовані рослини мали в 1,5 раза і більше бульбочкових бактерій. Передпосівна інокуляція насіння біологічним препаратом бульбочкових бактерій також підвищувала урожайність насіння козлятнику на 52,7% щодо контролю. Приріст зеленої

маси був на 45,3% більше порівняно з контролем. Наші дослідження щодо ефективності інокуляції підтверджують дані інших дослідників [42, 66, 166].

Дослідження безпосереднього впливу фільтратів культуральних рідин *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas* sp. P14 та *Uromyces galegae* P15 на симбіотичну систему козлятник східний – бульбочкові бактерії показали, що під їхньою дією знижувалась нітрогеназна активність бульбочок порівняно з контрольним варіантом, а при замочуванні бульбочок у культуральній рідині *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* і *Uromyces galegae* P15 азотфіксація взагалі була відсутня.

Інокуляція насіння козлятнику східного активним штамом бульбочкових бактерій *Rh. galegae* Л2 пом'якшувала негативний вплив фітопатогенів на рослини козлятнику.

У дослідженнях з визначення біологічної цінності протеїну зеленої маси козлятнику східного нами було ідентифіковано 18 амінокислот. Показано, що за передпосівного оброблення насіння козлятнику східного *Rh. galegae* Л2 різко зростала кількість глютамінової кислоти всіх досліджуваних сортів, але найбільше виділявся сорт Кавказький бранець.

Отже, за умов жорсткого інфекційного навантаження знижується ефективність функціонування бобово-ризобіальної системи. Це призводить до пригнічення розвитку рослин, про що свідчить зниження надземної маси козлятнику східного, її якості та маси коренів порівняно з контрольним варіантом.

РОЗДІЛ 6

ЕКОНОМІЧНА ТА ЕНЕРГЕТИЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ
ПЕРЕДПОСІВНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ НАСІННЯ КОЗЛЯТНИКУ ШТАМОМ
***RHIZOBIUM GALEGAE* Л2**

6.1 Економічна ефективність передпосівної інокуляції насіння козлятнику східного штамом *Rhizobium Galegae* Л2

Козлятник східний рекомендується використовувати як корм і сировину для заготівлі сіна, силосу та сінажу для згодовування всім видам сільськогосподарських тварин. Його вирощування, звичайно ж, супроводжується витратами на технологічний процес.

У сучасних умовах при проектуванні технологій оброблення сільськогосподарських культур вирішальне значення має не гонитва за максимальними врожайми, а поєднання високої і стабільної щорічної продуктивності з отриманням доходу та високого рівня рентабельності за низької собівартості продукції [69].

Адже одна з важливих вимог, які пред'являють до сучасних технологій рослинництва, – це економічна і енергетична окупність витрат особливо непоправних ресурсів. І, на жаль, переважною практикою є застосування мінеральних добрив для підвищення продуктивності кормових угідь, що не тільки наносить великої шкоди навколишньому середовищу, а й призводить до зростання собівартості продукції та зниження рівня рентабельності такої господарської діяльності [51, 52].

За умов нестабільної ринкової економіки з постійно мінливими цінами на енергетичні та матеріальні ресурси, інфляційними процесами економічні методи визначення ефективності технологій не завжди можуть бути об'єктивними. Тому в наших дослідженнях економічну оцінку ефективності інокуляції насіння різними штамми бульбочкових бактерій визначено складанням технологічних карт для обчислення сукупних витрат по

технології із урахуванням виходу повітряно-сухої речовини з одиниці площі, що є еквівалентом потенційної урожайності сіна за стандартної вологості 17%. Для обчислення показників економічної ефективності ми керувались існуючими розцінками тарифної сітки для виконання технологічних операцій та цінами на матеріальні ресурси станом на 01.01.2014 р.

Сіно з козлятнику цінне не тільки завдяки тому, що козлятник східний рано формує перший укіс, а й тому, що має високий вміст протеїну [15, 164, 169] і може використовуватись як один із основних видів кормів у зимовий період. А відтак це сіно користується попитом і є ринковим товаром. Сільськогосподарські товаровиробники продають його іншим підприємствам, фермерам та населенню. Станом на 01.01.2014 р. вартість 1 т сіна багаторічних бобових трав I класу становила 1000 грн., II – 800 грн.

Для оцінювання ефективності досліджуваних нами моделей передпосівної інокуляції насіння козлятнику різними штамми бульбочкових бактерій ми користувались такими показниками: урожайність зеленої маси, вихід сухої і повітряно-сухої речовини, вартість і собівартість вирощеної продукції, умовно-чистий прибуток, окупність витрат та рівень рентабельності [44, 113, 115].

Дослідженнями встановлено, що значення отриманих показників економічної ефективності вирощування козлятнику східного варіювали залежно від штаму, який ми застосовували для інокуляції насіння (табл. 6.1). Вартість продукції обчислювали на основі визначення класу сіна, відповідно до чинного стандарту [59].

Найбільші виробничі витрати на вирощування козлятнику східного показано у варіанті з інокуляцією насіння штамом *Rhizobium Galegae* Л2, які в сумі за 2012 – 2014 рр. становили 9308,1 грн./га (табл. 6.1). Відповідно, у варіанті з обробленням цим штамом був і найвищий показник вартості вирощеної продукції – 20300,6 грн./га.

Найменша ж вартість отриманої продукції, як не дивно, була у контрольному варіанті – 16478,0 грн./га, в якому виробничі витрати

становили 8953,8 грн./га. Різниця виробничих витрат між варіантом з інокуляцією насіння штамом *Rhizobium galegae* Л2 і контролем становила всього 354,3 грн./га. Тобто, за цього незначного підвищення витрат значно зростають показники економічної ефективності створення і використання агрофітоценозу козлятнику східного.

Таблиця 6.1

Економічна ефективність створення і використання агрофітоценозу козлятнику східного залежно від оброблення насіння різними штамми бульбочкових бактерій, 2012–2014 рр.

Варіант, штам	Урожайність зеленої маси, т/га	Вихід сухої речовини, т/га	Вихід повітряно-сухої речовини, (сіно), т/га	Виробничі витрати, грн./га	Вартість вирощеної продукції, грн./га	Умовно-чистий прибуток грн./га	Окупність 1 грн. витрат, грн.	Собівартість 1 т повітряно-сухої речовини, грн.	Рівень рентабельності, %
Контроль (без інокуляції)	68,1	14,6	17,3	8953,8	16478,0	7524,2	1,8	516,2	84,0
<i>Rh. galegae</i> 0703	75,6	16,2	19,3	9137,9	18344,0	9206,1	2,0	473,2	100,7
<i>Rh. galegae</i> 159	77,4	16,5	19,6	9164,4	18649,4	9485,0	2,0	466,8	103,5
<i>Rh. galegae</i> Л2	82,3	18,0	21,4	9308,1	20300,6	10992,5	2,2	435,6	118,1

Так за істотного приросту урожаю (на 14,2 т/га) відбувається незначне збільшення витрат із розрахунку на 1 га посіву, пов'язаних із застосуванням штаму *Rhizobium galegae* Л2. У результаті вагомо знизилась собівартість продукції – на 80,6 грн./га, а це показник, який характеризує відношення виробничих витрат до обсягів отриманої продукції. Зменшення його номінального значення характеризує ресурсозбереження технологічних прийомів виробництва продукції з кормового поля. У наших дослідках

встановлено, що у варіанті із застосуванням передпосівної інокуляції насіння штамом *Rhizobium galegae* Л2 найменшою була собівартість 1 т повітряно-сухої речовини козлятнику східного і становила 435,6 грн./т.

Умовно-чистий прибуток визначається як різниця між вартістю одержаного врожаю та виробничими витратами на його вирощування [113].

Найважливішим показником, що характеризує економічну доцільність будь-якого виробництва, є рівень рентабельності [51, 52, 60, 113, 115]. Використання штаму *Rh. galegae* Л2 сприяло зростанню прибутковості виробництва. Адже розмір умовно чистого прибутку із розрахунку на 1 га посіву становив 10 992,5 грн., що на 1507,5 грн. більше ніж варіант зі штамом-еталоном, і на 3468,3 більше порівняно з контрольним варіантом.

Аналіз рівня рентабельності вирощування козлятнику східного у нашому досліді засвідчив доцільність усіх досліджуваних варіантів окрім контрольного. Нами встановлено, що вирощування козлятнику східного із застосуванням передпосівної інокуляції насіння штамом *Rhizobium galegae* Л2, економічно вигідніше, оскільки рівень рентабельності сягає 118,1%, тобто на 34,1 % більше порівняно з контролем і на 14,6% порівняно з варіантом застосування штаму-еталону 153.

Хоча козлятник східний є доволі продуктивною кормовою культурою, до того ж прибутковою, нині площі його вирощування, на жаль, зростають повільно. Він так і залишається малопоширеною культурою на сільськогосподарських полях України [191]. Чи не найважливішою причиною цього є потреба у відносно великих капіталовкладеннях у рік створення травостоїв, адже основна частка виробничих витрат на технологічний процес вирощування козлятнику східного припадає на перший рік. Це заходи післяпосівного обробітку ґрунту та догляду за посівами на початкових етапах розвитку, а також на збирання першого урожаю. Виробничі витрати наступних років припадають лише на догляд за посівами та процеси збирання урожаю.

Із зазначеного можна зробити висновок, що застосування передпосівної інокуляції насіння козлятнику східного штамом *Rhizobium galegae* Л2 є не тільки економічно надійним заходом, а й сприяє значному зростанню урожайності без використання мінеральних добрив і затрат ресурсів, що досить важливо за сучасних тенденцій вирощування кормових культур.

6.2 Енергетичне оцінювання технологій вирощування козлятнику східного за передпосівної інокуляції насіння штамом *Rhizobium galegae* Л2

Сучасні технології виробництва сільськогосподарських культур вимагають збільшення витрат пального, електроенергії, добрив, пестицидів та інших ресурсів. Нині необхідним є визначення енергії врожаю сільськогосподарських культур, загальних затрат енергії виробництва продукції рослинництва та проведення біоенергетичного оцінювання технологій [26, 113, 115].

Тому необхідним є визначення енергії врожаю сільськогосподарських культур, загальних затрат енергії виробництва продукції рослинництва та проведення біоенергетичного оцінювання технологій [113, 115]. Енергетичне оцінювання показує всі складники сільськогосподарського виробництва в єдиних постійних величинах у певному проміжку часу, а не грошові показники, які постійно змінюються під впливом інфляції, політичної ситуації тощо. Розуміння біоенергетичної суті виробництва продовольства, кількісне обрахування й аналіз процесів перетворення вільної енергії в агроecosистемах сприяють визначенню перспективних напрямів розвитку агротехнологій [110, 113, 119].

Ми досліджували напрями розвитку двох моделей технологій вирощування козлятнику східного, перша - однотипова - без інокуляції та друга – трьохтипова - за інокуляції штамми бульбочкових бактерій, що відрізнялися активністю до створення симбіотичної системи *Rhizobium*

galegae – козлятник. Друга модель першого типу - інокуляція штамом 0703, другого типу - штамом 159 та третього - новим перспективним штамом *Rhizobium galegae* Л2.

Оскільки ми проводили енергетичне оцінювання процесу виготовлення сіна з козлятнику східного, а це агроенергетичне оцінювання виробництва кормів, де використовують універсальний енергетичний показник – відношення акумульованої в продукції до витраченої на її отримання енергії [110, 113].

Застосування цього методу дає можливість у будь-яких економічних умовах найточніше вирахувати і водночас виразити не тільки прямі витрати енергії на технологію, але й енергію, втілену в засобах виробництва і виробничій продукції. Проведений на цій основі аналіз дає змогу оцінити ефективність виробництва кормів і порівняти різні технології через призму витрат енергії – найважливішого виду ресурсів, і, найголовніше, мати змогу визначити шляхи її економії [51, 52, 113].

У дослідженнях прямі і непрямі витрати енергії на вирощування козлятнику східного ми визначали на основі складених технологічних карт, типових норм виробітку, витрат пального, енергетичних еквівалентів використання сільськогосподарської техніки та трудових і матеріальних ресурсів.

Нами визначено, що за 2012–2014 рр. сукупні енерговитрати за варіантами дослідів становили 41,1 – 41,4 ГДж/га (табл. 6.2).

Тобто витрати сукупної енергії на вирощування козлятнику східного на фоні місцевої популяції становили 41,1 ГДж/га, а з використанням моделі технології вирощування козлятнику східного, що включає оброблення штамом *Rhizobium galegae* Л2, витрати сукупної енергії збільшились, що пов'язано з додатковими витратами енергії на основні, оборотні засоби та трудові ресурси при збиранні додаткового урожаю зеленої маси – 14,2 т/га, його транспортуванні й сушінні становили 41,4 ГДж/га.

Вихід валової та обмінної енергії збільшувався у варіантах досліду, залежно від додаткових енергозатрат на виробництво. Тобто, вихід валової енергії становив 265,3 – 329,2, обмінної – 147,2 – 182,9 ГДж/га.

Таблиця 6.2

Енергетична ефективність створення і використання агрофітоценозу козлятнику східного залежно від оброблення насіння різними штамми бульбочкових бактерій, 2012–2014 рр.

Варіант, штами	Сукупні затрати енергії за технологією, ГДж/га	Вихід валової енергії, ГДж/га	Вихід обмінної енергії, ГДж/га	Затрати на виробництво 1 ГДж валової енергії, ГДж	Затрати на виробництво 1 ГДж обмінної енергії, ГДж	Енергетичний коефіцієнт	Коефіцієнт енергетичної ефективності
Контроль (без інокуляції)	41,1	265,3	147,2	0,15	0,28	6,46	3,58
<i>Rh. galegae</i> 0703	41,3	297,5	165,2	0,14	0,25	7,20	4,00
<i>Rh. galegae</i> 159	41,3	302,4	168,0	0,14	0,25	7,32	4,07
<i>Rh. galegae</i> Л2	41,4	329,2	182,9	0,13	0,23	7,95	4,42

Найбільший вихід валової та обмінної енергії (329,2 і 182,9 ГДж/га відповідно) відмічено у варіанті, де було затрачено найбільшу кількість енергоресурсів із застосуванням передпосівного оброблення насіння новим штамом *Rhizobium galegae* Л2.

Собівартість 1 ГДж виробленої продукції визначається відношенням затраченої енергії до отриманої з урожаєм, тобто цей показник вказує, скільки було затрачено енергоресурсів на виробництво одиниці продукції [113, 119]. Так, найбільш енергозатратним було вирощування козлятнику

східного у контрольному варіанті, де собівартість становила 0,15 ГДж на отримання 1 ГДж валової енергії і відповідно 0,28 ГДж для обмінної енергії. Проте, збільшуючись, показник виходу енергії з отриманим урожаєм сприяв здешевленню виробленої продукції в еквіваленті валової та обмінної енергії, відповідно до 0,13 і 0,23 ГДж.

Накопичення енергії в урожаї козлятнику східного під впливом інокуляції у всіх варіантах перевищує витрати енергії на її застосування. Що підтверджено показниками енергетичного коефіцієнта та коефіцієнта енергетичної ефективності, які становили 6,46 і 3,58 відповідно у контролі, збільшуючись до 7,95 і 4,42 у варіанті із застосуванням штаму *Rh.galegae* Л2. Отримані результати свідчать про високу енергетичну ефективність насіння за передпосівної інокуляції козлятнику східного, що вивчали у досліді.

