

**ВПЛИВ ҐРУНТОВИХ ГРИБІВ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ
СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ ЛЮПИН – БУЛЬБОЧКОВІ
БАКТЕРІЇ ЛЮПИНУ**

О.В. Надкернична, В.П. Горбань, О.О. Дмитрук,
О.Є. Мамчур, В.М. Стрекалов
Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН

За результатами проведених досліджень до нового сорту люпину білого Щедрий 50 відібрано найбільш ефективний штам - *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4. Із уражених бульбочок люпину білого виділено сапрофітний гриб *G. zaleskii* 278, що виявляв високу фітотоксичну активність щодо рослин люпину. Показано, що під впливом *G. zaleskii* 278, як і фітопатогенного гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* 400, суттєво знижувалась активність симбіотичної азотфіксації.

Bradyrhizobium sp. (*Lupinus*), люпин, симбіотична система, азотфіксація, фітотоксичні гриби, фітопатогенні гриби

Люпин ціниться як високобілкова кормова культура. Водночас, збагачуючи ґрунт азотом, він є прекрасним попередником для інших культур. Адже важливою особливістю люпину, як і інших бобових, є здатність вступати у симбіоз із бульбочковими бактеріями, що дозволяє рослинам використовувати молекулярний азот повітря та за сприятливих кліматичних умов обумовлювати незалежність люпину від мінеральних азотних добрив навіть на бідних дерново-підзолистих ґрунтах, що становлять більшу частину орних земель зони Полісся України.

Згідно сучасних уявлень, бобово-ризобіальний симбіоз є результатом комплементарності двох геномів: макро- та мікросимбіонтів [1]. З огляду на це, рівень симбіотичної азотфіксації та урожайності бобових культур можна підвищити за рахунок ретельного добору сорту рослин та штамів бульбочкових бактерій [2]. Проте, ефективність симбіозу люпину з бульбочковими бактеріями залежить не тільки від властивостей фіто- і ризосимбіонтів та їх генетичної комплементарності, а й від умов зовнішнього середовища - абіотичних, біотичних та антропогенних. Серед біотичних

чинників, що негативно впливають на продуктивність люпину, важливе значення мають ґрунтові гриби, оскільки найбільші втрати урожаю цієї культури спричиняють саме грибні хвороби, а деякі сапрофітні гриби-продуценти фітотоксичних речовин обумовлюють токсичність ґрунту, що призводить до пригнічення росту та розвитку рослин і, як наслідок, – зниження їх продуктивності [3]. Проте, дослідженню особливостей взаємовідносин між бульбочковими бактеріями та ґрунтовими грибами не приділяється достатньо уваги, а питання впливу сапрофітних грибів-продуцентів фітотоксичних речовин та фітопатогенних грибів на бобово-ризобіальний симбіоз потребують подальшого вивчення, так як урожайність люпину та його якість значною мірою залежить від ефективності функціонування симбіотичної системи.

Метою досліджень було сформувати високопродуктивну симбіотичну систему люпин-бульбочкові бактерії люпину та вивчити вплив ґрунтових грибів на процес формування і ефективність функціонування зазначеної системи.

Польові досліді проводили на базі Чернігівського Інституту АПВ УААН та дослідних ділянках Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН протягом 2004-2006 рр. Планування, проведення польових дослідів, статистичну обробку отриманих даних проводили за Б.А. Доспеховим [4].

Нітрогеназну активність бульбочок люпину визначали газохроматографічним методом [5].

Для визначення фітотоксичної активності фільтратів культуральних рідин виділених грибів використовували метод біопроби на насінні і проростках рослин кукурудзи та люпину [6].

Вплив фітотоксичних грибів на формування та функціонування бобово-ризобіальної системи вивчали за умов вегетаційного досліді на дерново-підзолистому ґрунті, інкульованому конідіями *G. zaleskii* 278.

Для проведення електронної мікроскопії бульбочки контрольних рослин люпину та рослин, які вирощували за інтродукції у ґрунт *G.zaleskii* 278, розрізали на шари, фіксували 6 %- ним розчином глютаральдегіду і 1 %- ним OsO_4 [7]. Зневоднення фіксованого матеріалу проводили 50, 70, 76 і 100 %- ним спиртами і заливали в Епон-812. Ультратонкі зрізи одержували на ультрамікротомі Bs 490A, підфарбовували ураніацетатом, проглядали на електронному мікроскопі Tesla-540.

З метою створення високоефективної бобово-ризобіальної системи в серії вегетаційних дослідів відібрано найбільш вірулентний, конкурентоздатний та активний штамп у симбіозі з рослинами нового сорту люпину білого Щедрий 50 (селекції Чернігівського Інституту АПВ

УААН) – *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4.

