

УДК 579.262:631.847.211:636.086.3

© 2008

В. С. Воробей, Т. М. Ковалевська

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН

**ФОРМУВАННЯ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ
СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ КОЗЛЯТНИК СХІДНИЙ –
RHIZOBIUM GALEGAE ПРОТЯГОМ ПЕРШОГО ТА
ДРУГОГО РОКІВ ВИРОЩУВАННЯ**

Вивчено динаміку формування та функціонування симбіотичного апарату козлятнику східного протягом першого та другого років вегетації. Виявлено позитивний ефект від інокуляції козлятнику східного активним штамом К-3.

Питання пошуку шляхів підвищення вмісту білка в бобових культурах та підтримання на високому рівні родючості ґрунтів були і залишаються актуальними у сільськогосподарському виробництві. На даний час важливим є пошук нетрадиційних джерел рослинної сировини, яка б була здатна не тільки конкурувати з рослинами, які вже використовуються в сільськогосподарському виробництві, а й суттєво переважати їх за біологічними та господарсько цінними показниками. У зв'язку з цим важливе значення може мати введення в культуру мало поширених видів бобових рослин, зокрема таких як козлятник східний та козлятник лікарський [5].

Козлятник східний – багаторічник з біологічно та господарсько цінними ознаками. Культура відзначається високою врожайністю надземної маси і за цим показником значно перевищує конюшину та люцерну [2]. Перший врожай формує вже в рік посіву. Зимостійкість та холодостійкість

козлятнику східного зумовлює ранньовесняне відростання надземної маси та тривалість періоду вегетації аж до замерзання ґрунту. Завдяки цьому з другого року вирощування можливо отримувати за 2-3 укоси від 30 до 70 т/га високоякісної зеленої маси, яка може бути використана у зеленому і силосному конвеєрі, для приготування білкових концентратів та трав'яного борошна.

Козлятник східний має важливе значення для покращання родючості ґрунтів. Завдяки міцній кореневій системі посіви даної культури запобігають змиванню ґрунту на схилах, видуванню його зі стерні та нагромадженню вологи у зимове-весняний період [7]. Крім того, в симбіозі з бульбочковими бактеріями козлятник здатен до фіксації атмосферного азоту, що сприяє значному накопиченню в ґрунті цього необхідного елемента живлення.

Дослідження щодо поширення бульбочкових бактерій козлятнику в ґрунтах України майже не проводили. Ряд авторів (Абрамов О. О., Заболотна В. П., Бутницький І. М.) [1, 5] висловлюють припущення, що бульбочкові бактерії козлятнику в усіх регіонах країни відсутні. Тому для успішної інтродукції даної культури важливо одночасно з насінням вносити в ґрунт біопрепарати на основі активних штамів специфічних бульбочкових бактерій [6]. Першим етапом розробки таких препаратів є селекція штамів ризобій з необхідними симбіотичними характеристиками та вивчення особливостей їх взаємовідносин з рослиною-живителем.

Метою даної роботи було вивчити динаміку формування симбіозу козлятнику східного з активними штамми *Rhizobium galegae* та дослідити активність функціонування даної симбіотичної системи.

Матеріали і методи. Польові дослідження з козлятником східним проводили на дослідних ділянках Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН у 2005-2006 рр. Ґрунт – дерново-підзолистий супіщаний (рН 6,47; вміст гумусу 0,8-1,1%; азоту, що легко гідролізується 56,0-57,0 мг на 1 кг ґрунту). Повторність досліду – чотириразова. Площа облікової ділянки 5 м².

Насіння козлятнику східного (сорт Кавказький бранець) надане відділом нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України. Перед посівом насіння скарифікували та інокулювали штамми *Rhizobium galegae* із розрахунку 200-300 тис. бактеріальних клітин на одну насінину. В контрольному варіанті насіння змочували водою. Посів проводили у першій декаді травня. Ширина міжрядь – 40 см, норма висіву насіння – 10 кг/га. Дослід проводили за такою схемою: 1 – контроль

(без інокуляції); 2 – інокуляція активним штамом *Rhizobium galegae* К-3; 3 – інокуляція активним штамом *Rhizobium galegae* К-18.