Згідно з отриманими експериментальними даними енергетичного оцінювання ефективності передпосівної інокуляції насіння козлятнику східного підібраними штамми, проведено розрахунки з визначення напрямку розвитку досліджуваних моделей [44]. Напрямок розвитку технології можна оцінити залежністю: $K_{ET} = 1/E_T$, де K_{ET} – енергетичний коефіцієнт, E_T – обернена сума енерговитрат за технологією. За оцінювання напрямку розвитку досліджуваних моделей технології вирощування козлятнику східного на кормові цілі встановлено, що відсутність інокуляції у контрольному варіанті, означає екстенсивно-інтенсивний напрям розвитку технології (менший енергетичний коефіцієнт при менших енергетичних витратах). Друга трьохтипна модель вирощування козлятнику східного має інтенсивно-екстенсивний напрям розвитку. Причому найперспективнішою виявилася інтенсивно-екстенсивна модель технології вирощування козлятнику східного третього типу (4 варіант досліді), яка є також і енергетично найефективніша, попри найбільшу енергоємність. Ця модель технології передбачає застосування передпосівної інокуляції насіння новим запропонованим нами штамом *Rhizobium galegae* Л2.

Висновки до розділу

Застосування штаму *Rhizobium galegae* Л2 для передпосівної інокуляції насіння козлятнику східного сприяє підвищенню енергетичної та економічної ефективності виробництва, зростанню урожайності без використання мінеральних добрив і затрат ресурсів. Це дає змогу знизити собівартість продукції на 80,6 грн., збільшити рентабельність на 34,1 % порівняно з контролем і на 14,6% порівняно із застосуванням штаму-еталону 153 та підвищити енергетичний коефіцієнт виробництва на 1,46 %.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Нами було проведено польові дослідження на сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті на спільному дослідному полі Вінницького національного аграрного університету і Вінницької державної сільськогосподарської дослідної станції Інституту кормів та сільського господарства НААНУ у с. Агрономічне Вінницького району за 7 км на південь від м. Вінниця, з метою визначення особливостей функціонування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник під впливом фітопатогенних мікроорганізмів. Адже повне розуміння всіх процесів, які відбуваються в цій системі, дасть змогу не тільки уникнути ускладнень, але й значно покращити її функціонування.

Для дослідження були обрані сорти козлятнику східного Салют, Донецький 90 і Кавказький бранець.

Взагалі, козлятник східний є надзвичайно перспективною культурою для вирощування в сільському господарстві. На його цінність вже давно звернули увагу багато науковців: О.О. Абрамов, І.В. Артемов, В.В. Бадмаєв, В.В. Баранова, В.П. Заболотна, В.А. Кубарев та багатьох інших [1–3, 12, 15, 19, 65, 96]. Вона полягає у здатності до багаторічного зростання, резистентності до мінливих кліматичних умов, високому вмісту білка, вітамінів, поживних речовин, амінокислот, а особливо в здатності фіксувати біологічний азот у великих кількостях [66, 78, 99, 107, 169]. І все це за невисоких матеріальних затрат на вирощування зазначеної культури. Але, на жаль, козлятник східний залишається не популярним у господарствах Вінницької області і України в цілому [191] через складнощі першого року вирощування цієї культури і, мабуть, не до кінця обізнаності як з ними боротися, щоб отримати гарний урожай, який залежить, насамперед, від здатності козлятнику вступати у симбіоз з бульбочковими бактеріями. Адже ефективне функціонування бобово-ризобіального симбіозу забезпечує рослини доступним азотом, сприяє їх росту і розвитку [114], а головне –

покращує екологічний стан екосистеми України завдяки збагаченню ґрунту біологічним азотом, який засвоюється з атмосфери бульбочковими бактеріями у симбіозі з козлятником, нагромаджуючи його в орному шарі за вегетаційний період 300 кг/га і більше [12]. Проте слід пам'ятати, що на формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу постійно впливають абіотичні, біотичні, та антропогенні фактори зовнішнього середовища. Серед біотичних особливу роль відіграють ґрунтові мікроорганізми, зокрема, фітопатогенні гриби, бактерії, які є збудниками хвороб козлятнику, здатні нагромаджуватись у ґрунті та спричиняти пригнічення росту рослин і зниження урожайності сільськогосподарських культур [21, 27, 45-134], і які до цього часу недостатньо вивчені. Вітчизняні вчені С.П. Надкерничний, В.П. Патика, Р.І. Гвоздяк, Л.А. Пасічник, В.В. Волкогон, О.В. Надкернична, О.Н. Космініна, Т.В. Аристовська, О.А. Берестецкий присвятили багато праць дослідженню впливу фітопатогенних мікроорганізмів на симбіоз бобових рослин з бульбочковими бактеріями [11, 21, 45, 61, 67, 85, 134]. В.П. Заболотною досліджено значення козлятнику східного у симбіотичній фіксації азоту та підвищенні вмісту білка [64]. Значний внесок у дослідження біологічної азотфіксації зробили вчені С.Я.Коць, В.В. Моргун, В.П.Патика, Н.Н.Мельникова [87–93]. На жаль, саме фітопатогени посівів козлятнику досліджено мало. Зрозуміло, що дія кожного з перелічених факторів навколишнього середовища, такого як температура ґрунту, повітря, застосування добрив, має вагомий вплив на роботу бобово-ризобіального апарату, але найголовнішим, на нашу думку, є все ж таки вплив мікробіоти, яка заселяє ґрунт і може бути фітопатогенною. Дуже багато наукових праць присвячено також застосуванню мінеральних добрив під бобові культури, особливо азотних, а також мікродобрив С.А. Васильченко, Л.Ф. Васюк, С.М. Алісова, А.І. Чундерова та ін. [7, 34, 36, 37, 49, 74, 81, 106]. Наприклад С.Я. Коцем досліджено фізіологію симбіозу та азотне живлення люцерни [92], де розглянуто доцільність внесення азотних добрив під бобові. І якщо думка вчених щодо потреби застосування добрив є

неоднозначною, то застосування передпосівної інокуляції біопрепаратами на основі висококонкурентних штамів бульбочкових бактерій насіння як козлятнику, так і всіх бобових рослин є обов'язковою умовою для високоефективного функціонування бобово-ризобіального симбіозу і отримання гарного врожаю [28, 36, 40, 62, 63, 65, 83, 91]. Створення таких препаратів потребує ретельного виділення та добору ефективних штамів бульбочкових бактерій [46, 47].

Спеціально для інокуляції насіння козлятнику східного було винайдено еталонний штам *Rhizobium galegae* МС-1 №159 української селекції [143] і еталонний виробничий штам *Rhizobium galegae* СІАМ 0703 (зберігається у Колекції культур бульбочкових бактерій ВНДІСГМ РАН, які ми використовували у своїх дослідженнях. Нами в результаті пошуку, виділення та ідентифікування отримано високоактивний і конкурентоздатний штам *Rhizobium galegae* Л2 для підвищення урожайності козлятнику східного, який за високої насиченості ґрунту аборигенними бульбочковими бактеріями формує ефективний симбіотичний апарат із сортом козлятнику східного Кавказький бранець [144].

Зазначений штам у симбіозі з рослиною активно фіксує молекулярний азот, його використання в якості мікросимбіонтів для сорту козлятнику східного Кавказький бранець штамів *Rh. galegae* 0703, 159 і Л2 сприяло істотному і достовірному збільшенню вмісту сирого протеїну і азоту в зеленій масі козлятнику. Оброблення зазначеним штамом забезпечило вміст сирого протеїну – 29,79 і азоту – 3,00%.

На штам *Rhizobium galegae* Л2 одержано патент України [144]. Штам *Rhizobium galegae* №Л2 зберігається в колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України (Київ) під № Л2.

Досліджуючи мікробіоценоз ризосфери козлятнику східного, ми визначили, що біомаса бактерій за застосування мінеральних добрив збільшувалася порівняно з варіантом без добрив у понад 1,42 раза, за застосування ризобіофіту і сумісному застосуванні з $N_{60}P_{60}K_{60}$ – 1,84 і 1,78

раза відповідно. Чисельність олігонітрофільних бактерій, що беруть участь у трансформуванні рештків органічної речовини збільшувалася в 1,56 раза, а стрептоміцетів – у 2,9 раза. Варіант з ризобіофітом і сумісно з мінеральним удобренням характеризувався максимальним вмістом целюлозоруйнівних мікроорганізмів у 8,5 і 8,7 раза вищим, порівняно з контролем. Вміст мікроскопічних грибів мав тенденцію до збільшення порівняно з контролем до мінерального фону і до варіантів із застосуванням ризобіофіту. Дослідження амоніфікуючої та нітрифікуючої здатності ґрунту при вирощуванні козлятнику східного показали, що використання ризобіофіту позитивно впливає на цей показник. ґрунту Порівняно з контролем амоніфікуюча здатність зросла на 158 мг $\text{NH}_3/100$ г ґрунту, а нітрифікуюча – на 24 мг $\text{NO}_3/100$ г ґрунту.

Результати досліджень показали, що застосування ризобіофіту за вирощування козлятнику східного сприяє збільшенню виділення CO_2 у 2 рази порівняно з контролем. Такі самі закономірності спостерігали і за визначення поглинання O_2 .

У ризосфері не виявлено шести видів неспоруютьовуючих бактерій, що зустрічалися у ризосферному ґрунті при внесенні органічних добрив, а саме: *Arhtrobacter oxydans*, *Arhtrobacter ureafaciens*, *Nocardia albicans*, *Pseudomonas rathonis*, *Serratia plymuthica*. А у варіантах з ризобіофітом зростала частота трапляння і частка *B. subtilis* і *B. megaterium*. Приріст урожаю козлятнику східного у варіанта з ризобіофітом порівняно з варіантом без інокуляції становив для сорту Кавказький бранець 14,2 т/га, сортів Салют – 8,8 і Донецький 90 – 11,5 т/га відповідно.

Вивчення видового складу бактерій показало, що здебільшого ті самі види зустрічались при вирощуванні козлятнику східного без добрив. При вирощуванні сільськогосподарських культур з використанням ризобіофіту у ґрунті складаються сприятливіші умови для життєдіяльності мікроорганізмів, у результаті чого підвищується його біологічна активність.

Різноманітні шкідники та збудники хвороб рослин, зокрема гриби, бактерії, можуть завдавати істотної шкоди посівам козлятнику. Якщо не вживати заходів за появи перших ознак хвороб, їх патогенна дія спричиняє

істотне зниження приросту зеленої маси козлятнику на 32–42%, а урожайності насіння на 15–30% [153, 209].

Нами встановлено, що основним збудником бактеріозу козлятнику, який уражує усі надземні частини рослини, є *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* – поліфаг, що спричинює чорно-коричневі некротичні плями, тому назва хвороби має такі синоніми: бактеріальна плямистість, чорна плямистість, коричнева дрібна плямистість [45, 48, 187, 209].

Проведено бактеріологічний аналіз уражених зразків козлятнику. Виявлено і охарактеризовано штами *Pseudomonas* sp. За біохімічними показниками виділені ізоляти можуть бути ідентифіковані як *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Охарактеризовано також й інші потенційні збудники бактеріальних хвороб бобових культур, які можуть уражувати і козлятник східний.

Нами також встановлено, що найрозповсюдженішими грибними хворобами козлятнику східного є іржа, бура плямистість, рамуляріоз, церкоспороз, це при тому, що козлятник вважають достатньо резистентною рослиною [45, 67, 112, 211]. Ці хвороби нами охарактеризовано і проілюстровано.

Показано позитивний вплив інокуляції штамом *Rhizobium galegae* Л2 на ріст рослин козлятнику східного другого року життя: корені інокульованих рослин у фазі повної бутонізації на 7,7 см, повного цвітіння – на 9,2 см довші порівняно з контролем. Висота надземних органів у фазі повної бутонізації на 10,5, повного цвітіння – на 28,1 см довші порівняно з контролем. Адже інокульовані рослини мали в 1,5 раза і більше бульбочкових бактерій. Передпосівна інокуляція насіння біологічним препаратом бульбочкових бактерій також підвищувала урожайність насіння козлятнику на 52,7% щодо контролю. Урожай зеленої маси також одержано на 45,3% більше порівняно з контролем.

Дослідження безпосереднього впливу фільтратів культуральних рідин *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas* sp. P14 та *Uromyces galegae* P15 на симбіотичну систему козлятник східний – бульбочкові бактерії показали, що під їхньою дією знижувалась нітрогеназна активність

бульбочок порівняно з контрольним варіантом, а при замочуванні бульбочок у культуральній рідині *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* і *Uromyces galegae* P15 азотфіксація взагалі була відсутня.

Інокуляція насіння козлятнику східного активним штамом бульбочкових бактерій *Rh. galegae* Л2 пом'якшувала негативний вплив фітопатогенів на рослини козлятнику.

У дослідженнях з визначення біологічної цінності протеїну зеленої маси козлятнику східного нами було ідентифіковано 18 амінокислот. Показано, що за передпосівного оброблення насіння козлятнику східного *Rh. galegae* Л2 різко зростала кількість глютамінової кислоти всіх досліджуваних сортів, але найбільше виділявся сорт Кавказький бранець.

Отже, за умов жорсткого інфекційного навантаження знижується ефективність функціонування бобово-ризобіальної системи. Це призводить до пригнічення розвитку рослин, про що свідчить зниження надземної маси козлятнику східного, її якості та маси коренів порівняно з контрольним варіантом.

Також нами проведено економічне та біоенергетичне оцінювання доцільності застосування штаму *Rhizobium galegae* Л2 для передпосівної інокуляції насіння козлятнику східного. Виявлено, що цей штам сприяє підвищенню енергетичної та економічної ефективності виробництва, зростанню урожайності без використання мінеральних добрив і затрат ресурсів, адже дає змогу знизити собівартість продукції на 80,6 грн., збільшити рентабельність на 34,1% порівняно з контролем і на 14,6% порівняно із застосуванням штаму-еталону 153 та підвищити енергетичний коефіцієнт виробництва на 1,46 %.

З огляду на результати наших досліджень, ми впевнено рекомендуємо аграрному виробництву вирощувати козлятник східний сорту Кавказький бранець з попередньою інокуляцією насіння новим активним штамом бульбочкових бактерій *Rh. galegae* Л2, який не тільки забезпечить високий урожай, а й послабить негативний вплив фітопатогенів на рослини козлятнику.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та експериментально розв'язано наукову проблему з ефективності симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник за дії біотичних факторів, зокрема фітопатогенних бактерій і грибів.

1. Виділено та ідентифіковано високоактивний і конкурентоспроможний штам *Rhizobium galegae* Л2 для підвищення урожайності козлятнику східного, який формує ефективний симбіотичний апарат із сортом Кавказький бранець.

2. Встановлено, що штам *Rhizobium galegae* Л2 сприяв не тільки підвищенню приросту зеленої маси козлятнику східного сорту Кавказький бранець, а й підвищував її якість. Так, передпосівне оброблення насіння козлятнику цим штамом забезпечило вміст в зеленій масі сирого протеїну – 29,79, азоту – 3,00%, а у контролі 20,32 і 1,95% відповідно, а також сприяло різкому збільшенню глютамінової кислоти та деяких інших амінокислот.

