

ЕФЕКТИВНІСТЬ ФОРМУВАННЯ І ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ СОЇ ЗА ОБРОБКИ ПОСІВІВ ГЛІФОСАТ

І. І. ГУМЕНЮК, кандидат біологічних наук,
завідувач лабораторії екології мікроорганізмів

А. С. ЛЕВІШКО, кандидат біологічних наук,
завідувач лабораторії екології вірусів та біобезпеки

О. С. ДЕМ'ЯНЮК, доктор сільськогосподарських наук,
професор, член-кореспондент НААН

Інститут агроекології і природокористування НААН, м. Київ, Україна

Анотація. У польових умовах досліджено ефективність формування та функціонування симбіотичної системи сої за обробки посівів гліфосатом та передпосівної інокуляції насіння різними штамами *Bradyrhizobium*. З урахуванням того, що гліфосат може впливати на симбіотичну азотфіксацію як через пряму дію на ризобії, так і на симбіотичні утворення, зразки рослин для аналізу відбирали через чотири тижні після кожної обробки гліфосатом та визначали надземну масу рослин, утворення симбіотичного апарату оцінювали за кількістю, масою бульбочок на їхніх коренях та активністю азотфіксації. Встановлено, що пізня обробка (через 35 дів після посіву) гліфосатами не забезпечує достатній рівень контролю чисельності бур'янів і за високої забур'яненості посівів гальмується розвиток і ріст рослин сої, зменшується наростання надземної й кореневої маси. Обробка рослин гліфосат до утворення симбіотичного апарату (через 21 добу після посіву) знижує активність азотфіксації на 35-50 %, але це не має істотного впливу на формування врожаю сої. Отримані результати підтвердили гіпотезу про інтенсифікацію нітрогенаного комплексу під час пізньої обробки рослин гліфосат, у рослин, інокульованих штамом *Bradyrhizobium japonicum* EL-35 та композицією штамів *B. japonicum* EM-24 та *B. japonicum* EL-35. Найефективнішою для інокуляції рослин сої була суміш досліджуваних штамів *B. japonicum* EM-24 та *B. japonicum* EL-35, яка забезпечує високу активність азотфіксації та продуктивність. Отже, для зменшення негативного впливу гліфосат на активність процесу азотфіксації симбіотичних систем та отримання високої продуктивності сої необхідно відібрати штами ризобій із високою швидкістю утворення симбіотичної системи, оскільки навіть незначне зниження азотфіксації може мати довготривалі негативні наслідки.

Ключові слова: гліфосат, соя, *Bradyrhizobium*, бульбочкові бактерії, інокуляція, азотфіксування.

Вступ.

Відомо, що найрозповсюдженішим та дешевим джерелом повноцінного білка є зернобобові культури, серед яких важливе господарське значення має соя (*Glycine max*). Це одна з найцінніших бобових культур. Соевий білок унікальний за своїми властивостями, містить незамінні амінокислоти і за складом наближається до білка тваринного походження та добре засвоюється організмом людини і тварин (Oehrle, 2008). Крім того, у зерні сої містяться жири, вуглеводи, мінеральні речовини, вітаміни. Такі важливі компоненти сої дають змогу широко використовувати продукти її переробки в харчуванні людини та годівлі тварин, а також застосовувати як сировину в інших галузях промисловості та медицини (Reganold, 2016; Тильба, 2012).

Офіційні статистичні дані свідчать, що у 2019 – 2020 рр. у світі було вироблено приблизно 336 млн т зерна сої. Приріст виробництва сої впродовж останніх 5 років складає 26 млн т або 8 %. Провідними світовими виробниками сої є Бразилія (123,0 млн т), Сполучені Штати Америки (96,6 млн т), Аргентина (53,0 млн т) і Китай (17,1 млн т). У світовому масштабі 81 % виробництва сої належить Бразилії, США та Аргентині. Європейським лідером за обсягом виробництва сої є Італія. В Україні у 2019 році виробництво сої становило 3,69 млн т із середньою врожайністю 22,9 ц/га (Державна служба статистики України. URL : <http://ukrstat.gov.ua>; Bohn, 2014).

Останніми роками генетично модифіковані (ГМ) рослини набули широкої популярності. Серед трансгенних культур найпоширенішими є соя, кукурудза, бавовна й рапс. Лідером

вважається соя, завдяки її функціональним властивостям, харчовій цінності та низькій собівартості завдяки створенню гліфосат-резистентних (Roundup Ready-RR) варіантів цієї культури (Arregui, 2004; Miyazaki, 2019). Відомо, що США та Аргентина виробляють майже виключно ГМ-сою. Сьогодні в Україні заборонено вирощувати ГМ рослини із комерційною метою та водночас не можна займатися вирощуванням для продажу сортів та ліній, які не внесені до державного реєстру сортів. Оскільки у вітчизняному реєстрі немає жодного такого сорту, то відповідно й вирощувати ГМО в Україні для продажу не можна.

ГМ рослини створюють для того, щоби змінити їхні агробіологічні показники, а саме: забезпечити стійкість до шкідників і хвороб, гліфосатів, засолення, екстремальних температур; стабілізувати якість кінцевої продукції; розв'язати проблему біопалива, вирішити питання очищення навколишнього природного середовища від полютантів. А головне – це дешевизна трансгенних продуктів харчування, що вирішує глобальну продовольчу проблему людства.

У глобальному масштабі, гліфосат-толерантна соя є номером один серед ГМ-культур. Гліфосат є найбільш широко використовуваним для вирощування даної культури, що призвело до швидкого розповсюдження сої стійкої до його впливу у всьому світі. На ринку цей вид сої широко присутній та продається під маркою «Roundup Ready» GTS 40-3-2 або RR-соя. Уперше гліфосатні властивості цієї речовини були виявлені в 1970 році Джоном Францем (компанія «Монсанто»). «Roundup» – торгова марка гліфосату (Benbrook, 2016).

Гліфосат (N-(фосфометил)-гліцин, $C_3H_8NO_5P$) – є похідним амінокислоти гліцину та нині це найпоширеніший неселективний системний гліфосат у всьому світі (Benachour, 2009; Vecchio, 2009; Duke, 2012).