Аналіз урожайних даних, одержаних у трьохрічних польових дослідках, показав, що інокуляція насіння люпину білого сорту Щедрий 50 зазначеним штамом на фоні численної місцевої популяції бульбочкових бактерій сприяла підвищенню урожайності зерна в середньому на 14,1 % у порівнянні з варіантом без інокуляції та на 8,4 % у порівнянні зі стандартним штамом (табл. 1).

Таблиця 1
Вплив бактеризації насіння люпину білого сорту Щедрий 50 на урожай зерна (польові дослідки, ґрунт дерново-підзолистий)

Варіант дослідку	2004 р.		2005 р.		2006 р.		за 3 роки	
	т/га	%	т/га	%	т/га	%	т/га	%
Без інокуляції (контроль)	2,2	-	1,7	-	1,7	-	1,9	-
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>) 367a	2,3	4,1	2,0	14,2	1,8	8,0	2,0	8,4
Інокуляція <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>) 5500/4	2,4	10,4	2,0	15,9	2,0	18,3	2,1	14,1
НІР ₀₅	0,13		0,17		0,16			

Проте, як свідчать наведені дані, урожайність люпину залишається на невисокому рівні. Звичайно, що рівень урожайності культури залежить від багатьох чинників, зокрема, біологічних особливостей сорту, дотримання технології вирощування культури, метеорологічних умов та ін.

Вагомою причиною зниження урожайності люпину білого, на нашу думку, було значне ураження рослин збудниками кореневих гнилей. Так, за умов польового дослідку 2004 року симптоми фузаріозного ураження рослин спостерігали протягом усього періоду вегетації: кількість уражених рослин у фазі стеблуння становила 65,3 %, а у фазі сизих бобів поширення хвороби сягало 96,4 %.

Ще одним із чинників, що негативно впливають на продуктивність люпину, є сапрофітні гриби – продуценти фітотоксичних речовин, які обумовлюють токсичність ґрунту.

Вивчаючи родовий склад мікобіоти кореневої зони люпину білого, окрім виділених збудників кореневих гнилей і фузаріозного в'янення, що належали до роду *Fusarium* Link, нашу увагу привернула висока чисельність грибів роду *Gliocladium* Corda. Вони становили 75 % від загальної

кількості грибів ризосфери люпину білого та 88 % від загальної кількості грибів ризоплани. У кореневій зоні, а особливо на уражених бульбочках спостерігалось поступове збільшення чисельності мікроскопічних грибів роду *Gliocladium* Corda від стадії стеблуння до стадії сизих бобів пропорційно до збільшення числа рослин з ознаками ураження кореневої системи. Так, у фазі сизих бобів їх кількість сягала 12 млн. колонієутворюючих одиниць на 1 г сирої маси уражених бульбочок, тоді як на 1г здорових нараховувалось 28 тис. колонієутворюючих одиниць. Із уражених бульбочок виділено ізолят, ідентифікований як *G. zaleskii* 278. Результати досліджень дали нам підставу припустити, що даний гриб, можливо, відіграє важливу роль у розвитку виявленого ураження коренів люпину білого. Але результати вегетаційного дослідю не підтвердили патогенності *G. zaleskii* 278, проте його внесення у ґрунт негативно впливало на ріст та розвиток рослин (рис. 1). Як засвідчили одержані дані, висота рослин знижувалась на 12,2 %, надземна маса рослин у перерахунку на суху речовину зменшувалась на 20,7, а маса кореневої системи – на 25,6 % у порівнянні з контрольним варіантом.



Рисунок 1. Рослини люпину білого:

1-контрольного варіанту,

2-варіанту з внесенням у ґрунт *G. zaleskii* 278

З літературних джерел відомо, що зниження продуктивності рослин можливе в результаті підвищення токсичності ґрунту за рахунок продукування мікроорганізмами фітотоксинів. Фітотоксинами називають речовини, які в низьких концентраціях виявляють інгібуючу дію на рослини. Слід зазначити, що патогенні гриби роду *Fusarium* Link є відомими продуцентами фітотоксинів, таких як фузарієва кислота та її похідні, піколінова кислота, лікомаразмин [3, 8].

За методом Берестецького встановлено здатність сапрофітного гриба *G. zaleskii* 278 та патогенного гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* 400 продукувати токсичні речовини: їх культуральні рідини повністю пригнічували ріст проростків та схожість насіння тест-культур кукурудзи і люпину.