3. Показано, що передпосівне оброблення насіння козлятнику східного *Rhizobium galegae* Л2 підвищувало у ризосфері ґрунту біомасу бактерій порівняно з варіантом без інокуляції в 1,84 раза, чисельність олігонітрофільних бактерій, що беруть участь у трансформуванні рештків органічної речовини в 1,56, стрептоміцетів – у 2,9, целюлозоруйнівних мікроорганізмів у 8,5 раза. Зазначені дані свідчать про позитивний вплив *Rhizobium galegae* Л2 на процеси формування мікробного оточення, що сприяє ефективній взаємодії козлятнику східного з асоціативними мікроорганізмами.

4. Виявлено, що використання біопрепарату на основі *Rhizobium galegae* Л2 позитивно вплинуло на амоніфікуючу та нітрифікуючу здатність ґрунту: амоніфікуюча порівняно з контролем зросла на 158 мг $\text{NH}_3/100$ г ґрунту, а нітрифікуюча – на 24 мг $\text{NO}_3/100$ г ґрунту. Вирощування

козлятнику східного з використанням ризобіофіту сприяє збільшенню виділення CO₂ та поглинання O₂ в 2 рази порівняно з контролем.

5. Встановлено, що домінуючим фітопатогенним мікроорганізмом – збудником хвороб козлятнику бактеріальної природи, що уражує всі надземні частини рослини виявився *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, тоді як серед ідентифікованих фітопатогенних грибів переважали збудники: іржі (*Uromyces galegae*), бурої плямистості (*Phyllosticta galegae*), рамуляріозу (*Ramularia galegae*) та церкоспорозу (*Cercospora galegae*).

6. Досліджувані фітопатогенні мікроорганізми значно знижували азотфіксуючу активність, а при замочуванні бульбочок у культуральній рідині *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* і *Uromyces galegae* P15 азотфіксація була відсутня.

7. Встановлено, що інокуляція насіння козлятнику східного штамом *Rhizobium galegae* Л2 підвищує резистентність рослин до збудників бактеріальних і грибних хвороб. Так, висота рослин при інокуляції збільшувалась на 31,9% і більше, надземна маса рослин у перерахунку на суху речовину – на 25,7, а маса кореневої системи – на 24,6 % порівняно з ураженими рослинами.

8. Передпосівна інокуляція насіння козлятнику східного штамом *Rhizobium galegae* Л2 сприяє підвищенню енергетичної та економічної ефективності виробництва, зростанню урожайності без використання мінеральних добрив і затрат ресурсів, дає можливість збільшити рентабельність на 34,1 % порівняно з контролем і на 14,6% – порівняно із варіантом застосування штаму-еталону 153 та підвищити енергетичний коефіцієнт виробництва на 1,46 %.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Штам *Rhizobium galegae* Л2 рекомендовано сільськогосподарському виробництву як біоагент препарату ризобофіт для підвищення урожайності козлятнику східного. За даними польових дослідів інокуляція насіння козлятнику сорту Кавказький бранець штамом *Rhizobium galegae* Л2 сприяла підвищенню урожайності на 14,2 т/га, тобто на 20,8 % порівняно з контролем, та зниженню розповсюдження корневих гнилей на 50 % і більше порівняно з варіантом без інокуляції. Результати виробничих впроваджень показали, що застосування ризобофіту, виготовленого на основі *Rh. galegae* Л2 для передпосівного оброблення насіння, забезпечує приріст урожаю козлятнику східного сорту Кавказький бранець 14 – 30 %, порівняно з варіантом без інокуляції.

Аграрному виробництву, науковим і освітнім закладам рекомендовано методичні рекомендації: «Хвороби козлятнику східного: моніторинг, діагностика, профілактика» (Вінниця, 2016) для захисту козлятнику східного від фітопатогенних мікроорганізмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абрамов О.О. Козлятник – від інтродукції до використання / Абрамов О.О. – К.: Наук. думка, 1996. – 139 с.
2. Абрамов О.О. Вплив інокуляції насіння козлятнику східного на ріст і розвиток рослин в лісостепу України / О.О. Абрамов // Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН. – 1999. – № 4. – С. 35–37.
3. Абрамов О.О. Особливості онтогенезу *Galega orientalis Lam.* у зв'язку з інтродукцією в лісостепу України / О.О. Абрамов, Н.О. Стаднічук // Наукові записки Терноп. держ. пед. ун-ту. Серія Біологія. – 1999. – № 3 (6). – С– 3–9.
4. Аветисян А.Т. Продуктивность бобовых многолетних трав и галеги восточной в Красноярской лесостепи / А.Т. Аветисян // Вестн. КрасГАУ. – 2011. – № 7. – С. 81–85.
5. Азаров Б.Ф. Симбиотический азот в земледелии Центральночерноземной зоны Российской Федерации: автореф. дис. на соискание науч. степени доктора с.-х. наук: спец. 06.01.04 «Агрохімія» / Б.Ф. Азаров. – М., 1995.–56 с.
6. Азаров Б. Ф. Вклад симбиотического азота бобовых в плодородие почв центрального черноземья / Б.Ф.Азаров, П.Г. Акулов, В.Б. Азаров, В.Д. Соловиченко // Достижения науки и техники в АПК. – 2008. – № 9. – С. 9–11.
7. Алисова С.М. Влияние минерального азота на ацетиленвосстанавливающую активность клубеньков гороха / С.М. Алисова, А.И. Чундерова, В.П. Орлова // Тр. ВНИИСХМБ. – 1987. – 47. – С. 31–37.
8. Анспок П.И. Микроудобрения / Анспок П.И. – Л.: Колос, 1978. – 272 с.

9. Антипчук А.Ф. Экологические аспекты селекции ризобий и повышение эффективности симбиоза / А.Ф. Антипчук // Физиология и биохимия культ., растений. – 1994–26, №4.–С. 315–333.
10. Антитук А.Ф. Использование различных показателей при оценке эффективности клубеньковых бактерий / А.Ф.Антитук, В.Н. Маргелова, Н.И. Скочинская [и др.] // Микробиол. журн. – 1985. – 47, № 4. – С. 89–90.
11. Аристовская Т.В. Теоретические аспекты проблемы численности, биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов / Т.В. Аристовская // Вопросы численности, биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов. – Л.: 1972. – С.7–20.
12. Артемов И.В. Козлятник восточный в Центральнoчерноземной зоне / И.В. Артемов, В.М. Первушин, Т.Г. Белоножкина // Кормoпроизводство. – 1994. – № 4. – С. 7–12.
13. Атлас Винницкой области / [наук, редкол.: Г.И. Ройченко, Е.Т. Волошин, П.М. Сливка. – М.: ГУГК СССР, 1987. – 32 с.
14. Бабурина О.К. Солеустойчивость дикорастущих видов люцерны и содержание четвертичных соединений аммония / О.К. Бабурина, Н.И. Шевякова // Физиология растений. – 1987. – № 5. – С. 887–893.
15. Бадмаев В.В. Использование сена из козлятника восточного в рационах баранчиков на откорме: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. с.-х. наук: 06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»/ Бадмаев Виктор Владимирович. – п. Дубровицы, Московской обл., 2004. – 23 с.
16. Баев А.А. Биологическая фиксация азота и генетическая инженерия / А.А. Баев, К.М. Злотников. // Биотехнология. – М.: Наука, 1984. – С. 217–223.
17. Базилинская М.В. Использование биологического азота в земледелии (обзорная информация) / Базилинская М.В. – М.: 1985. – 56 с.
18. Базилинская М.В. Ассоциативная азотфиксация злаковыми культурами / Базилинская М.В. – М.: ВНИИТЭСХ, 1988. – 44 с.

19. Баранова В.В. Галега восточная – перспективная культура Кузнецкой котловины / В.В. Баранова // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 3. – С. 79–81.
20. Барвінченко В.І. Грунти Вінницької області / В.І. Барвінченко, Г.М. Заболотний. – Вінниця: ВДАУ, 2004. – 45 с.
21. Берестецкий О.А. Образование фитотоксических веществ микроскопическими грибами в почве и их экологическое значение / О.А. Берестецкий, С.П. Надкерничный, В.П. Патыка // Микробиологический журнал. – 1979. – Т. 41, № 5.– С. 498 – 503.
22. Берестецкий О.А. Факторы, определяющие эффективность азотфиксации / О.А. Берестецкий // Биологическая фиксация молекулярного азота: Материалы VI Бах. Коллоквиума. – Киев: Наук.думка, 1983.–С. 19–26
23. Берестецкий О.А. Эффективность препаратов клубеньковых бактерий в географической сети опытов / О.А. Берестецкий, Л.М. Доросинский, А.П. Кожемяков // Изв. АН СССР. Сер. Биология. – 1987. – № 5. – С. 670–679.
24. Бикбулатов З.Г. Корма из козлятника в рационах коров / З.Г. Бикбулатов, Ф.А. Зайнутдинов, Б.Г. Шарифьянов // Кормопроизводство. – 1997, № 7. – С. 28–31.
25. Билай В.И. Основы общей микологии: Учебн. пособ. – К.: Вища шк., 1980.– 360 с.
26. Біоенергетична ефективність вирощування багаторічних бобових трав / В.Т. Маткевич, В.В. Савранчук, С.Т. Андрощук, [та ін.] // Корми і кормовиробництво. –2006. –Вип. 57. – С. 95–98.
27. Біотехнологія ризосфери овочевих рослин: [монографія] / [Патика В.П., Мельничук Т.М., Шерстобоев М.К. та ін.]; За ред. В.П. Патики. Вінниця «ПП«ТД Едельвейс і К» – 2015. – 266 с/ ISBN 978-617-7237-04-3
28. Бутовина О.Ю. Высококонкурентные штаммы клубеньковых бактерий – основа эффективности биопрепаратов / О.Ю. Бутовина,

Н.З. Толкачев, А.В. Князев // Микробиол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 123–131.

29. Буянкин Н.И. Биологизация земледелия и растениеводства – перспективное направление / Н.И. Буянкин // Вестник РАСХН – 2005 №2. – С. 40–42.

30. Вавилов П.П. Новые кормовые культуры / П.П. Вавилов, А.А. Кондратьев. – М.; Россельхозиздат, 1975. – 350 с.

31. Вавилов П.П. Возделывание и использование козлятника восточного / П.П. Вавилов, Х.А. Райг. – Л.: Колос. Ленинградское отделение, 1982. – 72 с.

32. Вавилов П.П. Бобовые культуры и проблема растительного белка / П. П. Вавилов, Г. С. Посыпанов. – М.: Россельхозиздат, 1983. – 256 с.

33. Валагурова Е.В. Актиномицеты рода *Streptomyces* (описание видов и компьютерная программа их идентификации) / Е.В. Валагурова, В.Е. Козырицкая, Г.А. Иутинская. – К.: Наукова думка, 2003. – 648 с.

34. Васильченко С.А. Симбиотическая активность и фотосинтетическая деятельность посева сои при применении микроудобрений / С. А. Васильченко –// Аграр. вестн. Урала. – 2010. – № 9–10. – С. 11–13.

35. Василюк В.М. Формування симбіотичних взаємовідносин рослин люпину з транспозоновими мутантами *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) / В.М. Василюк, Н.М. Мельникова, Л.М. Михалків [та Ін.] // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – 39, № 3. – С. 233–241.

36. Васюк Л.Ф. Азотфиксирующая активность *Rhizobium meliloti* в зависимости от вида и сорта люцерны и уровня азотного питания / Л.Ф. Васюк, С.М. Алисова, А.И. Чундерова // Экология и физиология почвенных микроорганизмов. – №1, 1976.–С. 71–78.

37. Вафина Л.Т. Сравнительная оценка продуктивности чистых и смешанных посевов козлятника восточного на разных фонах минерального

питання / Л. Т. Вафина, Ф. Н. Сафиоллин // Вестн. Каз. гос. аграр. ун-та. – 2010. – № 4. – С. 134–138.

38. Веденяпина Н.С. Пути повышения симбиотической азотфиксации и продуктивности люцерны в условиях Нижнего Поволжья / Н.С. Веденяпина, Е.К. Муковникова // Микроорганизмы в сельском хозяйстве: тез. докл. IV Всесоюз. науч. конф. Пущино, 20–24 янв. 1992. – Пущино: [б. и.], 1992. – С. 65–67.

39. Влияние природных и гибридных лектинов и взаимодействие бобовых растений с ризобиями / Ал. Х. Баймиев, И. И. Губайдуллин, Ан. Х. Баймиев, А. В. Чемерис // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 1. – С. 84–91.

40. Волкогон В.В. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика [Волкогон В.В., Надкернична О.В., Ковалевська Т.М. та Ін.]– К.: Аграрна наука, 2006. –312 с.

41. Волкогон В.В. Мікробіологічні аспекти оптимізації азотного удобрення сільськогосподарських культур / Волкогон В.В. – К.: Аграрна наука, 2007. – 144 с.

42. Воробей В.С. Формування та функціонування симбіотичної системи козлятник східний – *Rhizobium galegae* протягом першого та другого років вирощування / В.С. Воробей, Т.М. Ковалевська // Корми і кормовиробництво. – 2008. Вип. 63.– с.26– 34.

43. Гадзало Я.М. Агробиология ризосферы растений: монография /Гадзало Я.М., Патыка Н.В., Заришняк А.С. – К. – Аграрна наука, 2015.– 386 с.

44. Гарькавий А.Д. Конкурентоспроможність технологій і машин: Навчальний посібник / А.Д. Гарькавий, В.Ф. Петриченко, А.В. Спирін. – Вінниця: ВДАУ – «Тірас». – 2003. – 68 с.

45. Гвоздяк Р.І., Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: [монографія: в 3-х т.] / [Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., та Ін.] – К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс».

Т.1. – 2011. – 444 с.

46. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под ред. Тихоновича И. А., Проворова Н. А. – СПб.: Наука, 1998. – 194 с.

47. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий / [Б.В. Симаров, А.А. Аронштам, Н.И. Новикова и др.] – Л.: Агропромиздат, 1990. – 192 с.

48. Гладкова Л.И. Использование новых видов растений в кормопроизводстве / Гладкова Л.И. – М.: ВНИИТЭИагропром, 1987. – 47 с.

49. Глянько А. К. Физиологические механизмы отрицательного влияния высоких доз минерального азота на бобово-ризобиальный симбиоз / А. К. Глянько, Н. Б. Митанова // Вестн. Харьковского аграр. ун-та. – 2008. – 2(14). – С. 26–41.

50. Головин Е. В. Влияние инокуляции на продукционный процесс сортов сои при различной влагообеспеченности / Е.В. Головин, В.И. Зотикова // Земледелие. – 2010. – № 8. – С. 41–43.

51. Гришко В.В. Проблеми управління ресурсовикористанням у галузях агропромислового комплексу (енергетичні аспекти) / Гришко В.В. – К.: Інститут економіки Міністерства економіки України, 1997. – 188 с.

52. Гришко В.В. Енергозбереження в сільському господарстві (економіка, організація, управління) / Гришко В.В., Перебийніс В.І., Рабштина В.М. – Полтава: «Полтава», 1996. – 280 с.

53. Грунти України: властивості, генезис, менеджмент родючості / [Купчик В.І., Іваніна В.В., Нестеров Г.І. та ін.]; Ред. В.І. Купчик. – К.: Кондор, 2007. – 414 с.