ГМ-соєа містить повну копію гену 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтази з ґрунтової бактерії *Agrobacterium* sp. CP4. Це, власне, робить соєу стійкою до гліфосату, який широко застосовують на полях для боротьби з бур'янами (Natarajan, 2007; Sz, 2007).

Токсична дія гліфосату зумовлена інгібуванням ферменту 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу, який є компонентом ферментної системи шикіматного шляху біосинтезу бензоїдних ароматичних сполук та здійснює одну зі стадій перетворення шикімату в хоризмат, який є попередником трьох ароматичних протеїногенних амінокислот (фенілаланін, тирозин, триптофан), пара-амінобензоату та низки інших важливих метаболітів (фенолів, ароматичних кислот, алкалоїдів, фітогормонів та ін.). Гліфосат окуповує в активному центрі місце фосфоенолпірувату та блокує його активність. Тому, у разі потрапляння на рослину він проникає в клітини, блокує синтез важливих компонентів і спричиняє загибель рослини.

Відомо, що гліфосати, можуть негативно впливати на ґрунтові мікроорганізми, завдяки зміни в кількості та якості кореневих виділень оброблених рослин (Duke, 2012). Але також часто це залежить від активних та допоміжних речовин препарату, дози, кліматичних умов, типу ґрунту. Деякі дослідження показали, що гліфосат негативно впливає на ризобії та шкодить процесу нодуляції в бобових рослин. Вважають, що ризик токсич-

ності гліфосатів для мікроорганізмів вищий, ніж для рослин, внаслідок утворення продуктів метаболізму, які можуть інгібувати біохімічні процеси, пов'язані із симбіозом рослини та ризобій (Kremer, 2014). Токсичність гліфосату низька для тварин, але час напіврозпаду його в ґрунті може сягати 40 діб, що є достатнім для негативного впливу на процес нодуляції сої та ґрунтового мікробіому. Як уже було зазначено, гліфосат призводить до інгібування синтезу ароматичних амінокислот, що може бути причиною його токсичної дії на мікроорганізми (dos Santos, 2005). Проте, ще в 1986 році додаванням ароматичних амінокислот у поживне середовище показав, що ріст штамів *Rhizobium japonicum* не залежить від дії гліфосату (Moorman, 1986).

Результати роботи вчених демонструють токсичну дію, як безпосередньо, гліфосату, так і його допоміжних речовин присутніх у комерційних композиціях гербіцидів, що позначилося на розвитку багатьох ґрунтових та симбіотичних мікроорганізмів (Seminoti Jacques/de Oliveira Procópio, 2010). Так, деякі поверхнево-активні речовини (ПАР), можуть збільшити вплив гліфосату через видалення воскового шару рослин. Крім того, завдяки скороченню поверхневого натягу, полегшується проникнення гліфосат і бактерії можуть стати більш чутливими до його дії (Meena, 2020). Також було показало, що етиламін присутній у деяких гліфосатвмісних гербіцидах як ПАР сприяє більш швидкому проникненню гліфосат у клітини *Rhizobium* та пригнічує їхній ріст. Тобто, незважаючи на здатність стійких сортів постачати ароматичні амінокислоти до мікросімбіонта, додаткові речови-

ни, присутні в композиції гліфосатів, можуть негативно впливати на мікросимбіонта та процес азотфіксування (dos Santos, 2005).

Деякі наукові групи проводили дослідження з вивчення здатності ґрунтових бактерій метаболізувати гліфосат. Було показано, що *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp. та деякі представники *Rhizobiaceae*, у т.ч. *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, *Agrobacterium rhizogenes* і *A. tumefaciens* можуть його метаболізувати. Ці бактерії мають вуглець-фосфатліazu, яка гідролізує гліфосат, формуючи саркозин і неорганічний фосфат, що дає змогу їм використовувати гліфосат як єдине джерело фосфору (Meena, Kumar, 2020; Zablotowicz, 2003; Liu, 1991). Незважаючи на здатність деяких штамів *R. trifolii* до детоксикації гліфосату, його внесення в ґрунт (у кореневу зону) інгібує процес нодуляції конюшини червоної (*Trifolium pretense* L.), а також утворення бульбочок та знижує ацетиленвідновлювальну активність у конюшини підземної (*Trifolium subterraneum* L.). За одноразового внесення сублетальної дози гліфосату по вегетації, зменшується кількість бульбочок на 32 %, їхня маса на 75 % і вміст лег-гемоглобіну на 13 %, через два тижні після обробки рослин (Reddy, 2000). Варто зазначити, що навіть невелике зниження процесу фіксації азоту може мати довгострокові наслідки для сталого пулу азоту ґрунту, з огляду на широке поширення RR-сої.

Отже, аналіз результатів досліджень свідчить, що гліфосат може впливати на симбіотичну азотфіксацію як через пряму дію на ризобій, так і на симбіотичні утворення. Загалом, незважаючи на зростаючу популярність вирощування RR-сої, даних щодо утворення симбіозу цієї куль-

турою за обробки гліфосатом є суперечливою й недостатньою. Але всі дослідники одногласно вважають, що взаємодія різних штамів мікросимбіотів може істотно різнитися, а тому вибір штамів ризобій толерантних до гліфосату та створення стійкого симбіотичного апарату в бобових культур є доволі актуальним питанням.

Тому, метою нашої роботи було дослідити ефективність формування і функціонування симбіотичної системи сої за умов обробки посівів гліфосатом за інокуляції насіння штамми *B. japonicum* ЕМ-24, *B. japonicum* EL-35 та їхньою сумішшю.

Матеріали і методи дослідження.

Дослідження проведено в Інституті агроєкології і природокористування НААН у 2018 – 2020 рр.

У дослідженнях використано рослини трансгенної сої лінії GTS 40-3-2 (розробник «Monsanto») для можливості використання гліфосат як альтернативної системи боротьби з бур'янами. Вирощування генетично модифікованої сої проводили із дотриманням вимог відповідно до Закону України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні та використанні генетично модифікованих організмів», а також штамми бульбочкових бактерій *B. japonicum* ЕМ-24 і EL-35 та їх суміші.