З огляду на вище зазначене, викликало інтерес порівняти дію патогенних і сапрофітних грибів – продуцентів фітотоксичних речовин на симбіотичну систему люпин - *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Оскільки основною функцією бобово-ризобіального симбіозу є процес азотфіксації, то важливо було з'ясувати вплив грибних метаболітів на нітрогеназну активність бульбочок люпину. Встановлено, що інкубування бульбочок в фільтратах культуральних рідин *G. zaleskii* 278 та фітопатогенного гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* 400 приводило до значного зниження їх нітрогеназної активності (табл. 2)

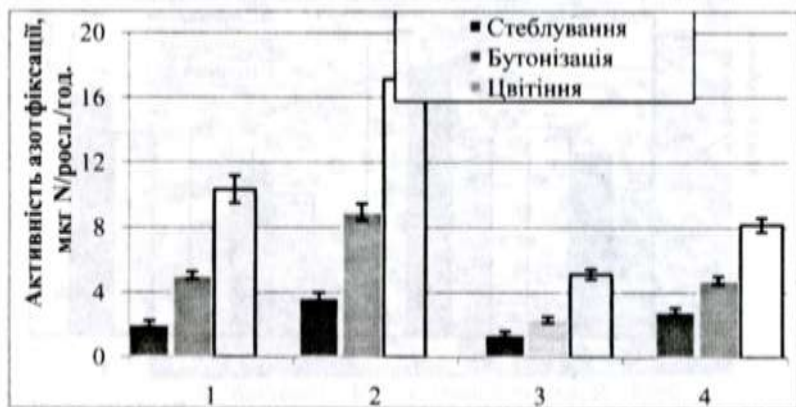
Таблиця 2

Вплив культуральної рідини ґрунтових мікроміцетів на нітрогеназну активність бульбочок люпину білого

Варіант досліджу	Активність азотфіксації, мкг азоту	
	на 1 рослину за годину	на 1г бульбочок за годину
Контроль (вода)	59,20±4,26	90,68±3,97
Культуральна рідина <i>G. zaleskii</i> 278	5,51±0,52	7,94±0,56
Культуральна рідина <i>F. oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i> 400	9,83±0,86	14,84±0,87

Вплив метаболітів *G. zaleskii* 278 на процес формування і ефективність функціонування бобово-ризобіальної системи вивчали за умов вегетаційного дослідження на дерново-підзолистому ґрунті, інокульованому конідіями досліджуваного гриба. Як показали наші дослідження, накопичуючись у кореневій зоні, гриб суттєво впливав на ріст та розвиток рослин і значно знижував активність функціонування симбіотичної системи. Так, нітрогеназна активність бульбочок за умов вегетаційного дослідження під дією метаболітів *G. zaleskii* 278 у різні фази розви-

тку рослин знижувалась в 1,4-2,2 рази у порівнянні з варіантом без внесення гриба (рис. 2).



Варіант досліджу

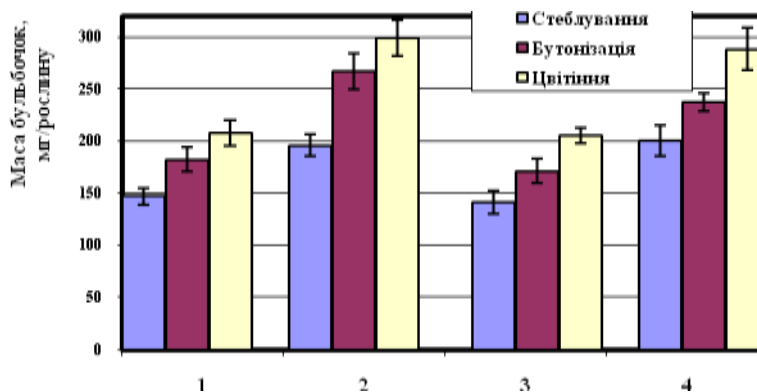
1 - контроль (без обробки), 2 - інокуляція *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4, 3 - внесення у ґрунт *G. zaleskii* 278, 4 - внесення у ґрунт *G. zaleskii* 278 + інокуляція *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4

Рисунок 2. Вплив *G. zaleskii* 278 на нітрогеназну активність бульбочок люпину білого сорту Щедрий 50 (вегетаційний дослід)

Представлені на рисунку 3 дані свідчать, що метаболіти *G. zaleskii* 278 не впливали суттєво на накопичення бульбочкової маси. За результатами попередніх лабораторних досліджень методом зустрічних культур встановлено, що відносини між *G. zaleskii* 278 та *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4 можна оцінити як нейтралізм. Ймовірно, що і в кореневій зоні люпину ці мікроорганізми не впливають на розвиток один одного, тому при внесенні зазначеного гриба у ґрунт процес нодуляції не порушувався.