54. Данилов В.П. Оптимизация приемов возделывания галеги восточной в условиях лесостепи Западной Сибири / В.П. Данилов // Кормопроизводство. – 2006. – № 7. – С. 12–16.

55. Докунин Ю.В. Продуктивность козлятника восточного в поздние сроки уборки на зелёный корм / Ю.В. Докунин // Кормопроизводство. – 2008. – № 9. – С. 22–24.
56. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). / Доспехов Б.А. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
57. ДСТУ 4138–2002 Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості [Чинний від 2004 – 01 – 01]. – Київ, Держспоживстандарт України, 2004. – 173 с.
58. Державний реєстр пестицидів і агрохімікатів – 2015, дозволених до використання в Україні (розпочато з 01.01.08 згідно вимог постанови Кабінету Міністрів України від 21.11.2007 № 1328)
59. ДСТУ 4674-2006. Сіно. Технічні умови: [Чинний від 2007-10-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2005. – (Національний стандарт України).
60. Економіка праці та соціально-трудові відносини: Підручник / О.А. Грішнова. – 5-те вид., оновлене. – К. : Знання, 2011. – 390 с.
61. Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія / В.В. Волкогон, О.В. Надкернична, Л.М. Токмакова, Т.М. [та ін.]; за наук. ред. В.В. Волклгона. – К.: Аграрна наука, 2010. – 464 с.
62. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. – Л.: ЛО «Агропромиздат», 1987. – 430 с.
63. Жизневская Г.Я. Взаимодействие бобового растения и клубеньковых бактерий / Г.Я. Жизневская // Прикл. биохим. и микробиол. – 1983. – 19, вып. 3. – С. 314– 328.
64. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений и проблемы агросферы (теория и практика): в 2 т. / А.А. Жученко. – М.: ООО Изд-во Агрорус, 2004. – Т. 1. – 690 с.; Т. 2. – 466 с.
65. Заболотна В.П. Інокуляція козлятнику східного як засіб підвищення врожаю надземної маси і нагромадження в ній білка /

В.П. Заболотна, І.М. Бутницький, С.Я. Коць, С.М. Маліченко // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001.–33, №4.–С. 313–318.

66. Заболотна В.П. Значення козлятнику східного у симбіотичній фіксації азоту та підвищенні збору білка / В.П. Заболотна, І.М. Бутницький, С.Я. Коць, С.М. Маліченко // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – 36, № 4. – С. 291–300.

67. Захарова О.М. Бактеріальні хвороби ріпаку / О.М. Захарова, М.Д. Мельничук, Л.А. Данкевич, В.П. Патика // Мікробіол. журн. –2012. – Т. 74, №6. – С. 46–52.

68. Защита растений от болезней/В.А. Шкаликов, О.О.Белошапкина, Д.Д. Букреев [и др.]; Под ред. В. А. Шкаликова. –3-изд., испр. и доп . – М.: Колос, 2010. – 404 с.

69. Збарський В.К. Економіка сільського господарства. Навчальний посібник. / В.К. Збарський, В.І Мацибора, А.А. Чалий. – К.: Каравелла. – 2009. – 264 с.

70. Зінченко О.І. Рослинництво: Підручник / Зінченко О.І., Салатенко В.Н., Білоножко М.А.:за ред. О.І. Зінченка. –К.: Аграр. освіта, 2001. – 591 с.

71. Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы / В.В. Игнатов // Сорос. образоват. журн. – 1998. – № 9. – С. 28–33.

72. Исаев, М. Д. Технология возделывания козлятника восточного на корм в условиях Республики Татарстан / М. Д. Исаев // Инф. бюлл. – Казань, 2009. – № 5. – С. 8–18.

73. Казанцева, Н.В. Режим укосного использования козлятника восточного / Н. В. Казанцева // Достижения науки и техники АПК. – 2008. – № 10–12. С. 28–29.

74. Кашукоев М.В. Обоснование оптимальной обеспеченности почвы подвижными фосфатами для симбиотической азотфиксации растений гороха / М. В. Кашукоев, А.А. Кашукоев, Ф.Х. Хутежева // Вестн. Рос. акад. с.-х. наук. – 2011. – № 3. – С. 30–31.

75. Кириленко Л.В. Вплив екологічних факторів на процес біологічної азотфіксації / Л.В. Кириленко Л.В // XIII З'їзд Товариства Мікробіологів України ім. С.М. Виноградського – 01 – 06 жовтня 2013. – С. 163

76. Кириленко Л.В. Симбиотическая система козлятника восточного – *Rhizobium galegae* в течении первого и второго лет выращивания / Л.В. Кириленко // Материалы международной научной конференции: «Проблемы и перспективы биологического земледелия» – с. Рассвет, 23–25 сентября 2014. – С. 213–218.

77. Кириленко Л.В. Ефективність симбіотичної фіксації в агроценозах козлятника східного / Л.В. Кириленко, Ю.М. Шкатула // Наукові записки Тернопільського національного університету імені Володимира Гнатюка – 2014. – №3. – 60. – С.87–90.

78. Кириленко Л.В. Урожайність козлятника східного залежно від сортових особливостей / Л.В. Кириленко, В.П. Патика // Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. – 2014. – №2 – 34. – С.107–109.

79. Кириленко Л.В. Формування високоефективної симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник/ Л.В. Кириленко, Ю.М. Шкатула, С.Я. Коць [та ін.] // Вісник аграрної науки – 2014 – №1. – 731.– С. 22–25.

80. Кириленко Л.В. Фітопатогенні бактерії козлятнику східного / Л.В. Кириленко, В.П. Патика // Вісник Уманського національного університету садівництва. – 2016. – №2. – С.18–21.

81. Ковальжиу А.И. Эффективность симбиоза люцерны с клубеньковыми бактериями в условиях применения гербицидов / А.И. Ковальжиу, С.Д. Апостолов, В.И. Сабельникова // Изв. АН МССР. Сер. Биол. хим. наук. – 1990. – № 5. –С. 13–18.

82. Кожемяков А.П. Перспективы применения препаратов азотфиксирующих микроорганизмов в сельском хозяйстве / А.П. Кожемяков, А.В. Хотянович // Бюллетень ВИУА. – 1997. – № 110. – С. 4–5.

83. Кожемяков А.П. Эффективность и основные функции симбиотических и ассоциативных бактерий – инокулянтов симбиотических культур / А. П. Кожемяков // Сельскохозяйственная микробиология в XIX–XXI вв. – СПб., 2001. – С. 25–26.

84. Колясникова Н.Л. Цветение, опыление и семенная продуктивность *Galega orientalis Lam* / Н.Л. Колясникова, И.В. Елтышева // Аграрный вестник Урала. – 2010. – № 8. – С. 39–40.

85. Космынина О. Н. Влияние клубеньковых бактерий и грибных заболеваний на продуктивность гороха в лесостепи среднего Поволжья : автореф. дис. . канд. с.-х. наук : 06.01.11 «Защита растений» / Ольга Николаевна Космынина. – Кинель, 2009. – 22 с.

86. Косторной В.Ф. Морфобиологические особенности некоторых интродуцентов в условиях Сибири / В.Ф. Косторной // Эколого-популяционный анализ кормовых растений естественной флоры, интродукция и использование: тез. док. VII Всесоюз. симпоз. по новым кормовым растениям. – Сыктывкар, 1990. – С. 160–161.

87. Коць С.Я. Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом [Коць С.Я., Маліченко С.М., Кругова О.Д. та ін.] – К.: Логос, 2001. – 271 с.

88. Коць С.Я. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов [Коць С.Я., Береговенко С.К., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н.]–К.: Наук. думка, 2007. – 315 с.

89. Коць С.Я. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз / [Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф., и др.]: [монография: в 4-х т.]. – . – К.: Логос.

Т. 1. – 2010. – 508 с.

90. Коць С.Я. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз: / [Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф., и др.]: [монография: в 4-х т.]. – . – К.: Логос.

Т. 2. – 2011. – 523 с.

91. Коць С.Я. Биологическая фиксация азота: генетика азотфиксации, генетическая инженерия штаммов: / [Коць С.Я., Моргун В.В., Тихонович И.А., и др.]: [монография: в 4-х т.]. – К.: Логос. Т. 3. – 2011. – 404 с.
92. Коць С.Я. Фізіологія симбіозу та азотне живлення люцерни: (Монографія) / С.Я. Коць, Л.М. Михалків. – Ін-т фізіології рослин і генетики НАНУ. – К.: Логос, 2005. – 300 с.
93. Коць С.Я. Биологическая фиксация азота: ассоциативная азотфиксация / [Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф., и др.]: [монография: в 4-х т.]. – К.: Логос. Т. 4. – К.: 2011. – 412 с.
94. Кретович В.Л. Усвоение и метаболизм азота у растений / Кретович В.Л. – М.: Наука, 1987. – 490 с.
95. Кретович В. Л. Биохимия усвоения азота воздуха растениями / Кретович В. Л. – М.: Наука, 1994. – 168 с.
96. Кубарев В.А. Возделывание и использование козлятника восточного в Западной Сибири: лекция / В.А. Кубарев. – Омск.: ОмГАУ, 2005. – 30 с.
97. Кубарев В.А. Козлятник восточный в подтаёжной зоне Западной Сибири / В.А. Кубарев // Известия Оренб. гос. аграр. ун-та – 2012. – Т.4. – № 36. – 1. – С. 51–53.
98. Кулешов, Н.И. Пат. 2418039 РФ, [Электронный ресурс]: МПК С10Б544, Л0Ш100, Л01Б79. Способ получения биотоплива из галеги восточной / Н.И. Кулешов (РФ). - № 2009137109/21; заяв. 08.10.09. - Режим доступа: <http://elibrary.ru>.
99. Кшникаткина А.Н. Козлятник восточный: монография / А.Н. Кшникаткина. – Пенза: РИО ПГСХА, 2001. – 287 с.
100. Кшникаткина А.Н. Влияние козлятника восточного на плодородие почвы / А.Н. Кшникаткина, В.А. Варламов // Земледелие. – 2002. – № 6. – С. 26–27.

101. Кшникаткина А.Н. Приёмы повышения продуктивности козлятника сорта Гале / А.Н. Кшникаткина // Кормопроизводство. – 2006. – № 5. – С. 21–22.

102. Кшникаткина А.Н. Формирование высокопродуктивных агрофитоценозов клевера паннонского / А.Н. Кшникаткина, Е.В. Пенкина // Нива Поволжья. – 2010. – № 1. – С. 18–23.

103. Кшникаткина А.Н. Агроэкологическая оценка козлятника восточного как предшественника / А.Н. Кшникаткина // Нива Поволжья. – 2011. – № 1. – С. 24–31.

104. Лапинская Э.Б. Эффективность инокуляции люцерны адаптированными к кислой почве штаммами *Rhizobium* / Э. Б. Лапинская // Агрохимия. – 2005. – № 2. – С. 72–79.

105. Лапинская Э.Б. Влияние стартового азота на симбиотическую азотфиксацию бобовых растений / Э.Б. Лапинская // Агрохимия. – 2006. – № 10. – С. 56–63.

106. Лапинская Э.Б. Влияние фосфорно-калийных удобрений на симбиотическую азотфиксацию *Rhizobium Galegae* / Э. Б. Лапинская, Л. П. Мотузене // Агрохимия. – 2007. – № 9. – С 42–52.

107. Ласкин П.В. Экологическое и хозяйственное значение интродукции козлятника восточного (*Galega orientalis Lam.*) в земледелии Мурманской области / П.В. Ласкин, А.Х. Хайтбаев // Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2002. – Р 45.

108. Ласкин П.В. Интродукция *Galega orientalis (Galega orientalis Lam.)* в Заполярье (на примере Мурманской области) / П.В. Ласкин // Растительные ресурсы. – 2006. – № 3. – С. 42–47.

109. Лихочвор В.В. Рослинництво. Технології вирощування сільськогосподарських культур / [Лихочвор В.В., Петриченко В.Ф., Іващук П.В., Корнійчук О.В.]; за ред. В.В.Лихочвора, В.Ф.Петриченка. – [3-є вид.]. – Львів: НВФ «Українські технології», 2010. – 1088 с.

110. Макаруч О.Г. Біоенергетичний потенціал сільськогосподарських підприємств: вимір, оцінка / О.Г. Макаруч // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2009. – Вип. 142. – Частина 1. – С. 129–135.

111. Мальцева Н.Н. Нитрогеназная активность клубеньков люпина в зависимости от видовых, сортовых особенностей растений и влияния фитотоксических веществ грибного происхождения / [Н.Н. Мальцева, Е.Н. Надкерничная, Т.А. Граб [и др.]] // Бюллетень ВНИИСХМ. – 1986. – № 43. – С. 41 – 45.

112. Марков І.Л. «Енергетичні» хвороби / І.Л. Марков // Журнал – Агрономія сьогодні. – 2012. – №15–16. – Р. 238–239.

113. Медведовський О.К. Енергетичний аналіз інтенсивних технологій в сільськогосподарському виробництві / О.К. Медведовський, П.І. Іваненко. – К.: Урожай, 1988.– 205 с.

114. Мельникова Н.М. Формування бобово-ризобіального симбіозу за дії ексудатів насіння люпину / Мельникова Н.М. // Наукові записки Тернопільського національного університету імені Володимира Гнатюка – 2014 – №3. –60. – С. 131–134.

115. Методическое пособие по агроэнергетической и экономической оценке технологий и систем кормопроизводства / [под ред. А.А. Кутузовой]. - М.: изд-во РАСХН, 2000. - 174 с.

116. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / [Отв. ред. Красильников Н.А.]. – М.: Изд-во МГУ, 1966. – 216 с.

117. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений / [Бельтюкова К.Г., Матышевская М. С., Куликовская М.Д. и др.]. – К. : Наукова думка, 1968. – 316 с.

118. Методы общей бактериологии / [под ред. Ф. Герхардта]. – М. : Мир, 1983. –Т. 1. – С. 356–373.

119. Методические рекомендации по биоэнергетической оценке севооборотов и технологий выращивания кормовых культур. – М.: ВАСХНИЛ.– 1989. – 71 с.

120. Методические указания по использованию ацетиленового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации. – Л., 1982. – 12 с.

121. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. Справочник/ Под ред. Билай В.И. – К.:Наук. думка, 1988. – 550 с.

122. Минеральный и биологический азот в земледелии СССР / [Отв. ред. Е.Н. Мишустин]. – М.: Наука, 1985. – 270 с.

123. Мишустин Е.Н. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс / Е.Н. Мишустин, В.К. Шильникова. – М.: Наука, 1973. – 289 с.

124. Мишустин Е.Н. Пути повышения азотного баланса земледелия СССР / Е.Н. Мишустин, Н.И. Черепков // Журн. Всесоюз. химич. общества им. Д.И. Менделеева. – 1983. – № 3. – С. 325–344.

125. Мильто Н.И. Клубеньковые бактерии и продуктивность бобовых растений / Мильто Н.И. – Минск: Наука и техника, 1982. – 296 с.

126. Мильто МА. Эффектынасаць інакуляцый некаторых сартоу люцэрны рознымі штамамі *Rhizobium meliloti* / МА. Мільто, І.В Сакалоўскі. // Весці АН БССР. Сер. біол. н. – 1988. – № 4. – С. 52–58.