Польові дослідження проводили на Сквирській дослідній станції органічного виробництва Інституту агроєкології і природокористування НААН (Київська обл.). Ґрунт – чорнозем типовий, з вмістом гумусу 4,3 %, легкогідролізного азоту (за Корнфільдом) 110 мг/кг; рухомих сполук фосфору (за Чиріковим) – 240 мг/кг і калію (за Чиріковим) – 85 мг/кг. Реакція ґрун-

1. Схема польового досліджу

№ варіанту	Варіант досліджу
1	Інокуляція <i>B. japonicum</i> ЕМ-24 (ручне прополювання)
2	Інокуляція <i>B. japonicum</i> EL-35 (ручне прополювання)
3	Інокуляція <i>B. japonicum</i> ЕМ-24+EL-35 (ручне прополювання)
4	Інокуляція <i>B. japonicum</i> ЕМ-24 за умов обробки гліфосатом до утворення симбіотичного апарату
5	Інокуляція <i>B. japonicum</i> EL-35 за умов обробки гліфосатом до утворення симбіотичного апарату
6	Інокуляція <i>B. japonicum</i> ЕМ-24+EL-35 за умов обробки гліфосатом до утворення симбіотичного апарату
7	Інокуляція <i>B. japonicum</i> ЕМ-24 за умов обробки гліфосатом після утворення симбіотичного апарату
8	Інокуляція <i>B. japonicum</i> EL-35 за умов обробки гліфосатом після утворення симбіотичного апарату
9	Інокуляція <i>B. japonicum</i> ЕМ-24+EL-35 за умов обробки гліфосатом після утворення симбіотичного апарату

тового розчину – 6,5. Облікова площа ділянок 10 м². Повторність триразова, розміщення – рендомізоване.

Насіння сої перед висівом у ґрунт інокулювали суспензією зазначених культур *Bradyrhizobium* однакової оптичної густини, яка складала 3×10⁸ кл/мл інокулянта. Посів сої проводили на глибину 3–5 см із розрахунку 700 тис. схожих насінин на 1 га.

Посіви сої обприскували розчином гліфосат у концентрації 3,5 л/га (рекомендована норма 2–5 л/га). Ранню обробку проводили через 21 добу після посіву (за появи масових сходів), пізню – через 35 діб після посіву. Рослини контрольних варіантів прополювали вручну. Схему польового досліджу наведено в таблиці 1.

Відбір зразків рослин для аналізу проводили через чотири тижні після кожної обробки гліфосатом. Визначали наземну масу рослин, оцінювали формування симбіотичного апарату за кількістю та масою бульбочок на їхніх коренях та їхньою азотфіксувальною активністю.

Азотфіксувальну активність визначали ацетилен-редуктазним методом (Hardy, 1968).

Обрахунок результатів дослідження виконано з використанням сучасного програмного забезпечення Statistica 8.0.

Результати дослідження та їх обговорення.

Дослідження наростання вегетативної маси сої показали, що рання обробка гліфосатом стимулює приріст надземної маси за інокуляції штамом *B. japonicum* EL-35 та сумішню обох досліджуваних штамів. На фоні пізньої обробки відбувається зниження надземної маси в усіх використаних варіантах інокуляції. Необхідно відмітити, що затримка росту рослин сої відбувалася ще до пізньої обробки рослин гліфосатом та внаслідок високої забур'яненості посівів.

Інокуляція сумішню штамів *B. japonicum* ЕМ-24+EL-35 у контрольному варіанті без обробки гліфоса-

том, на початку бутонізації знижувала приріст вегетативної маси на 16 %, а на початку цвітіння – навпаки зафіксовано найвищий приріст 66 %.

Реакція штамів на пізню обробку рослин гліфосатом була подібною. Як було зазначено вище, незалежно від взятого для інокуляції штаму обробка посівів гліфосатом істотно пригнічувала накопичення вегетативної маси рослин сої (рис. 2). У варіанті дослід з інокуляцією штамом *B. japonicum* EM-24 відмічено гальмування росту сої відразу після ранньої обробки, але згодом негативний вплив гліфосату знижувався і приріст вегетативної маси становив 27 % порівняно з необробленими. На ріст рослин сої, інокульованих штамом *B. japonicum* EL-35, рання обробка гліфосатом не впливала, а з часом наземна маса рослин у цьому варіанті зростала на 47 %. Інокуляція сої сумішшю штамів *B. japonicum* стимулювала приріст вегетативної маси на 30 % одразу ж після ранньої обробки, але в подальшому надземна маса цих рослин була меншою за рослини, які не обробляли гліфосатом.

Аналіз динаміки наростання маси коріння показав тенденцію схожу із приростом вегетативної маси. Пізня обробка гліфосатом пригнічувала розвиток коренів, за виключенням варіанту, інокульованого сумішшю штамів (порівняно з *B. japonicum* EM-24). За умов ранньої обробки маса коренів рослин інокульованих *B. japonicum* EM-24 була найменшою. У контрольному варіанті (без обробки гліфосатом) на початку бутонізації найбільшу маса коріння фіксували в рослин, інокульованих *B. japonicum* EM-24, а на початку цвітіння – маса коріння цих рослин була найменшою.

Рослини сої, інокульовані штамом *B. japonicum* EM-24, формували менш розвинену кореневу систему з меншою масою в першому відборі (фаза бутонізації) з обома варіантами обробки гліфосатом (рис. 3). У фазі початку цвітіння маса коріння збільшувалася на 5–19 % відповідно за ранньої та пізньої обробки посівів гліфосатом.