У перший рік вирощування козлятнику східного через 30 діб після посіву з періодичністю в 15 діб визначали кількість бульбочок на коренях рослин та їх нітрогеназну активність. Протягом другого року вирощування відбір зразків проводили 6 разів у різні фази розвитку козлятнику. У фазі цвітіння проводили скошування надземної маси.

З кожної повторності відбирали зразки ґрунту з коренями в монолітах, розмірами 22×22×27 см. Корені відділяли від ґрунту, підраховували кількість бульбочок та їх нітрогеназну активність, яку визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі «*Chrom-4*» [3]. Статистичну обробку даних проводили за Б.О. Доспеховим [4]. Анатомо-морфологічну будову активних бульбочок вивчали на їх поздовжніх зрізах під світловим мікроскопом.

Результати досліджень та їх обговорення. Нами виявлено, що в перший рік вегетації на коренях рослин контрольного варіанта досліду бульбочки були практично відсутні, що свідчить про низьку чисельність природної популяції *Rhizobium galegae* в ґрунті даного поля. Інокуляція козлятнику штамми К-3 та К-18 сприяла формуванню великої кількості бульбочок (рис. 1). Так, в період інтенсивного росту, максимальна їх кількість у контролі становила 3,5 одиниці на рослину, у варіанті з інокуляцією штамом К-3 – 133,8, штамом К-18 – 79,3 одиниці на рослину.

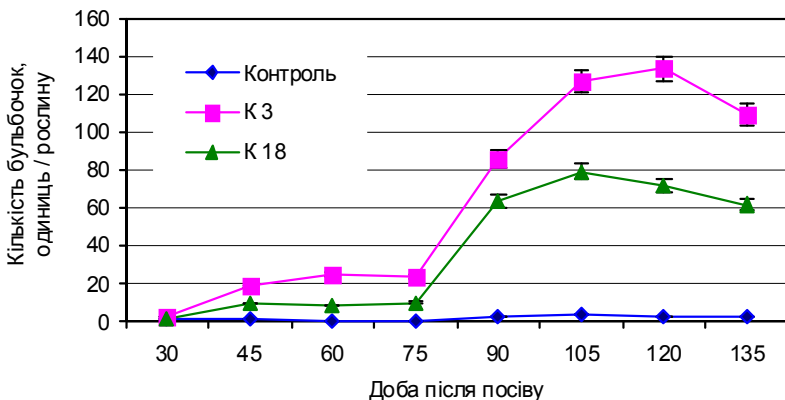


Рис. 1. Вплив активних штамів *Rhizobium galegae* на формування бульбочок козлятнику східного (перший рік вирощування)

У контрольному варіанті досліді протягом всього вегетаційного періоду показники активності симбіотичної азотфіксації також були низькими і не перевищували 2,7 мкг N/рослину за годину. Найбільш істотне зростання рівня нітрогеназної активності бульбочок забезпечував штам К-3. У період інтенсивного росту козлятнику східного інокуляція рослин цим штамом сприяла підвищенню симбіотичної азотфіксації в 1,6 разу в порівнянні зі штамом К-18 та в 16,7 разу в порівнянні з контролем (рис. 2).