З метою з'ясування причини зниження активності функціонування симбіотичної системи люпин - *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) вивчали ультраструктуру бульбочок люпину білого сорту Щедрий 50 у фазі цвітіння. Відомо, що бульбочки бобових рослин складаються із таких тканин: бактероїдна тканина, що займає основний об'єм зрілої бульбочки, меристеми, провідної системи і покривної тканини (корова паренхіма). Клітини бактероїдної тканини значно відрізняються за морфологією від клітин рослинної тканини. Вони мають невелику вакуолю (або зовсім її не мають), ядро з ядерцем розміщене в центрі, а цитоплазма

містить значну кількість бульбочкових бактерій, які перетворилися в бактероїдну форму [9].



Варіант досліджу

1 - контроль (без обробки), 2 - інокуляція *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4, 3 - внесення у ґрунт *G. zaleskii* 278, 4 - внесення у ґрунт *G. zaleskii* 278 + інокуляція *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4

Рисунок 3. Маса бульбочок люпину білого сорту Щедрий 50 під впливом *G. zaleskii* 278 (вегетаційний дослід)

Електронно-мікроскопічні дослідження бульбочок люпину білого показали, що в спонтанно інфікованих клітинах бактероїдної зони в фазі цвітіння міститься велика кількість бактероїдів. На одержаних нами фотографіях бактероїди паличковидної форми, довгі, тонкі, не розгалужені. Як видно з рисунку 4, бактероїди заповнюють більшу частину рослинної клітини за виключенням центральної зони ядра. Вони оточують ядро клітин та з усіх сторін стискають його мембрану, в результаті чого ядро клітини змінює свою форму, а в подальшому деградує і зникає. В більшості клітин бактероїдної зони ядро відсутнє.

Ультраструктура клітин бульбочок люпину білого сорту Щедрий 50, що вирощували за внесення у ґрунт *G. zaleskii* 278, відрізнялась від вище описаної (рис. 5). На всіх одержаних зрізах відмічена спотворена форма бактероїдів, а їхня кількість значно менша у порівнянні з контрольним варіантом. У більшості клітин бактероїдної зони спостерігали зникнення ядра та утворення вакуолей, які зливались в одну центральну. Бактероїди при цьому відтісняються на периферію клітини до клітинної стінки, а центральна вакуоля займає більшу частину клітини.

Утворення вакуолей свідчить про припинення клітинного поділу та початок раннього старіння інфікованих клітин.



Рисунок 4. Клітина бактероїдної зони бульбочок люпину білого сорту Щедрий 50, що містить ядро та бульбочкові бактерії (контроль) x 10 000

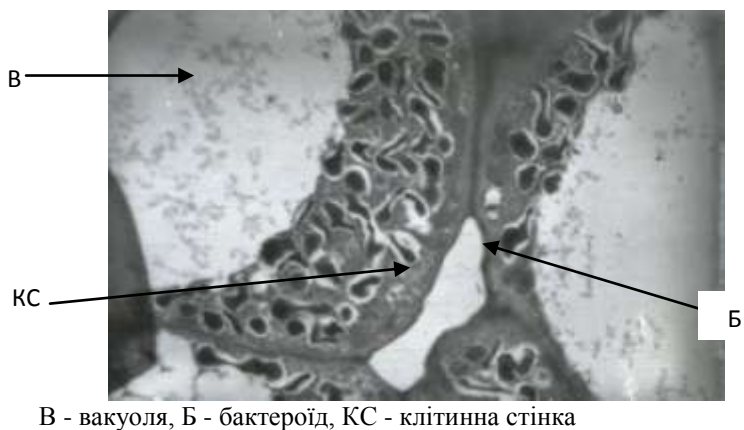


Рисунок 5. Раннє старіння клітин бактероїдної зони бульбочок люпину білого сорту Щедрий 50 під впливом *G. zaleskii* 278 x 12 000

Аналогічну картину спостерігала О.В. Надкернична із співавторами, вивчаючи ультраструктуру бульбочок люпину жовтого, що ви-

рошували за лабораторних умов під дією фітотоксичного гліколіпіда, виділеного із культуральної рідини сапрофітного гриба *Chaetomium aureum* [10].

Таким чином, під дією метаболітів сапрофітного гриба *G. zaleskii* 278 відбувається раннє старіння клітин бактероїдної тканини бульбочок люпину білого, змінюється форма бактероїдів, зменшується їх кількість у клітині. Можливо, саме цим і обумовлено зниження нітрогеназної активності бульбочок.