У варіанті із передпосівною інокуляцією штамом *B. japonicum* EL-35 за умов обробки гліфосатом після фор-

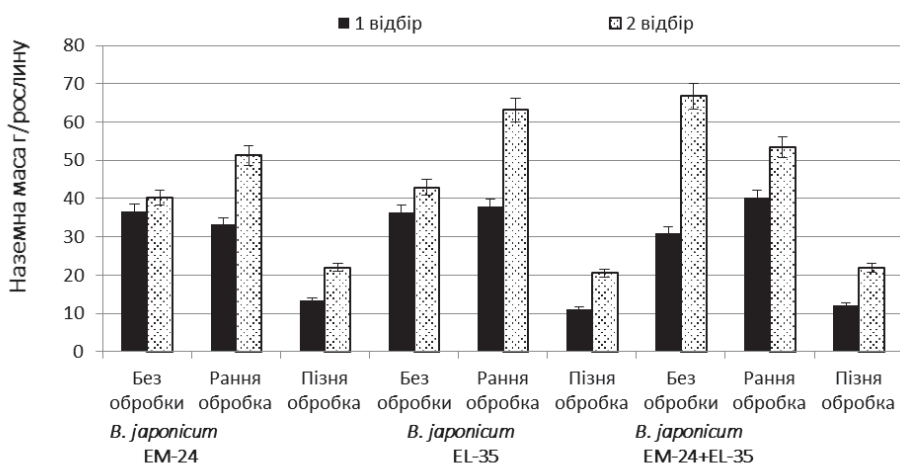


Рис. 1. Вплив інокуляції різними штамми *B. japonicum* на наростання вегетативної маси сої за умов обробки гліфосатом

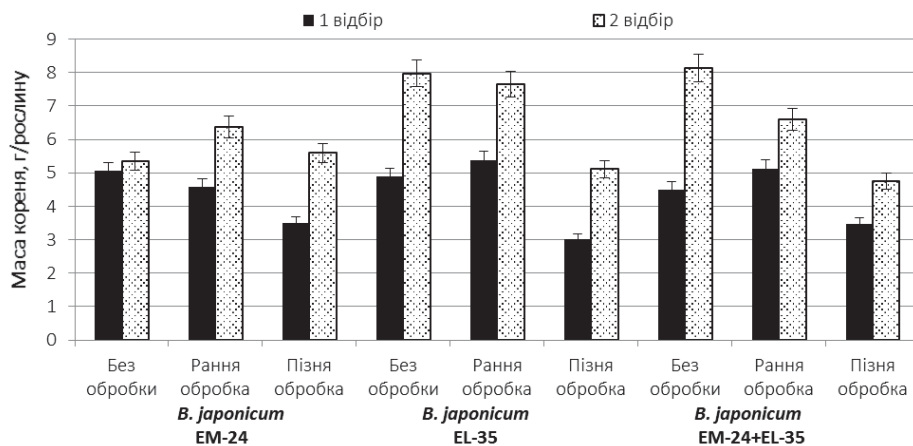


Рис. 2. Вплив інокуляції різними штамами *B. japonicum* на наростання маси кореня сої за умов обробки гліфосатом

мування симбіотичної системи (пізня обробка) фіксували зниження маси коріння на 36–39 %. Варто відмітити, що за ранньої обробки посівів гліфосатом істотного впливу на накопичення маси коріння за першого відбору не спостерігали, порівняно з контролем (без обробки гліфосатом).

У варіанті дослід з інокуляцією сумішшю штамів та обробкою посівів гліфосатом після утворення симбіотичного апарату маса коріння рослин була меншою на 33–42 % у першому та другому відборі, відповідно. За ранньої обробки гліфосатом фіксували збільшення маси коріння

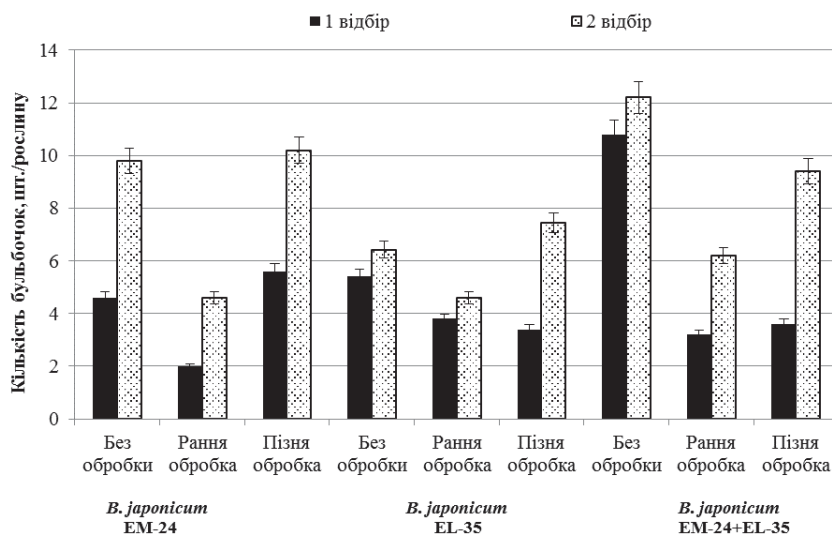


Рис. 3. Вплив інокуляції різними штамами *B. japonicum* на кількість бульбочок на коренях рослин сої за обробки посівів гліфосатом

на 14 %, але в подальшому наростання маси коріння гальмувалось і становило на 19 % менше, ніж у варіанті без застосування гліфосату.

Отже, отримані польові дані щодо наростання надземної вегетативної маси та маси кореня рослин сої свідчать про негативний вплив пізньої обробки гліфосатом на розвиток рослин. Але, затримка їхнього росту відбувалася ще до обробки рослин гліфосатом і, ймовірно, унаслідок високої забур'яненості посівів.

Після обробки цих рослин гліфосатом (2 відбір), вони дуже відставали в прирості вегетативної маси (на 69–45 %) та маси кореня (на 42–23 %). Найменший вплив цього чинника був у варіантах з інокуляцією сумішшю штамів та лише *B. japonicum* ЕМ-24.

Відомо, що критерієм ефективності комплементарної взаємодії макро- і мікросимбіонта є кількість та маса утворених кореневих бульбочок, яка за впливу гліфосатів може знижуватись 1,5–5 разів (Fan, 2017). За ранньої обробки посівів сої найбільшу

кількість бульбочок виявлено під час інокуляції штамом *B. japonicum* ЕМ-35 у фазі бутонізації (перший відбір). У фазі початку цвітіння (2 відбір) штамом *B. japonicum* ЕМ-24 і ЕМ-35 сформували однакову кількість бульбочок 3 шт./рослину, а за застосування суміші штамів – на 35 % більше.

Під час обробки рослин гліфосатом після утворення симбіозу (пізня обробка) максимальну кількість бульбочок спостерігали у варіанті з інокуляцією штамом *B. japonicum* ЕМ-24. За інокуляції сумішшю штамів (ЕМ-24 + ЕМ-35) або лише штамом *B. japonicum* ЕМ-35 кількість бульбочок зменшилась від 8 до 39 % за першого відбору.