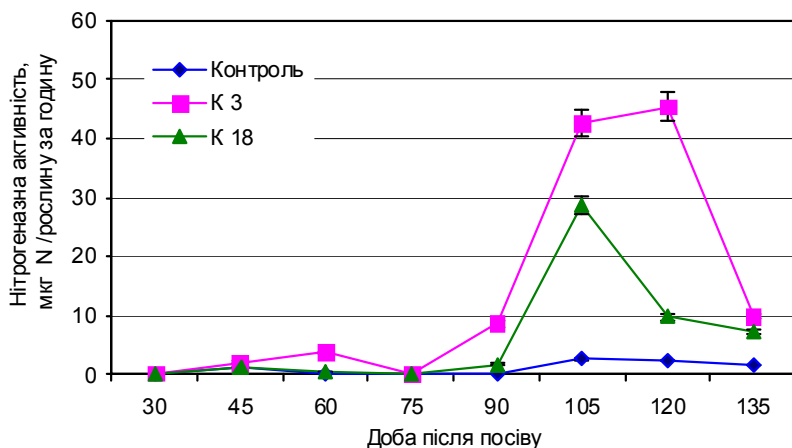


Рис. 2. Вплив штамів *Rhizobium galegae* на активність симбіотичної азотфіксації козлятнику східного (перший рік вирощування)

Дослідження взаємовідносин бульбочкових бактерій козлятнику з рослиною-живителем протягом другого року вирощування показали, що після зимового періоду симбіотичний апарат рослин, сформований за минулий рік, продовжує функціонувати та зберігає здатність фіксувати атмосферний азот. У всіх варіантах досліді відмічено поступове збільшення кількості бульбочок на коренях козлятнику, яке тривало від перших фаз весняного відростання до завершення вегетації рослин.

Так, вже з початку після зимового відростання козлятнику у контрольному варіанті досліді кількість бульбочок на коренях рослин зростає порівняно з кінцем минулого року з 2 до 9 одиниць на рослину і продовжувала збільшуватись до завершення вегетаційного періоду – до 88 одиниць на рослину (рис. 3). Подібну тенденцію спостерігали і у рослин,

інокульованих досліджуваними штамми: у варіанті зі штамом К-3 кількість бульбочок збільшилась у порівнянні з минулим роком зі 110 до 304 одиниць на рослину, у варіанті зі штамом К-18 – з 62 до 130 одиниць на рослину. Слід зауважити, що скошування надземної маси у фазі цвітіння дещо знизило темпи утворення бульбочок, однак їхня кількість продовжувала збільшуватись і досягла максимуму у фазі цвітіння-наливу бобів (560-565 одиниць на рослину).

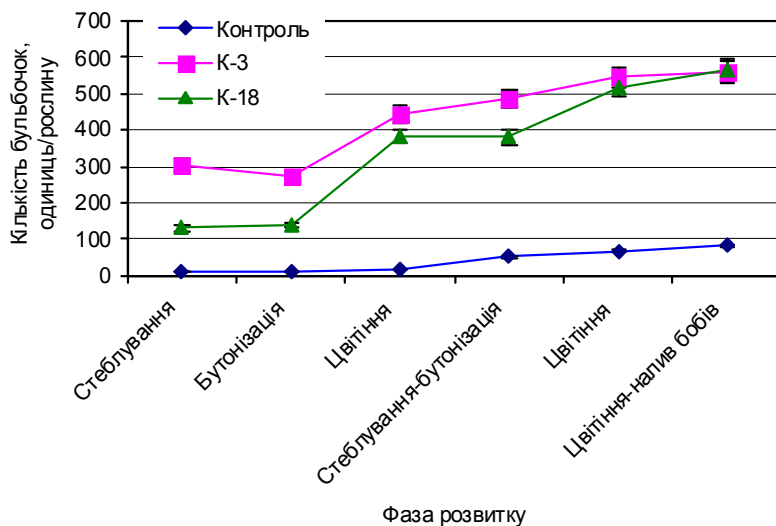


Рис. 3. Вплив активних штамів *Rhizobium galegae* на формування бульбочок козлятнику східного (другий рік вирощування)

Дані, представлені на рис. 4, свідчать про значне підвищення рівня нітрогеназної активності бульбочок козлятнику в порівнянні з першим роком вегетації культури. Так, від перших фаз після зимового відростання до фази цвітіння у рослин контрольного варіанта активність симбіотичної азотфіксації збільшилась в 2,5 разу. Після скошування рівень азотфіксуювальної активності бульбочок суттєво зменшився, а у міру відростання отави знову почав зростати і досяг максимуму у фазі цвітіння – наливу бобів (13,4 мг N/рослину за годину).