127. Моисеенко И. Я. Повышение азотфиксирующей способности и симбиотического потенциала растений сои при известковании / И.Я. Моисеенко, О.А. Зайцева // Агрехим. вестн. – 2009. – № 3. – С. 25–27.

128. Молекулярные механизмы усвоения азота растениями / Кретович В. Л. – М.: Наука, 1983. – 263 с.

129. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / [Отв. ред. В.В. Игнатов]. – М.: Наука, 2005. – 262 с.

130. Морозов В.И. Средообразующие функции зернобобовых культур при биологизации севооборотов лесостепи Поволжья / В.И. Морозов // Вестн. УГСХА. – 2010. – №1. – 11. – с. 3–15.

131. Молоканцева Е.И. Влияние видов, способов посева и норм высева на формирование высокопродуктивных травостоев козлятника восточного в условиях орошения Волго-Донского междуречья: автореф. дис. . канд. с.-х. наук: 06.01.09 «Растениеводство» / Молоканцева Елена Ивановна. – Волгоград, 2009. – 22 с.

132. Мощук П.А. Применение гербицидов в посевах люцерны / П.А. Мощук, Е.Г. Артемчук, О.И. Бегеба // Биол. ритмы. Мат. междунар. науч.- практ. конф. Беловежская Пуца, 26–28 апр., 1999. – Брест., – С. 202–203.

133. Мунина А.А. Влияние кобальта на азотфиксацию и микрофлору корней, клубеньков и ризосферы гороха / А.А. Мунина // Вестн. Казан. ун-та. – 1969. – С. 24–28.

134. Надкерничный С.П. Фитотоксические свойства микроскопических грибов почв Украины: Автореф. дис. канд.биол. наук: 03.00.07 – «Микробиология» / Надкерничный Станислав Петрович – ВНИИСХМ– Л., 1976.–34 с.

135. Наукові основи агропромислового виробництва в Зоні Лісостепу України / [Ред. М.В. Зубець]. – К.: Логос, 2004. – 776 с.

136. Нечитайло В.А. Систематика вищих рослин. II. Покритонасінні / Нечитайло В.А. – К.: Фітосоціоцентр, 1997. – 372 с.

137. Николаева А.Н. Влияние метеорологических факторов на продуктивность козлятника восточного в условиях Чувашии / А.Н. Николаева, А.А. Сорокин // Аграрная наука Евро–Северо-Востока. – 2006. – № 8. – С. 132–133.

138. Нічик М.М. Структурно-функціональна організація генів азотфіксації у діазотрофів і бульбочкових бактерій / М.М. Нічик // Физиология и биохимия культ. растений. – 1994. – 26. – № 3. – С. 213–223.

139. Новикова А.Т. Использование симбиотического азота при возделывании козлятника восточного (Кормовые растительные ресурсы – фактор науч.–технич. прогресса в кормопроизводстве) / А.Т. Новикова, Э.Б. Базылев, В.Д. Князева [и др.] // Тез. докл. Всесоюз. науч.- произв. конф. – Киев; Белая Церковь, 1989. – С. 24.

140. Новикова Н.И. Современные представления о филогении и систематике клубеньковых бактерий / Н.И. Новикова // Микробиология. – 1996. – Т. 65. – № 4. – С. 437–450.

141. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов / [С.Я. Коць, С.К. Береговенко, Е.В. Кириченко и др.]. – Л.: Наук, думка, 2007. – 315 с.

142. Палайтите Г. Зависимость симбиотической азотфиксации от удобрения фосфором и калием / Г. Палайтите // Земледелие. Науч. тр. ЛИЗ и ЛСХУ. Литва: Академия. – 2003. – Т. 83. – С. 187–194.

143. Пат. 51890 Україна, UA (11)51890 (13)А Штам *Rhizobium galegae* МС–1 №159 / [В.П. Заболотна, С.Я. Коць, Л.В. Титова та ін.], опуб. 16.12.2002, Бюл. №12.

144. Пат. 95714 Україна, 51МПК (2015.01) C05F 11/08(2006.01), C12N 1/20(2006.01), C12R 1/41(2006.01), A01N 63/02(2006.01), A01P 21/00 Штам бактерій *Rhizobium galegae* Л2 (колекція ІМІВ НАН України) для одержання бактеріального добрива під козлятник східний / [Кириленко Л.В., Коць С.Я., Маменко П.М., та ін.]. – оубл. 12.01.2015, Бюл. №1.

145. Патыка В.Ф. Эффективность применения ризоторфина и азотных удобрений под сою на орошаемых землях юга Украины / В.Ф.Патыка, Н.З.Толкачев, В.И. Заверюхин [и др.]. // Агрехимия. – 1987. – № 12. – С. 3–7.

146. Патыка В.П. Мікроорганізми і альтернативне землеробство / Патыка В.П., Тихонович І.А., Філіп'єв І.Д. – К.: Урожай, 1993. – 176 с.

147. Патыка В.П. Перспективи використання препаратів у землеробстві / В.П. Патыка // 36. наук, праць Ін-ту землеробства УААН. – К., 1999. – Вип.4. – С. 84–91.

148. Патика В.П. Біологічний азот / [Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В., та ін.]. – Київ: Світ,–2003. – 424 с.
149. Патика В.П. Вплив аборигенних популяцій бульбочкових бактерій сої на симбіотичну активність інтродукованого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 634б / В.П. Патика, Д.В. Крутило, Т.М. Ковалевська // Мікробіол. журн. – 2004. – Т. 66. – № 3. – С. 14–21.
150. Патыка В.Ф. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современном земледелии Украины / В.Ф. Патыка, Н.З. Толкачев, О.Ю. Бутвина // Физиология и биохимия культурных растений. – 2005.–Т. 37. –№5.–С. 384–393.
151. Патыка Н.В. Роль *Linum usitatissimum* l. в формировании микробных сообществ подзолистых почв / Н.В. Патыка, Ю.В. Круглов, А.М. Бердников, В.Ф. Патыка // Мікробіологічний ж-л. – 2008. – 70. – №1. – С.59–70.
152. Патика В.П. Мікробний біом різних ґрунтів й ґрунтово-кліматичних зон Полтавської області / В.П. Патика, С.В. Тараненко, А.О. Тараненко, А.В. Калініченко // Мікробіологічний ж-л. – 2014. – 76. – №5. – С.20 – 25.
153. Патика В.П. Діагностика фітопатогенних бактерій. Методичні рекомендації / [Патика В.П., Пасічник Л.А., Данкевич Л.А. та ін.]; За ред. В.П. Патики. – Київ, 2014. – 76 с.
154. Патика М.В. Сучасні проблеми біорізноманітності і зміни клімату / М.В. Патика, В.П. Патыка // Вісник аграрної науки. – 2014. – №6. – С.5–10.
155. Патика В.П. Біологічний азот у системі землеробства / В.П. Патика, Т.Т. Гнатюк, Н.М. Булеца, Л.В. Кириленко // Землеробство. – 2015. – №2. – 89. – С.12–20.
156. Патика В.П. Роль біологічного азоту в системі збереження й відтворення родючості ґрунтів у сучасному землеробстві // Шляхи підвищення ефективності використання землі в сучасних умовах / наукове видання за ред. В.Ф. Камінського. – 2016. – С.52-74

157. Пересыпкин В.Ф. Атлас болезней полевых культур / В.Ф. Пересыпкин. – 2-е изд., испр. и доп. – Київ : Урожай, 1987. – 144 с.
158. Петерсон Н.В. Влияние минерального азота на эффективность симбиоза клубеньковых бактерий с люцерной / Н.В. Петерсон, М.М. Ничик, С.Я. Коць // Мікробіол. журн. – 1991. – 53. – № 1. – С. 16–22.
159. Петерсон И.В. Влияние инокулирующих штаммов ризобий на рост органов люцерны / Н.В. Петерсон, М.М. Ничик, С.Я. Коць // Физиология и биохимия культ. растений. 1993. – 25. – № 1. – С. 28–35.
160. Петриченко В.Ф. Сільськогосподарська мікробіологія і збалансований розвиток агроєкосистем / В.Ф. Петриченко, І.А. Тихонович, С.Я. Коць [та ін.] // Вісник аграрної науки. – 2012. – №8. – С.5 – 11.
161. Півошенко І.М. Клімат Вінницької області / І.М. Півошенко.– Вінниця: Віноблдрукарня, 1997. – 240 с.
162. Проворов Н.А. Изменчивость культурных видов люцерны по способности к симбиотической азотфиксации / Н.А.Проворов, Б.В. Симаров, А.Н. Зарецкая [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 1987. – № 6. – С. 29–33.
163. Проворов Н.А. Генетический полиморфизм бобовых культур по способности к симбиозу с клубеньковыми бактериями / Н.А. Проворов, Б.В. Симаров // Генетика. – 1992. – 28, № 6. – С. 5–14.
164. Пузырева М.Л. Технология возделывания козлятника восточного на корм и семена в подтаёжной зоне Томской области: метод. рекомендации / М. Л. Пузырева. – Томск, 2006. – 28 с.
165. Пузырева М.Л. Влияние бактериальных и ростстимулирующих препаратов на адаптивные свойства и продуктивность козлятника восточного / М.Л. Пузырева, Т.В. Бурденова –//Достижения науки и техники АПК. – 2010. – №12. – С.48–52.
166. Растениеводство: учеб.пособие / [под ред. Г.С. Посыпанова]. – М.: Колосс, 2006. – 612 с.

167. Рашевская И.В. Рост, минеральное питание и продуктивность козлятника восточного (*Galega orientalis Lam*) при внесении возрастающих доз фосфорно-калийных удобрений / И. В. Рашевская // Вестн. Адыг. гос. ун-та. – 2007. – № 4. – С. 98–101.

168. Регер Ф.Ф. Приёмы повышения продуктивности многолетних трав на орошаемых землях южной лесостепи Омской области: автореф. дис. канд. с.-х. наук: 06.01.09 «Растениеводство» / Регер Фёдор Фёдорович. – Омск, 2004. – 15 с.

169. Резніченко В.П. Продуктивність козлятнику східного порівняно з традиційними кормовими культурами в умовах Північного Лісостепу України / В.П. Резніченко // Корми і кормовиробництво. – 2013. – Вип. 76. – С. 274–277.

170. Савенко В.С. Вирощування козлятнику східного на корм та насіння в західному лісостепу України (рекомендації) / Савенко В.С. – Тернопіль, ТОВ «Поліграфіст», 1995. – 17 с.

171. Савенко В.С. Козлятник східний / Савенко В.С. – Тернопіль: Економічна думка, 2000. – 292 с.

172. Савин А.П. Технология возделывания основных медоносных культур / А.П. Савин, Ю.В. Докунин. – Рязань: Рязоблтипография, 2010. – 111 с.

173. Сагирова Р.А. Особенности роста, развития и продуктивности галеги восточной в разных почвенно-климатических зонах Предбайкалья и Забайкалья / Р. А. Сагирова –//Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2010. – № 5. – С. 33–39.

174. Сарнацький П.Л. Нові і малопоширені кормові культури [Сарнацький П.Л., Видрін Ю.В., Архипенко Ф.М., Тютюнник М.Г.]. – Київ: Урожай, 1985. – 72 с.

175. Сафин Х.М. Галега – приоритетная кормовая культура для Зауралья Башкорстана / Х.М. Сафин // Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами и создание функциональных

продуктов: материалы I Рос. науч.- практ. конф., Москва, 2001 г. – М., 2001. – С. 144–148.

176. Семенова Н.М. Перспективы внедрения козлятника восточного в Зауралье / Н. М. Семенова // Козлятник восточный проблемы возделывания и использования: тез. докл. I Всесоюзного научно-производственного семинара. Челябинск. 1991. С. 24–26.

177. Сергеева Н.А. Влияние числа скашиваний на формирование урожайности козлятника восточного / Н.А. Сергеева // Нива Поволжья. – 2011. – № 3. – С. 38–42.

178. Сергеева Н.А. Формирование продуктивности козлятника восточного в зависимости от режима использования на выщелоченных черноземах юга лесостепи Нечерноземья: автореф. дис. канд. с.-х. наук: 06.01.01. «Общее земледелие» / Сергеева Наталья Александровна. – Пенза, 2011. – 23 с.

179. Сидорова К.К. Симбиогенетика и селекция макросимбионта на повышение азотфиксации на примере гороха (*Pisum Sativum L.*) / К.К. Сидорова [и др.] // Вестн. ВОГиС. – 2010. – Т. 14. – № 2. – С. 357–374.

180. Сидорова К.К. Генетическая роль бобового растения в симбиотической азотфиксации (на примере *Pisum sativum*) / К.К. Сидорова, В.К. Шумный // Сибир. эколог. журн. – 1999. – № 3. – С. 281–288.

181. Симаров Б.В. Биотехнология симбиотической азотфиксации / Б.В. Симаров, А.А. Аронштам. // С.-х. биология. – 1987. – № 11. – С. 104–111.

182. Симаров Б.В. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий [Симаров Б.В., Аронштам А.А., Новикова Н.И. и др.]. – Л.: Агропромиздат, 1990. – 192 с.

183. Симонов Г.А. Опыт выращивания козлятника восточного / Г.А. Симонов, В.М. Кочетков // Земледелие. – 2009. – № 2. – С. 42–43.

184. Симочко Л.Ю. Роль *Capsicum annum L.* у формуванні мікробної спільності дерново-підзолистих ґрунтів Закарпаття / Л.Ю. Симочко,

С.М. Кормош, В.П. Патика // Вісник Харківського Національного аграрного університету. Серія біологія. – 2011. – вип. 2. – 23. – С.95–104.

185. Сытников Д.М. Актуальность проблемы биологической фиксации азота атмосферы / Д.М. Сытников // Современные взгляды на эволюцию органического мира: программа и тезисы докладов междунар.науч. конференции, Украина, Киев, 18–20 ноября 2009 г. – К., 2009. – С. 77.

186. Скорочкин Ю.П. Технология возделывания козлятника восточного с применением эмистима в условиях северо-востока Центрального Черноземья / Ю. П. Скорочкин // Вестник ТГУ. – 2009. – Т. 14. Вып 1. – С. 146–148.

187. Смирнов В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова; [Отв. ред. Б.Е. Айзенман]. – К.: Наукова думка, 1990. – 264 с.

188. Соколов И.А. Продуктивность многолетних трав на мелиорированных торфяных почвах Белоруссии / И.А. Соколов, Н.Е. Бохан, Т.М. Серая // Молодые ученые – интенсификации сельского хозяйства: Тез. докл.науч.-практ.конф. – Скривери, 1990. – С. 56–58.

189. Солдатенков Е.П. Действие минеральных удобрений на козлятник восточный / Е.П. Солдатенков, А.Г. Шашков, И.Я. Пахомов // Химизация сельского хозяйства. – 1988.–№3.–С. 55–56.

190. Спасова В.П. Продуктивность и накопление биологического азота при возделывании козлятника восточного / В.П. Спасова, Л.А. Макеева. // Козлятник восточный – пробл. возделывания и использования: Тез. докл. I Всесоюз. науч.- произв. семинара. – Челябинск: Челяб. НИИСХ, 1991. – С. 70–71.