Тобто основна кількість бульбочок утворювалася на початку бутонізації в рослин, без обробки гліфосатом або обробляли до формування симбіотичного апарату.

Обробка посівів гліфосатом до утворення симбіотичного апарату у варіанті з інокуляцією штамом *B. japonicum* ЕМ-24 спричинила зменшення утворення бульбочок на 53–57 % порівняно

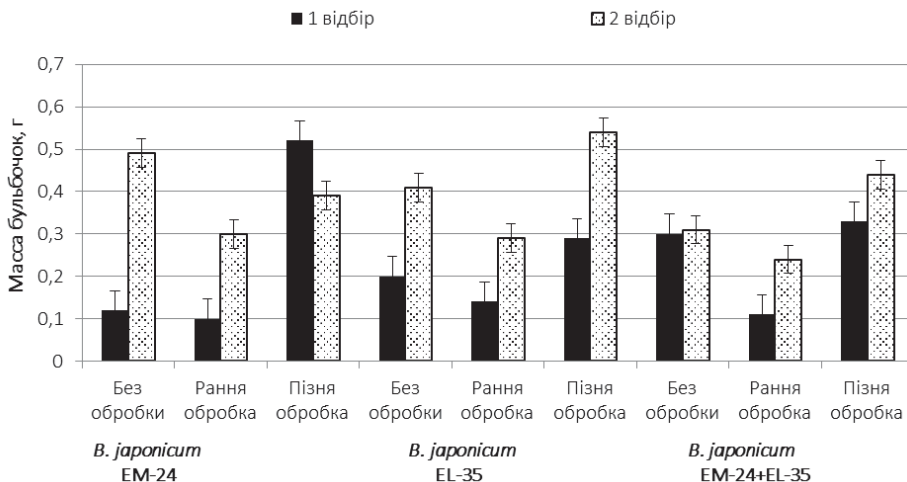


Рис. 4. Вплив інокуляції різними штамми *B. japonicum* на масу кореневих бульбочок сої за обробки посівів гліфосатом

з контролем (без обробки гліфосатом) (рис. 4). Пізня обробка не мала значного впливу на кількість утворених бульбочок у досліджуваних рослин.

У рослин, інокульованих штамом *B. japonicum* EL-35, за ранньої обробки гліфосатом на 28–30 % зменшувалось утворення бульбочок порівняно з контролем. Тоді як за пізньої обробки посівів на початку бутонізації їхня кількість зменшується до 3 шт./рослину, але на початку цвітіння – кількість бульбочок на корінні навпаки зростала на 16 %.

У варіанті досліду з інокуляцією сумішшю штамів відмічено зменшення кількості утворених бульбочок як за ранньої, так і пізньої обробки гліфосатом порівняно з необробленими рослинами в обох проведених відборах.

Рання обробка гліфосатом спричинила зниження приросту маси бульбочок у рослин, інокульованих сумішшю штамів лише у фазі початку цвітіння (2 відбір). У перший відбір (початок бутонізації) спостерігали, що рання обробка гліфосатом дала можливість сформувати найкра-

щий симбіотичний апарат, утворений за інокуляції *B. japonicum* EL-35.

За пізньої обробки гліфосатом фіксували зменшення маси бульбочок, що утворилися за інокуляції штамом *B. japonicum* EL-35 та сумішшю штамів порівняно з інокуляцією штамом *B. japonicum* EM-24. Але, необхідно відмітити, що рослини, інокульовані штамом *B. japonicum* EL-35 та сумішшю штамів, сформували найменшу кількість бульбочок. Тому, привертає увагу той факт, що маса бульбочок рослин, інокульованих вищезгаданими штамми є більшою, ніж маса бульбочок утворених за інокуляції рослин штамом *B. japonicum* EM-24.

З рисунка 5 видно, що рання обробка гліфосатом пригнічувала розвиток маси бульбочок, утворених за інокуляції штамом *B. japonicum* EM-24 на 17–39 % відповідно в 1 і 2 відборі. Пізня обробка препаратом, навпаки, спричинила збільшення їхньої маси в першому відборі втричі, проте в другому відборі – спостерігали зниження їхньої маси на 20 % порівняно з необробленими рослинами.

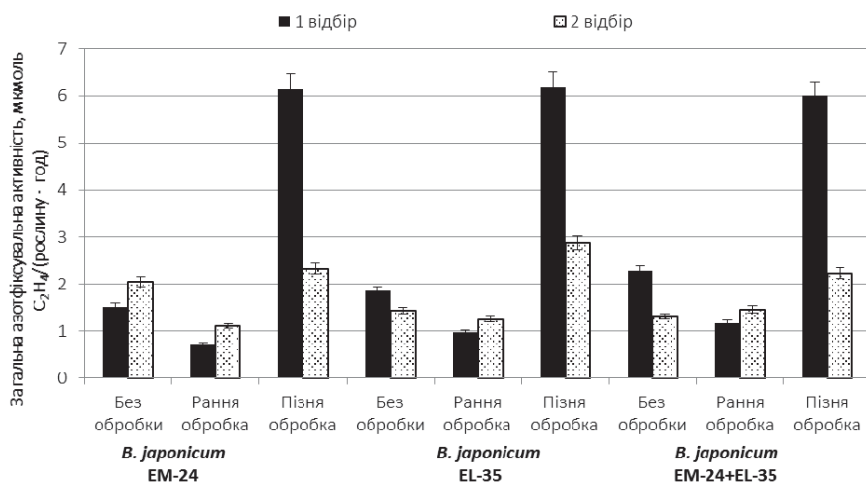


Рис. 5. Вплив інокуляції різними штамми *B. japonicum* на загальну азотфіксувальну активність сої за обробки посівів гліфосат

Зниження маси бульбочок на 30 % фіксували у варіанті з інокуляцією штамом *B. japonicum* EL-35 до фази початку цвітіння під час першого відбору.

За інокуляції сумішшю штамів спостерігали зниження маси бульбочок до 37 % за здійснення першого відбору під час ранньої обробки гліфосатом (порівняно з рослинами без обробки). І навіть у фазі цвітіння (2 відбір) їхня маса була меншою, ніж у необроблених рослин. За пізньої обробки гліфосатом приріст маси бульбочок, утворених сумішшю штамів, становив від 10 до 42 % відповідно за першого та другого відбору зразків.