Подібну, але більш яскраво виражену динаміку функціонування симбіозу спостерігали у варіантах з інокуляцією рослин досліджуваними

штамами. Вже з перших фаз розвитку козлятнику східного активність симбіотичної азотфіксації у рослин, інокульованих штамом К-3, становила 127,5-135,1 мкг N/рослину за годину. Штам К-18 виявився менш активним і сприяв незначному зростанню рівня нітрогеназної активності (13,53-26,02 мкг N/рослину за годину). У фазі цвітіння активність симбіотичної азотфіксації досягла максимального значення і становила 210,0 та 67,9 мкг N/рослину за годину відповідно у варіантах з обробкою штамом К-3 та К-18. Скошування надземної маси у фазі цвітіння призводило до значного зниження інтенсивності азотфіксації. Так, у рослин, інокульованих штамом К-3, даний показник зменшився у 12,3 разу, а у рослин, оброблених штамом К-18 – у 5,4 разу. У міру відростання надземної маси активність азотфіксації інокульованих рослин поступово збільшилась до 68,2-79,6 мкг N /рослину за годину.

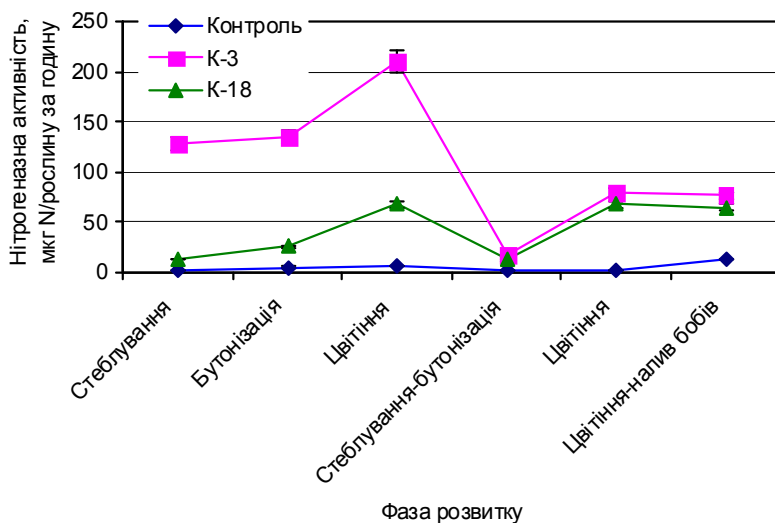


Рис. 4. Вплив штамів *Rhizobium galegae* на активність симбіотичної азотфіксації козлятнику східного (другий рік вирощування)

Протягом двох років вивчали морфологію бульбочок козлятнику східного. За інокуляції даної культури штамом К-3 більшість бульбочок, утворених в перший рік вегетації, були видовженої форми, мали рожевий колір, що свідчить про активну азотфіксацію в них. На коренях рослин

другого року вирощування разом з бульбочками видовженої форми спостерігали формування великої кількості бульбочок, зібраних у друзи (рис. 5).



Рис. 5. Бульбочки на корнях козлятника східного при інюкуляції штамом К-3 (другий рік вирощування)

За допомогою світлового мікроскопа на поздовжніх зрізах нами виявлено зони диференціації тканин активних бульбочок козлятника східного: меристему бульбочки, молоду інфіковану тканину, зону активної азотфіксації, або бактероїдну зону, зону деградації бактероїдної тканини (зона старіння), а також кору та судини бульбочки (рис. 6). Розглянута анатомо-морфологічна будова симбіотичного апарату характерна для бульбочок недетермінованого типу.