Аналогічний вплив на функціонування симбіотичної системи чинять і фітопатогенні гриби. Результати наших дослідів з фітопатогенним грибом *F. oxysporum* var. *orthoceras* 400 засвідчили зниження нітрогеназної активності бульбочок люпину на штучно створеному інфекційному фоні в різні фази вегетації рослин в 1,5-3,4 раза у порівнянні з варіантом без внесення гриба. Але на відміну від фітотоксичного сапрофітного гриба *G. zaleskii* 278 фітопатогенний гриб впливав на формування бобово-ризобіальної системи знижуючи нодуляційну здатність бульбочкових бактерій (в 1,3-1,7 раза зменшувалась маса бульбочок під дією фітопатогенного гриба) [11].

Таким чином, проведені дослідження показали, що як сапрофітний гриб *G. zaleskii* 278 – продуцент фітотоксичних речовин, так і фітопатогенний *F. oxysporum* var. *orthoceras* 400 при інтродукції у ґрунт негативно впливають на функціонування бобово-ризобіальної системи, при чому, їх дія на симбіотичну систему дещо відрізнялась. Під дією патогенного гриба, який одночасно є продуцентом фітотоксинів, спостерігали затримку утворення бульбочок та зниження їх маси на початкових етапах вегетації рослин. Сапрофітний гриб *G. zaleskii* 278 не впливав на накопичення бульбочкової маси. Нітрогеназна активність бульбочок люпину знижувалась під впливом обох мікроміцетів.

Автори щиро вдячні кандидату біологічних наук, старшому науковому співробітнику Надкержничному С.П. за консультативну допомогу та люб'язно наданий для дослідження штам F. oxysporum var. orthoceras 400.

Список використаних джерел

1. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции ; под ред. И. А. Тихоновича и Н. А. Прохорова. – С. - Пб. : Наука, 1998. – 194 с.: ил., табл.
2. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов / С. Я. Коць, С. К. Береговенко, Е. В. Кириченко [и др.] / Национальная академия наук Украины, Институт физиологии растений и генетики. – К. : Наук. думка, 2007. – 315 с.: ил., табл.

3. Билай В. И. Основы общей микологии : учебн. пособ. / В. И. Билай – К. : Вища шк., 1980. – 360 с.
4. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – М. : Агропромиздат, 1985. – 351 с.
5. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation / [Hardy R. W.F., Yolsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C.] // Plant Physiology. – 1968. – Vol. 43, №8. – P. 1185-1207.
6. Берестецький О. О. Простий метод виявлення фітотоксичних речовин, утворюваних мікроорганізмами / О. О. Берестецький // Мікробіологічний журнал. – 1972. – № 6. – С. 798-800.
7. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. – М. : Мир, 1975. – 324 с.
8. Крючкова Л. О. Фузарії / Л. О. Крючкова // Захист рослин. – 2000. – № 7. – С. 8-9.
9. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс : монография / Е. Н. Мишустин, Е. Н. Шильникові / Акад. наук ССР. – М. : Наука, 1973. – 240 с.
10. Влияние фитотоксического гликолипида на нитрогеназную активность и ультраструктуру клубеньков люпина / Е. В. Надкерничная, В. В. Колибаба, А. Е. Мамчур, Н. М. Зарицкий // Микробиологический журнал. – 1986. – Т. 48, № 4. – С. 8-15.
11. Горбань В. П. Функціонування симбіотичної системи люпин - *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) за ураженості рослин фітопатогенними грибами / В. П. Горбань // Селекція і насінництво : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2005. – Вип. 90. – С. 238-245.

В результате проведенных исследований к новому сорту люпина белого отобран наиболее эффективный штамм - *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4. Из пораженных клубеньков люпина белого выделен сапрофитный гриб *G. zaleskii* 278, который проявлял высокую фитотоксическую активность по отношению к растениям люпина. Показано, что под влиянием *G. zaleskii* 278, как и фитопатогенного гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* 400, существенно снижалась активность симбиотической азотфиксации.

There was selected the most effective in symbiosis with Shehedry 50, a new sort of white lupine, strain of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4. Saprophytic fungus *G. zaleskii* 278, which had been isolated from injured white lupine nodules showed high activity upon lupine plants. It has been shown that activity of symbiotic nitrogen fixation grew down to a considerable extent under the influence of saprophytic fungus of *G. zaleskii* 278 and pathogenic fungus of *F. oxysporum* var. *orthoceras* 400.