Так, за пізньої обробки посівів гліфосатом рослини за першого відбору характеризувалися приростом маси бульбочок у всіх варіантах із застосуванням інокуляції порівнянні із необробленими рослинами. Також треба зауважити, що саме в даному відборі посіви сої мали високу забур'яненість. Тому, відповідне збільшення маси бульбочок у цей період ймовірно може бути пов'язане із кращим зберіганням вологи ґрунту.

Необхідно зазначити, що в рослин, не оброблених гліфосатом найвищу азотфіксувальну активність спостерігали в симбіотичній системі, сформованій за інокуляції насіння сої сумішшю штамів, на початку бутонізації та за інокуляції штамом *B. japonicum* EM-24 – на початку цвітіння.

Встановлено, що за обробки посівів гліфосатом до початку утворення симбіотичного апарату (рання обробка) у всіх відборах, високою азотфіксувальною активністю вирізнялися симбіотичні системи, сформовані сумішшю штамів *B. japonicum*. За пізньої обробки гліфосатом у першому відборі азотфіксувальна активність усіх варіантів інокуляції була майже однакова – на рівні 2,1–2,7 мкмоль C_2H_4 /рослину·год. У другому відборі азотфіксувальна активність за інокуляції штамом EL-35 була на 24 % вищою, ніж за активність симбіотичної системи, утвореної штамом *B. japonicum* EM-24, за пізньої обробки гліфосат.

На рисунку 6 показано, що рання обробка гліфосатом пригнічує азотфіксувальну активність симбіотичної сис-

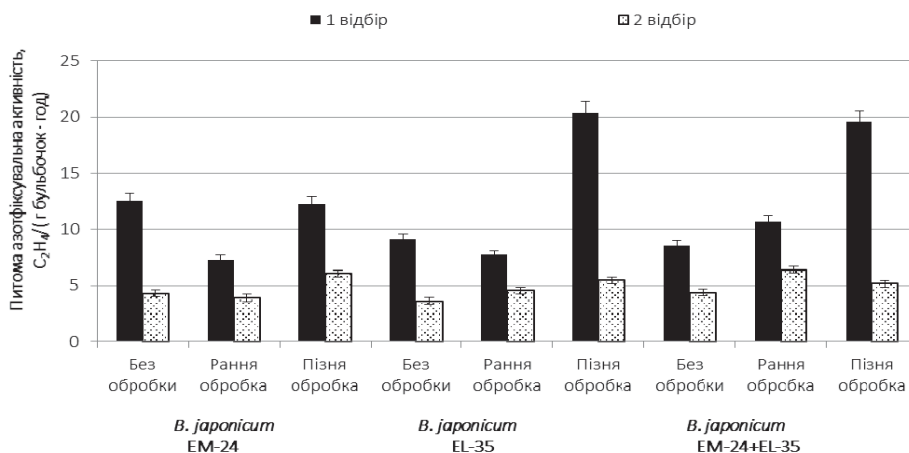


Рис. 6. Вплив інокуляції різними штамми *B. japonicum* на питому азотфіксувальну активність сої за обробки посівів гліфосат

теми, утвореної за використання всіх досліджуваних штамів *B. japonicum* як у суміші, так і окремо (порівняно із симбіотичними системами рослин, які не були ним оброблені). Виключення становили рослини в другому відборі, інокульовані сумішшю штамів, де азотфіксувальна активність зросла на 11 %, ніж без обробки гліфосатом.

За пізньої обробки гліфосатом фіксували збільшення азотфіксувальної активності в усіх інокульованих рослин – від 13 до 30 %. Варто відмітити, що у фазі бутонізації (перший відбір) азотфіксувальна активність була у 2,7 разів вищою, ніж у фазі цвітіння (другий відбір). Як було зазначено вище, у цьому варіанті обробки гліфосатом на початку бутонізації істотно збільшувалась маса бульбочок, але не відбувалося збільшення їхньої кількості. Це, ймовірно, свідчить, що в даному випадку відбувається інтенсифікація роботи нітрогеназного комплексу. Для перевірки цього припущення зроблено перерахунок загальної азотфіксувальної активності в питому азотфіксувальну активність.

Аналіз питомої азотфіксувальної активності показав, що найнижчий її рівень серед рослин, не оброблених гліфосатом, спостерігали за інокуляції насіння штамом *B. japonicum* EL-35. Рання обробка гліфосатом не мала негативного впливу на цей показник у всіх варіантах інокуляції. Найвищий рівень питомої азотфіксувальної активності зафіксовано у варіанті із передпосівною інокуляцією сумішшю штамів *B. japonicum*. За пізньої обробки гліфосатом збільшення питомої активності у фазі бутонізації становило 66 та 59% для *B. japonicum* EL-35 та суміші штамів відповідно та зменшувалось у фазі цвітіння у варіанті з інокуляцією сумішшю штамів та лише штамом *B. japonicum* EL-35 (1 відбір).

Встановлено, що за ранньої обробки посівів найбільше пригнічення питомої азотфіксувальної активності симбіотичної системи відбувалося за інокуляції штамом *B. japonicum* EM-24 (рис. 7). Обробка гліфосатом після утворення симбіотичного апарату не впливала на питому азотфіксувальну активність у фазі бутонізації та навпаки збільшувала її на 53 % у фазі цвітіння під час здійснення першого відбору.

Для рослин, інокульованих штамом *B. japonicum* EL-35, та оброблених гліфосатом до утворення симбіотичного апарату характерним було зменшення питомої азотфіксувальної активності у фазі бутонізації та збільшення у фазі цвітіння порівняно з варіантом без обробки гліфосатом. Інокуляція рослин сумішшю штамів *B. japonicum* показала позитивний результат за обох термінів обробки посівів гліфосатом. Отримані результати підтвердили наше припущення щодо інтенсифікації нітрогеназного комплексу за пізньої обробки посівів гліфосатом у рослин, інокульованих штамом *B. japonicum* EL-35 та сумішшю штамів (EM-24 + EL-35). Також, потрібно зазначити, що у фазі початку цвітіння рослини, інокульовані сумішшю штамів, мали вищу питому азотфіксувальну активність за ранньої обробки порівняно із пізньою.