191. Статистичний збірник «Регіони України»/ Державна служба статистики України [за ред. Ю.Г.Осауленка]. – К., 2014// [Електронний ресурс] – Режим доступу:

http://library.oneu.edu.ua/files/StatSchorichnyk_Ukrainy_2013.pdf

192. Степанов А.Ф. Возделывание козлятника восточного в Западной Сибири: рекомендации / А.Ф. Степанов. – Омск: ОмСХИ, 1992. – 32 с.
193. 221. Степанов А.Ф. Козлятник восточный в Сибири / А.Ф. Степанов // Кормопроизводство. – 1994.– №4.–С. 14–16.
194. Степанов А.Ф. Многолетние малораспространенные кормовые культуры: лекция / А.Ф. Степанов. – Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2004. – 72 с.
195. Сучасні системи землеробства України / [В.Ф. Петриченко, Я.Я. Панасюк, Г.М. Заболотний, Л.П. Середа]. – Вінниця: Діло, 2006. –212 с.
196. Тагаев М., Рустембекова Н. Изучение сорто-штаммовой специфичности симбиотической азотфиксации клубеньковыми бактериями люцерны – 2 съезд Всес. о-ва. физиол. растений, Минск 24–29 сент. 1990. Тез. докл. Ч. 2. – М., 1992. – С. 203.
197. Тазина Н.Г. Оптимальный уровень кислотности почвы и микроудобрений на посевах козлятника / Н.Г. Тазина, Г.С. Посыпанов // Кормопроизводство. – 1997. – № 10.–С. 8–11.
198. Тазина, Н.Г. Особенности биологии и агротехники козлятника в Нечерноземной зоне / Н.Г. Тазина // Кормопроизводство. – 1999. – № 10. – С. 16.
199. Тихонович И.А. Специфичность взаимодействия бактерий и растений как пример образования интегрированных генетических систем / И.А. Тихонович // Проблемы экспериментальной ботаники. Купревические чтения. – Минск: Тэхналогія, 2006. – С. 5–49.
200. Тихонович И.А. Использование генетических факторов макросимбионта для повышения эффективности биологической азотфиксации / И.А. Тихонович // Биологический азот в сельском хозяйстве СССР. – М.: Наука, 1989. – С. 166–181.
201. Тихонович И.А. Функциональная интеграция генетических систем проэукариот в процессе микробно-растительного взаимодействия / И.А. Тихонович. – М.: ИФР РАН, 2004.

202. Ткачева Е.В. Перспектива расширения вторичного ареала козлятника восточного в средней России / Е. В. Ткачева // Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. – 2011. – № 25. – С. 160–164.

203. Ткачук О.П. Особливості росту козлятнику східного в рік сівби за різних способів вирощування / О.П. Ткачук // Корми і кормовиробництво. – 2012. – Вип. 72. – С.46–50.

204. Толкачев Н.З. Приемы повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза / Н.З. Толкачев, П.А. Донченко, А.В. Князев [и др.] // Физиология и биохимия культ. растений. – 1994. – 26. – № 4. – С. 344–351.

205. Тrepачев Е.П. Значение биологического и минерального азота в проблеме белка / Е.П. Тrepачев // М.: Наука, 1985.–С. 27–37. – (Минеральный и биологический азот в земледелии СССР).

206. Угледсвязывающие пептиды лектинов бобовых растений в связи с их различной хозяйской специфичностью при образовании симбиоза с клубеньковыми бактериями / Ал. Х. Баймиев [и др.] // Генетика. – 2001. – № 37. – С. 215–222.

207. Умаров М.М. Особенности микробной трансформации азота в почве / М.М. Умаров –//Почвы–национальное достояние России: Материалы IV съезда Докучаевского общества почвоведов (Новосибирск, 9–13 августа 2004 г.). Кн.1. Новосибирск: «Наука–центр», 2004. – С. 268.

208. Умаров М.М. Роль микроорганизмов почв в балансе азота в биосфере / М.М. Умаров // Почвы–национальное достояние России: Материалы IV съезда Докучаевского общества почвоведов (Новосибирск, 9–13 августа 2004 г.). Кн.1. Новосибирск: «Наука–центр», 2004. – С. 373–375.

209. Утеуш Ю.А. Кормові ресурси флори України / Ю.А. Утеуш, М.Г. Лобас. – К.: Наук. думка, 1996. – 219 с.

210. Хамоков Х.А. Влияние влагообеспеченности почвы на показатели симбиотической и фотосинтетической деятельности посевов гороха / Х.А. Хамоков // Зерновое хозяйство. – 2002. – № 7. – С. 21–22.

211. Хвороби козлятника східного: моніторинг, діагностика, профілактика. Методичні рекомендації. За редакцією академіків НААН В.П.Патики, В.Ф. Петриченка. – «Віндрук», 2016. – 48 с.

212. Хвороби сої: моніторинг, діагностика, захист: [монографія] / [Петриченко В.Ф., Патика В.П., Пасічник Л.А., та ін.]; За ред. академіків НААН В.Ф. Петриченка, В.П. Патики. – Вінниця: «Віндрук», 2016. – 106 с.

213. Черемисов Б.М. Селекция бобовых растений и клубеньковых бактерий на интенсификацию их симбиоза / Черемисов Б.М.. – М., 1985. – 61 с.

214. Черствий С.М. Эффективность штаммов клубеньковых бактерий люцерны в зависимости от сортовых особенностей растений и почвенных условий / С.М. Черствий, П.С. Губанова, Т.А. Граб // Труды ВНИИСХМ. – 1987. – 57. – С. 78–84.

215. Чундерова А.И. О генетике бобово-ризобияльного симбиоза / А.И. Чундерова // Сельскохозяйственная биология. – 1981. – 16. – № 3. – С. 349–358.

216. Чураков П.Л. Козлятник восточный в Удмуртии / П.Л. Чураков // Козлятник восточный – проблемы возделывания и использования: Тез. докл. I Всесоюз. науч.- произв. семинара. – Челябинск: Челяб. НИИСХ, 1991. – С. 61–62.

217. Шанина Л.И. Полевые культуры Западной Сибири: учеб. пособие / Л.И. Шанина. – Омск.: ОмГАУ, 2003. – 72 с.

218. Шерстобоева Е.В. Биопрепараты азотфиксирующих бактерий: проблемы и перспективы применения / Е.В. Шерстобоева, И.А. Дудинова, С.Н. Крамаренко [и др.] // Микробиол. журнал. – 1997. – Т. 59. – № 4. – С. 109–117.

219. Шкатула Ю.М. Роль багаторічних бобвих трав в сталому розвитку Вінницької області / Ю.М. Шкатула, Л.В Кириленко // Всеукраїнська науково-практична конференція за участю молодих вчених:

«Екологічні проблеми природокористування та охорона навколишнього середовища» (Рівне, 7–9 листопада 2013 р.). – С. 252–254.

220. Юргель С.Н. Тп5-мутации *Rhizobium meliloti*, вызывающие повышение редокс-потенциала свободноживущих клеток и эффективность их симбиоза с люцерной / С.Н. Юргель, Л.А. Шарыпова, Б.В. Симаров // Генетика. – 1998. – 34. – №6. – С. 737–741.

221. Яртиева Ж.А. Возделывание козлятника восточного на корм и семена в Нечерноземной зоне СССР. Рекомендации / Яртиева Ж.А., Яртиев А.Г., Шагаров А.М. – М.: Агропромиздат. – 1989. – С. 18.

222. Ярушин А. Козлятник восточный на Камчатке / А. Ярушин, В. Курбангалиев // Кормопроизводство. – 1994. – № 4. – С. 16–17.

223. Andronov E.E. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates Collected from the *Galega orientalis* Gene Center in the Caucasus / E.E. Andronov, Z. Terefework, M. L. Roumyantseva // J. Appl. Bacteriol. – 2003. – Vol. 69. – P. 1067–1074.

224. Atanasov A. T. Anti-platelet fraction from *Galega officinalis* L. Inhibits platelet aggregation / A.T. Atanasov, B. Tchorbanov // J. Med. Food. – 2002. – Vol. 5(4). – P. 229–234.

225. Banath C.L. Effects of calcium deficiency on symbiotic nitrogen fixation / C. L. Banath, E. A. N. Greenwood, J. F. Loneragan // Plant Physiology. – 1966. – V. 41. – № 5. – P. 760–763.

226. Bellato C. The soybean cultivar specificity gene *nolX* is present, expressed in *nodD*–dependent manner, and of a symbiotic significance in cultivar–nonspecific strains of *Rhizobium (Sinorhizobium) fredii* / C. Bellato, H.B. Krishnan, T. Cubo [et al.] // Microbiology. – 1997. – № 143. – P. 1381–1388.

227. Bergey's manual of systematic bacteriology / D.R. Boore, R.W. Castenholz // editors, Vol. 2: Garrity G.M., editor-in-chief. – 2nd ed. – New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. – Part C. – 1388 p.

228. Breeze V.G. Effect of pH in Flowing nutrient solution on the growth and phosphate uptake of white clover supplied with nitrate, or dependent upon

symbiotically fixed nitrogen / V. G. Breeze, D. G. Edwards, M. J. Hopper // *New Phytologist*. – 1987. – V. 106. – № 1. – P. 101–114.

229. Britton N. An illustrated flora of the Northern United States and Canada / N. Britton, A. Brown // Dover publication, inc. – New York, 1970. – Vol. 2. – P. 372–373.

230. Brockwell J., Holliday R.A., Daoud D.M., Materon L.A. Symbiotic characteristics of a *Rhizobium specific* annual medic, *Medicago rigidula* (L.) / J. Brockwell, R.A. Holliday, D.M. Daoud, L.A. Materon // *Soil. Biol and Biochem.* – 1988. – 20. – № 5. – P. 593–600.

231. Brown A. An illustrated flora of the Northern United States, Canada and the British possessions / A. Brown // New York: Charles Scribner's Sons, 1913. – Vol. 3. – P. 459 – 162.

232. Busse M.D. Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by permeating and nonpermeating solutes / M.D. Busse, P.J. Bottomley // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989. – 55. – P. 2431–2436.

233. Champavier Y. Acetylated and non-acetylated flavonoltriglycosides from *Galega officinalis* / Y. Champavier, D. P. Allais, A. J. Chulia, M. Kaouadji // *Chem. Pharm. Bull.* — 2000. — Vol. 48. — P. 281–282.

234. Ching T.M. Energy state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark grown plants / T.M. Ching, S. Hedtke, S.A. Russel, H.J. Evans // *Plant Physiol.* – 1975. – 55. – № 4. – P. 796–798.

235. Crews T. E. Phosphorus regulation of nitrogen fixation in a traditional Mexican agroecosystem / T. E. Crews // *Biogeochemistry*. – 1993. – V. 21. – № 3. – P. 141–166.

236. De Veau Edward J. Photosynthesis and photosynthate partitioning in N-fixing soybeans / J. De Veau Edward, J.M. Robinson, R.D. Warambrodt, P. Van Berkun // *Plant Physiol.* – 1990. – V. 94. – № 1. – P. 259–267.

237. Desai A. Rhizobial haemoglobin and aminolevulinic and synthetase activity in *Rhizobium japonicum* / A. Desai // *Indian J. Exp. Biol.* – 1977. – 15. – № 17. – P. 528–530.

238. Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species: biovar *orientalis* and biovar *officinalis* / G. Radeva [et al.] // Syst. Appl. Microbiol. – 2001. – Vol. 24. – P. 192–205.

239. DNA homology, phage-typing, and cross-nodulation studies of *Rhizobia infecting Galega species* / K. B. Lindstrom [et al.] // Can. J. Microbiol. – 1983. – Vol. 29. – P. 781–789.

240. England K.S. Bacterial survival in soil: effect of clays and *Protozoa* / K. S. England, H. Lee, J. T. Trevors // Soil Biol. Biochem. – 1993. – Vol. 25. – P. 525–531.

241. Ertekes új takarmanynooovenyuunk a keleti kecskeruta (*Galega orientalis Lam.*) / S. Makai [et al.] // Agraragazat. – 2007. – № 10. – P. 18–21.

242. Ferraioli S., Taté R., Caputo E. et al. The *Rhizobium etli* argC gene is essential for arginine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris* / S. Ferraioli, R. Taté, E Caputo [et al.] // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2001. – 14. – № 2. – P. 250–254.

243. Fujita K. Dinitrogen fixation and growth responses to phosphorus and aluminium application in pigeon pea (*Cajanus cajan L.*) / K. Fujita [et al.] // Soil Sci. Plant nutr. – 1995. – V. 41. – № 4. – P. 729–735.

244. Giannakis C. Utilization of nitrate by bacterioids of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodule / C. Giannakis, D.J.D. Nicholas, W. Wallace // Planta. – 1988. – V. 174.–P. 51–58.

245. Gracham L. Variability in molybdenum uptake activity in *Bradyrhizobium japonicum* strains L. Gracham, R.J. Maier // J. Bacteriol. – 1987. – 168. – № 6. – P. 2555–2560.

246. Hansen A.P. Symbiotic N₂ fixation of crop legumes: achievements and perspectives Ed.: Center for Agricultural in the Tropics and Subtropics, University of Hohenheim / Hansen A.P.; Managing ed.: Dietrich E. Leihner. – Weikersheim: Margraf, 1994. –248 p.

247. Hardy R.W.F. Symbiotic nitrogen fixation in plants / R.W.F. Hardy, U.D. Havelka // Cambridge: Univ. press, 1975. – P. 421–439.

248. Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics / F. Hayes // *Annu. Rev. Genet.* – 2003. – 37. – P. 3–29.

249. Holl F.B. Host plant control of the inheritance of dinitrogen fixation in the *Pisum–Rhizobium* symbiosis / F.B. Holl // *Euphytica.* – 1975. – 24, № 3. – P. 489.

250. Hunt P.J. Effect of soil water on *Rhizobium japonicum* infection nitrogen accumulation and yield in bragg soybean / P.J. Hunt, A.G. Wollum, T.A. Matheny // *Ag-ric. J.* – 1981. – 73. – P. 501–505.

251. Hynes M.F. The two megaplasms of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa / M.F. Hynes, R. Slimon, P. Muller [et al.] // *Mol. and Gen. Genet.* – 1986. – 202. – № 2. – P. 356–362.

252. In Situ Bioremediation and Phytoremediation of Contaminated Soils and Water: Three Case / A. H. Kaksonen [et al.] // *Environ. research engineering and management.* – 2004. – Vol. 4, № 30. – P. 49–54.

253. Isolation of a *Rhizobium galegae* strain-specific DNA probe / E. Tas [et al.] // *Microb. Releases.* – 1994. – Vol. 2. – P. 231–237.

254. Israel D. W. Investigation of the role of phosphorus is symbiotic dinitrogen fixation / D. W. Israel // *Plant Physiology.* – 1987. – V. 84. – № 3 – P. 835–840.

255. Kanayama Y. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. II. Accumulation and properties of nitrosylleghaemoglobin in nodules / Y. Kanayama, Y. Yamamoto // *Plant Cell Physiology.* – 1990. – V. 31. – № 2 – P. 207–214.