Як видно з рисунку, ззовні бульбочка вкрита декількома шарами клітин коркової паренхіми. На її вершині розташована меристема. З літературних джерел відомо, що меристема бульбочки не містить бульбочкових бактерій, основна її функція – утворення нових клітин, що згодом будуть інфіковані ризобіями. Під клітинами меристеми знаходиться зона інфекції, де відбувається ріст інфекційних ниток. Зона активної азотфіксації представлена бактероїдною тканиною, що займає значний об'єм бульбочки та характеризується наявністю бактероїдів, які безпосередньо беруть участь у фіксації азоту.

Загальний план внутрішньої будови бульбочок другого року вирощування схожий з бульбочками першого року. Їх характерною особливістю є

наявність деградованої тканини в базальній частині, яка займає значний об'єм бульбочки.

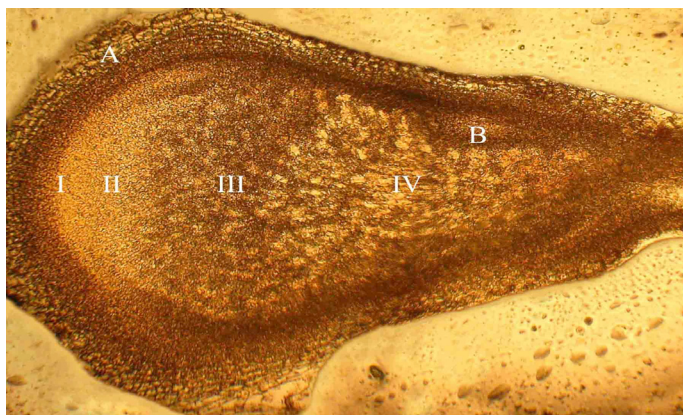


Рис. 6. Поздовжній зріз активної бульбочки козлятнику східного (I – меристема, II – зона інфекції, III – зона азотфіксації, IV – зона старіння, А – кора бульбочки, В – судини), ×64.

Таким чином, симбіотичний апарат козлятнику східного, сформований за перший рік, після зимування зберігає свою структуру та функціональну активність. У рослин другого року вирощування вже з початку відростання надземної маси спостерігається збільшення кількості бульбочок на коренях рослин всіх варіантів дослідів та суттєве зростання рівня азотфіксації. При цьому, скошування рослин у фазі цвітіння не впливає на інтенсивність бульбочкоутворення, однак суттєво знижує активність симбіотичної азотфіксації. Внутрішня будова бульбочок козлятнику східного є типовою для бульбочок недетермінованого типу.

Штам К-3 є активним симбіонтом козлятнику східного (сорт Кавказький бранець) і сприяє формуванню на коренях рослин першого та другого років вегетації значної кількості бульбочок з високою активністю симбіотичної азотфіксації.

Бібліографічний список

1. Абрамов О. О. Вплив інокуляції насіння козлятнику східного на ріст і розвиток рослин в Лісостепу України // Бюл. Ін-ту с.-г. мікробіології УААН. – 1999. – № 4. – С. 35-37.

2. Артемов И. В., Первушин В. М., Белоножкина Т. Г. Козлятник восточный в Центрально-Черноземной зоне // Кормопроизводство. – 1994. – № 4. – С. 7-12.
3. Волкогон В. В. Методичні рекомендації по визначенню азотфіксації в ґрунті та кореневій зоні рослин ацетиленовим методом. – Чернігів, 1997. – 14 с.
4. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
5. Заболотна В. П., Бутницький І. М., Коць С. Я. Значення козлятнику східного у симбіотичній фіксації азоту та підвищенні збору білка // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – 36, № 4. – С. 291-300.
6. Кожемяков А. П. Продуктивность азотфиксации в агроценозах // Мікробіол. журн. – 1997. – 59, № 4. – С. 22-28.
7. Утеуш Ю. А., Лобас М. Г. Кормові ресурси флори України. – К.: Наук. думка, 1996. – 222 с.