Загальновідомим є той факт, що основним інтегральним показником впливу різних чинників, у даному випадку обробки гліфосатом «до» або «після» утворення симбіотичного апарату, на життєдіяльність рослин є їхня продуктивність. Аналіз отриманих даних показав, що рання обробка гліфосатом після утворення симбіотичного апарату істотно знижує продуктивність рослин сої. Рання обробка гліфосатом (ще до утворення симбіотичного апарату) не мала значного впливу на врожайність сої (табл. 2).

2. Урожайність зерна сої за обробки гліфосат та інокуляції штамми *B. japonicum*

Варіант досліджу		Урожайність зерна, ц/га
Обробка посівів гліфосатом	інокуляція насіння штамами <i>B. japonicum</i>	
Контроль (без обробки гліфосатом)	ЕМ-24	41,6±0,2
	ЕЛ-35	42,0±0,8
	ЕМ-24+ЕЛ-35	41,1±0,8
Рання (до утворення симбіотичного апарату)	ЕМ-24	39,8±1,5
	ЕЛ-35	40,9±1,4
	ЕМ-24+ЕЛ-35	39,2±1,4
Пізня (після утворення симбіотичного апарату)	ЕМ-24	28,3±1,6
	ЕЛ-35	28,5±1,8
	ЕМ-24+ЕЛ-35	24,2±1,3

Не зважаючи на істотне зростання азотфіксувальної активності в рослин, які обробляли гліфосатом після утворення симбіотичного апарату, гальмування розвитку їх надземної маси та коренів унаслідок високої забур'яненості посівів негативно вплинуло на врожайність. Також можна стверджувати, що навіть за негативного впливу гліфосат на симбіоз, кількість фіксованого ризобіями азоту є достатньою для формування врожайності зерна на рівні 24,2-42,0 ц/га. Але, кількість азоту, який залишається в ґрунті в даному випадку доволі низька, що знижує позитивну роль бобових рослин у формуванні родючості ґрунту та необхідно це враховувати в майбутньому.

Отже, пізня обробка посівів гліфосатом не є ефективною, а висока забур'яненість посівів гальмує ріст і розвиток рослин сої, знижуючи як вегетативну, так і кореневу масу. Обробка рослин гліфосат до утворення симбіотичного апарату знижує азотфіксувальну активність, але це немає значного впливу на формування врожаю зерна сої. Встановлено, що найефективнішою для рослин сої є іноку-

ляція сумішшю штамів *B. japonicum* ЕМ-24 + ЕЛ-35, яка забезпечує високу азотфіксувальну активність та продуктивність. Для зменшення негативного впливу гліфосат на азотфіксувальну активність симбіотичних систем та отримання високих врожаїв зерна сої необхідно проводити селекцію штамів ризобій, які здатні швидше утворювати симбіоз, оскільки навіть незначне зниження рівня фіксації азоту може мати довгострокові непередбачувані наслідки для формування загального пулу азоту ґрунту та його родючості.

Висновки і перспективи.

Встановлено, що за обприскування посівів гліфосат до початку утворення симбіотичного апарату (рання обробка) високу азотфіксувальну активність мали симбіотичні системи, утворені за інокуляції насіння сої сумішшю штамів *B. japonicum* (ЕМ-24 + ЕЛ-35). За пізньої обробки посівів у фазі бутонізації азотфіксувальна активність за всіх варіантів інокуляції штамми *B. japonicum* була майже на одному рівні (6,0 мкмоль C_2H_4 /рослину·год).

Однак, у фазі цвітіння азотфіксувальна активність за інокуляції штамом EL-35 була на 24 % вищою, ніж за активність симбіотичної системи з *B. japonicum* ЕМ-24 за пізньої обробки посівів сої гліфосат.

Найбільшу пригнічувальну дію гербіциду гліфосат за ранньої обробки посівів встановлено на питому азотфіксувальну активність симбіотичної системи, утвореної штамом *B. japonicum* ЕМ-24. Отримані результати підтвердили нашу гіпотезу щодо інтенсифікації нітрогеназного комплексу в рослин сої, інокульованих штамом *B. japonicum* EL-35 та сумішню штамів ЕМ-24 + EL-35, за пізньої обробки гліфосатом. Рослини, інокульовані сумішню штамів у фазі початку цвітіння мали вищу питому азотфіксувальну активність за раннього застосування гліфосат, ніж за пізнього його внесення. Отже, не зважаючи на істотне зростання азотфіксувальної активності в рослин, які обробляли гліфосатом, після утворення симбіотичного апарату, гальмування розвитку їхньої вегетативної маси та коренів у результаті високого забур'янення посівів негативно вплинуло на формування врожаю зерна. Також можна стверджувати, що навіть за негативного впливу розчину гліфосат на симбіотичну систему, кількість фіксованого ризобіями азоту є достатньою для формування врожаю на рівні 24,2-42,0 ц/га. Але, кількість азоту, який залишається в ґрунті, у даному випадку є доволі низькою, що знижує функцію бобових рослин у забезпеченні формування родючості ґрунту.

Список літератури

1. Oehrle, N.W., Sarma, A.D., Waters, J.K., Emerich, D.W. (2008). Proteomic analysis of soybean nodule cytosol. *Phytochemistry*, 69(13). 2426-2438. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.07.004.
2. Reganold, J.P.; Wachter, J.M. (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nat. Plants*, 3(2). 1-8. DOI: 10.1038/nplants.2015.221
3. Тильба, В.А., Синеговская, В.Т. (2012). Роль симбиотической азотфиксации в повышении фотосинтетической продуктивности сои. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук, 5. 16-18. DOI: 10.25230/2412-608X-2019-4-180-119-123.
4. Державна служба статистики України. URL: <http://ukrstat.gov.ua>
5. Bohn, T., Cuhra, M., Traavik, T., Sanden, M., Fagan, J., Primicerio, R. (2014). Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food Chemistry*, 153. 207-215. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.054.
6. Arregui M.C., Lenardón A., Sanchez D., Maitre M.I., Scotta R., Enrique S. (2004). Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pest Manag. Sci.*, 60. 163-166. DOI: 10.1002/ps.775.
7. Miyazaki, J., Bauer-Panskus, A., Bohn, T. (2019). Insufficient risk assessment of herbicide-tolerant genetically engineered soybeans intended for import into the EU. *Environmental Science Europe*, 31(92). 1-21. DOI: 10.1186/s12302-019-0274-1.
8. Benbrook, C.M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Science Europe*. 28(3). 1-15. DOI:10.1186/s12302-016-0070-0.
9. Benachour, N., Séralini, G.E. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells. *Chem. Res. Toxicol*, 22(1). 97-105. DOI: 10.1021/tx800218n.
10. Vecchio, L., Cisterna, B., Malatesta, M., Martin, T E, Biggiogera M. (2009). Ultrastructural analysis of testes from mice fed