256. Kirilenko L. Influence of biological products on the microbiocenosis soil in the rhizosphere of *Galega oritntalis* L / Lyudmyla Kirilenko, Volodymyr Patyka // *Science and World, International scientific journal.* – Volgograd, 2016. – № 12 (40). – P. 61 – 64

257. Kirilenko L. Influence plant pathogenic bacteria and fungi on the efficiency of the symbiotic system *Rhizobium galegae* – *Galega oritntalis* L /

Lyudmyla Kirilenko, Antonina Kalinichenko, Volodymyr Patyka //Wybrane zagadnienia Rolnictwa i ekologii: [monografia]. – Opole, 2016. – P. 51 – 64

258. Lang–Unnasch N., Ausubel F.M. Nodule specific polypeptides from effective alfalfa root nodules and from ineffective nodules lacking nitrogenase / N. Lang–Unnasch N., F.M. Ausubel // Plant Physiol. – 1985. – 77. – № 4. – P. 833–839.

259. Lerouge I. Identification of an ATP–binding cassette transporter for export of the O–antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an Ips mutant deficient in O–antigen / I. Lerouge, T. Laeremans, C. Verreth [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – 276. – № 20.–P. 17190–17198.

260. Lindström K. DNA homology, phage-typing, and cross-nodulation studies of rhizobia infecting *Galega species* / K. Lindström, B.D.V. Jarvis, P. E. Lindström, J.J. Patel // Can. J. Microbiol. – 1983. – 29. – P. 781–789.

261. Lindström K. Metabolic properties, maximum growth temperatures and phage-typing as a means of distinguishing *Rhizobium* sp. (*Galega*) from other fast growing rhizobia / K. Lindström, S. Lehtomäki // FEMS Microbiol. Lett. – 1988. – 50. – P. 277–287.

262. Lindström K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria / K. Lindström // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1989. – 39. – P. 365 – 367.

263. Lindstrom K. Taxonomy and phylogeny of diazotrophs / K. Lindström, G. Laguerre, P. Norman [et al.] // Biological Nitrogen Fixation for the 21–th Century. – Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ., 1997. – P. 559–570.

264. Lipopolysaccharide and protein patterns of *R. galegae*. Nitrogen fixation: hundred years after / P. Lipsanen [et al.]. – VCH Publishers, Stuttgart, Germany, 1988. – P. 478.

265. Lipsanen P. Specificity of *Rhizobium (Galega) – Galega* interaction / P. Lipsanen, K. Lindstrom // Recognition in microbe–plant symbiotic and pathogenic interactions. NATO ASI Series, 1986. – Vol. №4. – P. 113–114.

266. Lyudmyla Symochko. Soil Microbial Activity and Functional Diversity in Primeval Beech Forests / Lyudmyla Symochko, Volodymyr Patyka, Vitaly Symochko, Antonina Kalinichenko // Journal of Earth Science and Engineering. – 2015. – 5. – №6. – P. 363–371.

267. Macdowall F.D.H. Physiological acclimation to chilling temperature in symbiotically grown alfalfa / F.D.H. Macdowall // Can. J. Bot. – 1989. – 67. – № 2. – P. 352–359.

268. Mao M. Evaluation of a *Rhizobium meliloti* transconjugant for increased nodulation and biological nitrogen fixation in alfalfa / M. Mao, D.B. Hannaway // J. Plant Nutr. 1990. – 13. – № 7. – P. 795 – 815.

269. Mathan K.K. Available nitrogen status of black under the influence of continuous cropping / K.K. Mathan, K. San–Karan, N. Rana Cabushini, K.K. Krishnomoorthy // J. Indian. Soc. Soil Sci. – 1978. – 26. – № 2. – P. 166–168.

270. Modern Microbial Genetics / Ed. by N.U. Streips, R.E. Yasbin. – N. - Y.: Wiley–Liss, 2002. – 603 p.

271. Mohapatra S.S. Detection of nodule specific polypeptides from effective and ineffective root nodules of *Medicago sativa* L. / S.S. Mohapatra, A. Puhler // Plant and Soil. – 1986. – 126. – № 2/3. – P. 269 – 281.

272. Monamed L. Soil P–status and cultivar maturity effects on pea – *Rhizobium* symbiosis / L. Monamed [et al.] // Plant and Soil. – 2003. – V. 252. – № 2. – P. 339–348.

273. Neef H. Inhibitory effects of *Galega officinalis* on glucose transport across monolayers of human intestinalepithelial cells / H. Neef, P. Augustijns, P. Declercq // Pharmaceut. Pharmacol. Lett. –1996. –Vol. 6. –P. 86–89.

274. Newton W.E. Nitrogen fixation: some perspectives and prospects W.E. Newton // Proc. 1st European nitrogen fixation conference. – Szeged, 1994. – P. 1–6.

275. Nick M. Use repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint to the genomic DNA of *R. galegae* strains and to indentify the DNA obtained by sonycating luquid cultures and root nodules / M. Nick, K. Lindstrom // Syst. Appl. Microbiol. – 1994. – Vol. 17. – P. 265–273.

276. Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications Proc. 10-th Int. Congr. Nitrogen Fixation / Eds. I.A.Tikhonovich, N.A.Provorov, V.I.Romanov, W.E.Newton. – Dordrect etc.: Kluwer Acad. Publ., 1995. – 822 p.

277. Noel K.D.R.Varying the abundance of O–antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris* / K.D.R. Noel, L.E. Forsberge, R.W. Carlson // J. Bacteriol. – 2000. – 182. – № 19. – P. 5317 – 5324.

278. Obaton M. Bases ecologique de l’amelioration de la fixation symbiotique legumineuses–*rhizobium* / M. Obaton, R. Bardin // Connais sci. ecol. et develop, et gestion ressours et espace Tourneis sci. – 1979. – P. 19–21.

279. Orchard V.A. Relation between soil respiration and soil moisture / V.A. Orchard, F.G. Cook // Soil Biol. Biochem. – 1983. – 15. – P. 447–453.

280. Postma J. Influence of different initial soil moisture content on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii / J. Postma, J.A. Van Veen, S. Walter // Soil Biol. Biochem. – 1989. – 21. – P. 437–442.

281. Pundarikakshudu K. Anti-bacterial activity of Galega officinalis L (goat’srue) / K. Pundarikakshudu, J. K. Patel, M.S. Bodar, S.G. Deans // J. Ethnopharmacol. — 2001 — Vol. 77. — P. 111–112.

282. Reznikoff W.S. Tn5 as a model for understanding DNA transposition / Reznikoff W.S. // Mol. Microbiol. – 2003. – 47. – P. 1199–1206.

283. Rerkasem B. Legume–*rhizobium* symbiotic development in rize–based multiple cropping systems / B. Rerkasem, D. Tongkumdee // Curr. Perspect. Nitrogen fixation: Proc. 4 Int. Symp. nitrogen fixation, Canberra, 1–5 Dec., 1980. – Amsterdam ets., 1981. – 435 p.

284. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Спайнка Г., Кондороши А.,

Хукаса П. Рус. перевод под ред. Тихоновича И. А., Проворова Н. А. – СПб., 2002. – 567 с.

285. Sawada H. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised description for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes* / H.A. Sawada, H. Oyaizu, S. Matsumoto // *Int. Syst. Bacterial.* – 1993. – Vol. 43. – P. 694–702.

286. Schilling G. Pflanzenemahrung und Dungung / Schilling G. – Stuttgart: Verl. Eugen Ulmer, 2000. – 464 S.

287. Scotti M.R. Changes in electroforetic of lipopolysaccharides from competitive strains of *Bradyrhizobium spp.* induced by soybean roots / M.R. Scotti, D.R. Carvalho–Silva, M.A.T. Vargas [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 1997. – 83. – P.552–560.

288. Seidel S. Using omethoate insecticide and legume inoculant on seed / S. Seidel, G.E. O'Connor, M. Watt Sutherland // *Austral. J. Exp. Agric.* – 1991. – 31.– № 1.–P. 71–76.

289. Semaj R. Effects of salinity and nitrogen source on growth and nitrogen fixation in alfalfa / R. Semaj, J. Drevon // *J. Plant Nutr.* – 1998. – 21, № 9. – P. 1805–1818.

290. Semaj R. Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion and ion distribution in soybean, common bean, and alfalfa / R. Semaj, H. Vasquez–Diaz, J.J. Drevon // *Ibid.* – № 3. – P. 475–488

291. Shoushtari N.H. Mesquite *rhizobia* isolated from the Sonoran desert: competitiveness and survival in soil / N.H. Shoushtari, I.L. Pepper // *Soil. Biol. Biochem.* – 1985.–17. – P. 803–806.

292. Simon R. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gramnegative bacteria / R. Simon, U. Priefer, A.A. Puhler // *Biotechnology.* – 1983. – 1. – P. 784–791.

293. Speidel D.M. The natural geochemistry of our environment / D.M. Speidel, A.F. Agnev. – Boulder (Col): West view press, 1982. – P. 214.

294. Staley T. E. Growth of perennial forage legumes in acidic soils of the Appalachian hill-land after liming / T. E. Staley // *Journal of Plant Nutrition*. – 1993. – V. 16. – № 12. – P. 2577–2590.

295. Streeter J. G. Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules / J. G. Streeter // *Plant Cell Environment*. – 2003. – V. 26. – № 8. – P. 1199–1204.

296. Symbiotic and Genetic Diversity of *Rhizobium galegae* Isolates Collected from the *Galega orientalis* Gene Center in the Caucasus / E.E. Andronov, Z. Terefework, M.L. Roumiantseva [et al.] // *Appl Environ Microbiol*. – 2003. – 69(2). P. – 1067–1074.

297. Tresner H.D. Soil microfungi in relation to the hardwood forest continuum in Sourher Wisconsin / H.D. Tresner, V.H. Backus, J.T. Curtis // *Mycologia*. – 1954. – 46. – №3. – P. 314–333.

298. Tsurumaru I.L. The efficient strategy of plasmid rescue from Tn5 mutants derived from *Bradyrhizobium japonicum* Is-1, based on whole genome sequence information of strain USDA110 / I.L. Tsurumaru, T. Yamakawa, M. Tanaka, M. Sakai // *J. Bac. Agr., Kyushu Univ.* – 2008. – 53. – № 1. – P. 27–31.

299. Tuzimura K. Difference in the rhizosphere effect on *Rhizobium trifolii* and *Rh. meliloti* between soils. Ecology of root nodule bacteria in soil / K. Tuzimura, J. Watanabe – *Soil Science and Plant Nutrition*. – 1965. – V. 10. – № 3. – P. 134.

300. Varis Eero. Goats rue a potential pasture legume for temperate conditions / Eero Varis // *Y. Agr. Sci. Fine*. – 1986. – 58. – № 2. – P. 83–101.

301. Verchenko L. Yn. The effect of increasing levels of mineral nitrogen on the productivity of symbiotic nitrogen fixation / L. Yn. Verchenko // *Soil Biology Conserve Biosphere*. – 1984. – V. 2. – P. 487–493.

302. Virtanen A.I. Biological nitrogen fixation / A.I. Virtanen, J.K. Miettinen // *Plant Physiology* – 1963. – P. 104–109.

303. Weblock D.N. DNA Homologies between *Rhizobium fredii*, *Rhizobia* that nodulate *Galega sp.*, and other *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species / D.N. Weblock, B.D.W. Jarvis // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1986. – Vol. 36. – P. 550–558.

304. White P. F. Effect of soil pH and texture on the growth and nodulation of lupine / P.F. White, A.D. Robson // Australian Journal of Agricultural Research. – 1989. – V. 40. – № 1. – P. 63–73.

305. Zahran H.H. Effect of sodium chloride and polyethyleneglycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum* / H.H. Zahran, J.I. Sprent J.I. // Planta. – 1986. – 167. – P. 303–307.

ДОДАТКИ

Додаток А
Таблиця А.1

Декадні і місячні температури повітря у роки проведення досліджень, за 2012 – 2014 рр., °С
(за даними Вінницького обласного центру гідрометеорології)

Роки	Декади	Місяці						Середня за вегетаційний період
		V	VI	VII	VIII	IX	X	
2012	I	18,6	18,1	24,7	22,9	17,1	13,2	21,0
	II	15,8	21,4	20,2	16,2	17,0	9,3	
	III	17,2	19,8	22,5	19,5	14,7	7,1	
	За місяць	17,2	19,8	22,5	19,5	16,3	9,8	
2013	I	18,1	17,2	19,7	21,1	13,7	6,3	19,1
	II	18,8	19,9	18,3	19,6	13,6	10,0	
	III	15,5	20,8	18,6	15,8	8,3	11,6	
	За місяць	17,4	19,3	18,8	18,7	11,8	9,3	
2014	I	12,1	18,1	19,1	23,5	17,4	9,2	18,8
	II	15,0	16,3	20,3	20,9	15,1	11,2	
	III	19,3	15,5	21,2	16,1	10,8	1,5	
	За місяць	15,6	16,6	20,3	20,0	14,5	7,1	
середня багаторічна		+13,6	+16,7	+18,7	+17,8	+12,9	+7,5	14,5
2012 ± до норми		3,6	3,1	3,8	1,7	3,4	2,3	3,0
2013 ± до норми		3,8	2,6	0,1	0,9	-1,1	1,8	1,4
2014 ± до норми		2	-0,1	1,6	2,2	1,6	-0,4	1,2

Додаток А. 1
Таблиця А.1.1

Декадні і місячні суми опадів у роки проведення досліджень, за 2012 – 2014рр., мм
(за даними Вінницького обласного центру гідрометеорології)

Роки	Декади	Місяці						Сума за вегетаційний період
		V	VI	VII	VIII	IX	X	
2012	I	10,5	51,1	2,8	3,9	2,9	16,1	288,8
	II	5,0	5,6	29,8	41,4	0,5	6,8	
	III	7,6	15,1	21,4	40,0	8,3	20,0	
	За місяць	23,1	71,8	54,0	85,3	11,7	42,9	
2013	I	0	25,4	0,2	6,5	13,0	0	414,3
	II	19,9	68,0	10,0	8,0	86,4	7,3	
	III	50,5	34,1	11,8	45,6	22,4	5,2	
	За місяць	70,4	127,5	22,0	60,1	121,8	12,5	
2014	I	7,9	29,3	25,5	9	0	0	367,6
	II	47,5	0	35,1	0	0	16,2	
	III	79,2	24,2	10,7	37,2	32,1	13,7	
	За місяць	134,6	53,5	71,3	46,2	32,1	29,9	
Середня багаторічна норма		63	77	76	72	47	44	379
2012 ± до норми		-39,9	-5,2	-22	+13,3	-35,3	-1,1	-90
2013 ± до норми		+7,4	+50,5	-54	-11,9	74,8	-31,5	+35
2014 ± до норми		+71,6	-23,5	-4,7	-25,8	-14,9	-14,1	-11





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95714** (13) **U**

(51) МПК (2015.01)

C05F 11/08 (2006.01)*C12N 1/20* (2006.01)*C12R 1/41* (2006.01)*A01N 63/02* (2006.01)*A01P 21/00*

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 02672	(72) Винахідник(и): Кириленко Людмила Василівна (UA), Коць Сергій Ярославович (UA), Маменко Павло Миколайович (UA), Шкатула Юрій Миколайович (UA), Гнатюк Тетяна Тарасівна (UA), Патика Володимир Пилипович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.03.2014	(73) Власник(и): ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Сонячна, 3, м. Вінниця, 21008 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.01.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.01.2015, Бюл.№ 1	

**(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ RHIZOBIUM GALEGAE L2 (КОЛЕКЦІЯ ІМІВ НАУ УКРАЇНИ) ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ
БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ПІД КОЗЛЯТНИК СХІДНИЙ**

(57) Реферат:

Штам *Rhizobium galegae* L2 для одержання бактеріального добрива під козлятник східний.