- on genetically modified soybean. *Eur. J. Histochem*, 48. 449-453. DOI: 10.4081/920.
11. Duke, S.O., Lydon, J., Koskinen, W.C., Moorman, T.B., Chaney, R.L., Hamerschmidt R. (2012). Glyphosate Effects on Plant Mineral Nutrition, Crop Rhizosphere Microbiota, and Plant Disease in Glyphosate-Resistant Crops. *J. Agric. Food. Chem*, 60(42). P. 10375–10397. DOI: 10.1021/jf302436u.
 12. Natarajan, S., Bae, C., Xu, H. (2007). Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes. *Plant Physiol Biochem*, 45(6-7). 436-444. DOI: 10.1016/j.plaphy.2007.03.031.
 13. Saz, J.M., Marina, M.L. (2007). High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs. *J. Sep. Sci*, 30(4). 431-451. DOI: 10.1002/jssc.200600247.
 14. Kremer, R.J. (2014). Environmental implications of herbicide resistance: soil biology and ecology. *Weed Sci*, 62. 415-426. DOI: 10.1614/WS-D-13-00114.1.
 15. dos Santos, J.B., Ferreira, A., Kasuya, M.C.M., da Silva, A.A., de Oliveira Procópio, S. (2005). Tolerance of Bradyrhizobium strains to glyphosate formulations. *Crop. Protection*, 24. 543-547. DOI:10.1016/j.cropro.2004.10.007.
 16. Moorman, T.B. (1986). Effect of herbicides on the survival of Rhizobium japonicum strains. *Weed. Sci*, 34. 628-633. DOI:10.1017/S0043174500067564.
 17. Seminoti Jacques, R.J., de Oliveira Procópio, S., dos Santos, J.B., Kasuya, M.C.M., da Silva, A.A. (2010). Sensitivity of Bradyrhizobium strains to glyphosate. *Rev. Ceres. Viçosa*, 57(1). 28-33. DOI: 10.1590/S0034-737X2010000100006.
 18. Meena, R.S., Kumar, S., Datta, R. (2020). Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. *Land*, 9(34). 1-21. DOI: 10.3390/land9020034.
 19. Zablotowicz, R.M., Reddy, K.N. (2003). Impact of glyphosate on the Bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. *J. Environ. Qual*, 33. P. 825-831. DOI: 10.2134/jeq2004.0825.
 20. Liu, C.M., McLean, P.A., Sookdeo, C.C., Cannon, F.C. (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol*, 57(6). 1799-1804. DOI: 10.1128/AEM.57.6.1799-1804.1991.
 21. Reddy, K.N., Hoagland, R.E., Zablotowicz, R.M. (2000). Effect of glyphosate on growth, chlorophyll content and nodulation in glyphosate-resistant soybeans (*Glycine max*) varieties. *J. New Seeds*, 2. P. 37-52. DOI: 10.1614/0043-1745(2003)051[0496:GSRTVS]2.0.CO;2.
 22. Hardy, R.W., Holsten, R.D., Jackson, E.K., Burns, R.S. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiol*, 43(8). 1185–1207. DOI: 10.1104/pp.43.8.
 23. Fan, L., Feng, Yu., Weaver, D., Delaney, D., Wehtje, G., Wang, Gu. (2017). Glyphosate effects on symbiotic nitrogen fixation in glyphosate-resistant soybean. *Applied Soil Ecology*, 121. 11-19. DOI:10.1016/j.apsoil.2017.09.015. 10.1614/0043-1745(2003)051[0496:GSRTVS]2.0.CO;2.

I. Gumeniuk, A. Levishko, O. Demyanyuk (2021). EFFICIENCY OF FORMATION AND FUNCTIONING OF THE SYMBIOTIC SOYBEAN SYSTEM WITH GLYPHOSATE TREATMENT. BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 12(1): 75-89.
<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/15098>.
<https://doi.org/10.31548/biologiya2021.01.008>.

Abstract. *The efficiency of the formation and functioning of the soybean symbiotic system during the crops treatment with glyphosate and pre-sowing seed inoculation with different strains of Bradyrhizobium in the field studied. It is known, that glyphosate can affect symbiotic nitrogen fixation through direct action on rhizobia and symbiotic formations, we took plant samples for analysis after four weeks of glyphosate treatment and determined the aboveground mass of plants and symbiotic apparatus formation evaluated by the number of nodules, their mass and nitrogen fixation activity. It was shown that the late treatment (35 days after sowing) with glyphosate does not provide a sufficient level of weed control and under such conditions inhibits the development and growth of soybean plants, reduces the growth of aboveground and root mass. Treatment of plants with glyphosate before the formation of symbiotic apparatus (21 days after sowing) reduces nitrogen fixation activity by 35-50 %, but it does not have a significant effect on the formation of soybean yield. The obtained results confirmed the hypothesis of intensification of the nitrogen complex during late treatment of plants with glyphosate in plants inoculated with Bradyrhizobium japonicum strain EL-35 and the composition of strains of B. japonicum EM-24 and B. japonicum EL-35. The most effective for inoculation of soybean plants was a mixture of the studied strains of B. japonicum EM-24 and B. japonicum EL-35, which provides high nitrogen fixation activity and productivity. Therefore, to reduce the negative impact of glyphosate on the nitrogen fixation activity of symbiotic systems and to obtain high soybean productivity, it is necessary to select rhizobia strains with a high rate of symbiotic system formation, because even a slight decrease in nitrogen fixation can have long-term negative consequences.*

Keywords: *glyphosate, soybean, Bradyrhizobium, nodule bacteria, inoculation, nitrogen fixation.*