UA 95714 U

«Затверджую»

Ректор Полтавської
Державної аграрної
Академії, професор

В. І. Аранчій

2016 р.

АКТ

про впровадження результатів
кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи *Кириленко Людмили Василівни* на тему: «ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ *RHIZOBIUM GALEGAE* – КОЗЛЯТНИК ЗА ДІЇ ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ», яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, впроваджено у навчальний процес Полтавської державної аграрної академії при викладанні дисциплін: «Біологія», «Мікробіологія», «Фітопатологія», «Прикладна екологія».

Для практичних занять із зазначених навчальних дисциплін, що читаються на факультеті агротехнології та екології, використано такі положення дисертації: особливості будови та життєвих циклів фітопатогенних бактерій та грибів як неклітинних та клітинних форм життя; вплив негативних чинників на агрофітоценози; залежність стійкості та продуктивності агроєкосистем щодо біотичних та абіотичних факторів середовища.

Зазначені положення є важливими складовими у підготовці фахівців ОКР «бакалавр» з галузі знань 0401 – «Природничі науки», напряму підготовки 6.040106 – «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» тощо.

Матеріали розглянуті та схвалені на засіданні кафедри землеробства та агрохімії (протокол № 1 від 26 вересня 2016 р.).

Декан факультету,
к.с.-г.н., доцент

Завідувач кафедри,
к.с.-г.н., доцент



М.М.Маренич

О.В.Міщенко

«Затверджую»

Ректор Харківського
національного аграрного
університету

ім. В.В. Докучаєва, професор



В.К. Пузік

2016 р.

АКТ

**про впровадження результатів
кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес**

Даним актом підтверджується, що результати дисертаційної роботи **Кириленко Людмили Василівни** на тему «**Особливості функціонування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник за дії фітопатогенних мікроорганізмів**», представленої на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук зі спеціальності 03.00.07 – мікробіологія, впроваджено у навчальний процес у Харківському національному аграрному університеті ім. В.В. Докучаєва при викладанні дисциплін «Мікробіологія з основами вірусології», «Загальна мікробіологія», «Фізіологія рослин з основами біохімії», «Фізіолого-біохімічні аспекти стійкості рослин проти хвороб», «Фізіологія стресу і адаптації рослин».

Для лабораторно-практичних занять із зазначених дисциплін, що читаються на кафедрі ботаніки і фізіології рослин, використано такі положення дисертації: особливості будови та життєвих циклів фітопатогенних бактерій та грибів; вплив негативних чинників на агрофітоценози, залежність продуктивності агроєкосистем від впливу біотичних і абіотичних чинників середовища.

Зазначені положення є важливими складовими у підготовці фахівців ОКР «бакалавр» з галузі знань 0901 «Сільське господарство і лісівництво», напрямів підготовки 6.090105 «Захист рослин» та 6.090101 «Агрономія» та у магістерській програмі зі спеціальності 202 «Захист рослин».

Матеріали розглянуті і схвалені на засіданні кафедри ботаніки і фізіології рослин ХНАУ ім. В.В. Докучаєва (протокол № 8 від 30.08.2016 р.).

Декан факультету
захисту рослин канд. с.-г. наук, доцент

І.В. Забродіна

Завідувач кафедри
ботаніки і фізіології рослин
д-р біол. наук, професор

Ю.С. Колупаєв



УКРАЇНА

Міністерство аграрної політики та продовольства України

Вінницька обласна державна адміністрація

ДЕПАРТАМЕНТ

АГРОПРОМИСЛОВОГО РОЗВИТКУ

вул. Соборна, 15-а, м. Вінниця, 21100 Тел. (0432) 67-08-20, факс 67-08-39
email: upr_agro@vin.gov.ua Код ЄДРПОУ 33716544

17.10.2016р. № 04-02-24/2150

На № _____ від _____

Довідка

Департамент агропромислового розвитку Вінницької обласної державної адміністрації засвідчує, що наукові розробки аспіранта Вінницького національного аграрного університету (2012-2014 рр.) Кириленко Людмили Василівни в напрямку удосконалення технології вирощування козлятнику східного з використанням нового ефективного штаму *Rhizobium galegae* J12 для інокуляції насіння бобових культур, зокрема козлятнику східного, прийняті до впровадження в агроформуваннях Вінниччини.

Рекомендації за результатами досліджень Кириленко Л.В. будуть включені в методичні розробки відділу організації виробництва та маркетингу продукції рослинництва.

Директор Департаменту



Микола НЕЇЛИК

ЗАТВЕРДЖУЮ

Голова СФГ «Надія М.В.»

Мартинюк В.П.

16 листопада 2015 р.



АКТ

ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

завершених науково-дослідних робіт

1. Назва науково-технічної продукції (НТП): «Удосконалена технологія вирощування козлятнику східного»
2. Назва науково-дослідної роботи: «Особливості функціонування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник східний за дії фітопатогенних мікроорганізмів»
3. Підрозділ, установка-розробник: відділ фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.
4. Автори завершеної НТП: Патика В. П. зав. відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології д. б. н., професор, академік НААН, Кириленко Л.В. асистент кафедри садово-паркового господарства, садівництва та виноградарства Вінницького національного аграрного університету.
5. Місце проведення впровадження НТП: СФГ «Надія М.В.», с. Заруддя, Оратівський район, Вінницька область.
6. Рік та обсяг впровадження: 2014- 2015 рр., площа впровадження 25 га.
7. Умови проведення впровадження НТП: розробка впроваджувалась на темно-сірих опідзолених ґрунтах в умовах достатнього зволоження під час вегетації травостоїв та підвищеного температурного режиму повітря.
8. Суть впровадженої НТП: впроваджено нову модель технології вирощування козлятнику східного, що включає оброблення насіння перед сівбою новим ефективним штамом бульбочкових бактерій *Rhizobium Galegae* Л2.
9. Результати впровадження:

а) показники продуктивності: за результатами впровадження травоскісного використання при застосуванні запропонованої розробки забезпечили, в сумі за два роки вирощування, урожайність зеленої маси 48,4 т/га, що на 4,5 т/га більше, ніж за проведення інокуляції штамом еталонном 159.

б) дані економічної ефективності: собівартість 1 т сіна залежно від впровадження склала 512 грн., окупність затрат становила 1,9 грн. кожен витрачену гривню, рівень рентабельності технології досягав 85 %.

Відповідальні виконавці:

Від наукової установи:

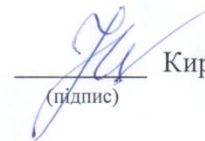
Патика В.П.
зав. відділу фітопатогенних бактерій
Інституту мікробіології і вірусології
д. б. н., професор, академік НААН



(підпис)

Патика В.П.

Кириленко Л.В.
асистент кафедри
садово-паркового господарства,
садівництва та виноградарства
Вінницького національного
аграрного університету

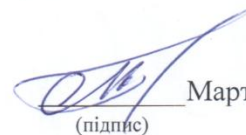


(підпис)

Кириленко Л.В.

Від виробництва:

Голова СФГ «Надія М.В.»



(підпис)

Мартинюк В.П.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Голова ТОВ «Скоморошківське»   17 грудня 2015 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Вінницького національного
аграрного університету
 Яремчук О.С.
 17 грудня 2015 р.

АКТ
виробничої перевірки

1. Назва установи: *Вінницький національний аграрний університет Міністерства освіти і науки України.*
2. Назва закінченої НДР, поставленої на виробничу перевірку: *Особливості функціонування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* — козлятник східний за дії фітопатогенних мікроорганізмів.*
3. Автори завершеної НДР: *Патика Володимир Пилипович - доктор біологічних наук професор, академік НААН, зав. відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.*
Кириленко Людмила Василівна - асистент кафедри садово-паркового господарства, садівництва та виноградарства Вінницького національного аграрного університету.
Виробнича перевірка проводилась в ТОВ «Скоморошківське», с. Скоморошки, Оратівського району, Вінницької області.
4. Відповідальний з проведення виробничої перевірки:
від *Вінницького національного аграрного університету:*
Кириленко Л.В., асистент кафедри садово-паркового господарства, садівництва та виноградарства;
- *від ТОВ «Скоморошківське»: Мартинюк О.М., головний агроном.*
5. Умови проведення перевірки: *Лісостеп правобережний, ґрунти темно-сірі опідзолені, клімат помірно-континентальний.*
6. Обсяг виробничої перевірки 35 га.
7. Строк перевірки-2014- 2015рр.
8. Попередник - *озима пшениця.*
9. Сорт козлятнику східного - *Кавказький бранець.*
10. Методика проведення виробничої перевірки:
- *сівба в другій половині квітня;*

- норма висіву 5 млн./га схожих насінин;
- в день сівби проводили оброблення насіння новим ефективним штамом бульбочкових бактерій *Rhizobium Galegae* Л2.

11. Порівняння проводили з базовою технологією вирощування козлятнику східного, що ґрунтується на обробленні насіння перед сівбою штамом еталоном №159.

12. Результати, які характеризують ефективність наукової розробки в порівнянні з базовою технологією:

Варіанти	Урожайність зеленої маси, т/га	Приріст урожаю	
		т/га	%
базова технологія: оброблення насіння перед сівбою штамом еталоном №159	44,5	–	–
рекомендована технологія: оброблення насіння перед сівбою новим ефективним штамом бульбочкових бактерій <i>Rhizobium Galegae</i> Л2	49,8	5,3	11,9

Рівень рентабельності технології склав 87 %, а собівартість однієї тони сіна становила 507,8 грн./га. -

13. Рекомендації виробництву: в умовах правобережного Лісостепу на темно-сірих опідзолених ґрунтах висівати козлятник східний з передпосівним обробленням насіння штамом бульбочкових бактерій *Rhizobium Galegae* Л2.

Доктор б. н., професор,
академік НААН,
зав. відділу фітопатогенних бактерій
Інституту мікробіології і вірусології


(підпис)


В.П. Патика

Асистент ВНАУ


(підпис)

Л.В. Кириленко

Головний агроном


(підпис)

О.М. Мартинюк

ЗАТВЕРДЖУЮ



Голова СФГ «Ескіт»

Виходзь П.В.

26 листопада 2015 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Вінницького національного
аграрного університету

Яремчук О.С.

26 листопада 2015 р.

АКТ

виробничої перевірки

1. Назва установи: *Вінницький національний аграрний університет Міністерства освіти і науки України.*

2. Назва закінченої НДР, поставленої на виробничу перевірку: *Особливості функціонування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник східний за дії фітопатогенних мікроорганізмів.*

3. Автори завершеної НДР: *Патика Володимир Пилипович – доктор біологічних наук, професор, академік НААН, зав. відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.*

Кириленко Людмила Васиївна – асистент кафедри садово-паркового господарства, садівництва та виноградарства Вінницького національного аграрного університету.

Виробнича перевірка проводилась в СФГ «Ескіт», с. Рожична, Оратівського району, Вінницької області.

4. Відповідальний з проведення виробничої перевірки:

– від Вінницького національного аграрного університету: *Кириленко Л.В., асистент кафедри садово-паркового господарства, садівництва та виноградарства;*

– від СФГ «Ескіт»: *Виходзь Ю.П., агроном.*

5. Умови проведення перевірки: *Лісостеп правобережний, ґрунти темно-сірі опідзолені, клімат помірно-континентальний.*

6. Обсяг виробничої перевірки 23 га.

7. Строк перевірки–2014- 2015 рр.

8. Попередник – *озима пшениця.*

9. Сорт козлятнику східного – *Кавказький бранець.*

10. Методика проведення виробничої перевірки:

– сівба в другій половині квітня;

– норма висіву 5 млн./га схожих насінин;

Продовження додатку Ж

– в день сівби проводили оброблення насіння новим ефективним штамом бульбочкових бактерій *Rhizobium Galegae* Л2.

11. Порівняння проводили з базовою технологією вирощування козлятнику східного, що ґрунтується на обробленні насіння перед сівбою штамом еталоном №159.


12. Результати, які характеризують ефективність наукової розробки в порівнянні з базовою технологією:

Варіанти	Урожайність зеленої маси, т/га	Приріст урожаю	
		т/га	%
базова технологія: оброблення насіння перед сівбою штамом еталоном №159	43,7	–	–
рекомендована технологія: оброблення насіння перед сівбою новим ефективним штамом бульбочкових бактерій <i>Rhizobium Galegae</i> Л2	47,9	4,2	9,6

Рівень рентабельності технології склав 82,4 %, а собівартість однієї тони сіна становила 520,7 грн./га.

13. Рекомендації виробництву: в умовах правобережного Лісостепу на темно-сірих опідзолених ґрунтах висівати козлятник східний з передпосівним обробленням насіння штамом бульбочкових бактерій *Rhizobium Galegae* Л2.

Доктор б. н., професор,
академік НААН,
зав. відділу фітопатогенних бактерій
Інституту мікробіології і вірусології


(підпис)


В.П. Патика

Асистент ВНАУ


(підпис)

Л.В. Кириленко

Агроном


(підпис)

Ю.П. Виходзь

Динаміка чисельності мікроорганізмів у сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті при вирощуванні *Galega oritntalis* L. за різних видів добрив

Варіант	Контроль	N ₃₀ P ₃₀ K ₃₀	<i>Rhizobium galegae</i> Л2 (ризобофіт)
Бацили (млн/г)			
Травень	0,72	2,31	3,76
Червень	1,44	3,32	7,10
Липень	3,01	6,05	10,32
Серпень	2,24	4,11	7,17
Вересень	1,06	2,28	4,25
НІР _{0,5}	0,52	0,71	1,15
Олігонітрофіли (млн/г)			
Травень	6,05	9,11	10,38
Червень	2,43	4,15	6,25
Липень	1,92	2,97	6,15
Серпень	1,84	2,43	4,13
Вересень	0,71	2,10	4,25
НІР _{0,5}	1,32	2,02	1,97
Гриби (тис/г)			
Травень	0,10	0,09	4,69
Червень	2,55	4,87	5,34
Липень	1,97	3,85	5,08
Серпень	1,37	2,25	4,33
Вересень	1,55	2,50	4,53
НІР _{0,5}	0,36	0,97	0,43

Урожайність листостеблової маси сортів козлятнику східного та її розподіл за роками досліджень залежно від проведення інокуляції, 2012-2014 рр.

Сорти	Роки	Варіант	Урожайність зеленої маси, т/га
Салют	2012	контроль (без інокуляції)	13,8
	2013		27,8
	2014		20,1
	2012	інокуляція ризобіфітом (<i>Rhizobium galegae</i> Л2	15,8
	2013		31,3
	2014		26,6
Донецький 90	2012	контроль (без інокуляції)	13,4
	2013		28,1
	2014		20,9
	2012	інокуляція ризобіфітом (<i>Rhizobium galegae</i> Л2	16,6
	2013		33,3
	2014		24
Кавказький бранець	2012	контроль (без інокуляції)	17,3
	2013		29,2
	2014		21,6
	2012	інокуляція ризобіфітом (<i>Rhizobium galegae</i> Л2	20,1
	2013		36,3
	2014		25,9
НІР _{0,5} т/га	2012		0,94
	2013		1,06
	2014		1,12