

ВПЛИВ ШТАМІВ *RHIZOBIUM GALEGAE* НА РОЗВИТОК РОСЛИН КОЗЛЯТНИКА ЛІКАРСЬКОГО ПЕРШОГО ТА ДРУГОГО РОКІВ ВИРОЩУВАННЯ

¹Воробей В.С., ¹Ковалевська Т.М., ²Рахметов Д.Б.

¹Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

²Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАНУ,
вул. Тімірязєвська, 1, м. Київ, 01014, Україна

*У польовому досліді вивчали ефективність інокуляції козлятника лікарського новими штамми ризобій, ізольованими з бульбочок рослини-господаря. Відмічено позитивний вплив бактеризації рослин досліджуваними штамми бульбочкових бактерій на основні показники бобово-ризобіального симбіозу як у першій, так і другій роки вегетації козлятника лікарського. За результатами досліджень відібрано два штами *Rhizobium galegae* – Л-13 та Л-16, які сприяють зростанню чисельності бульбочок на коренях рослин, активності симбіотичної азотфіксації, вмісту хлорофілу в листках рослин та продуктивності козлятника.*

Ключові слова: козлятник лікарський, *Rhizobium galegae*, інокуляція, бобово-ризобіальний симбіоз.

Козлятник лікарський – багаторічна рослина родини бобових, яка в Україні в природних умовах поширена від півдня Лісостепу до Криму. Відзначається зимостійкістю, раннестиглістю, інтенсивним розвитком, здатністю до формування високого врожаю вегетативної маси і насіння. Зелена маса козлятника лікарського містить значну кількість протеїну, багата на аскорбінову кислоту, каротин. Проте наявність у надземній масі рослин алкалоїду галегіну в кількості 0,1–0,5 % знижує смакові якості, що обмежує використання культури для кормових цілей. З іншого боку, присутність алкалоїдів зумовлює використання козлятника лікарського у фармакологічній галузі як засобу, що застосовують при легких формах цукрового діабету, а також для посилення лактації у матерів-породіль [2, 5].

На сьогодні козлятник лікарський, як нова культура в агроценозах України, потребує селекції та районування сортів і гібридів, а також розробки основних елементів технології вирощування [8, 9]. Одним з важливих технологічних елементів

є застосування біопрепаратів на основі активних штамів бактерій *Rhizobium galegae* для поліпшення азотного живлення рослин та підвищення їх продуктивності.

Слід відмітити, що бактерії *R. galegae* є високо специфічними мікроорганізмами і утворюють ефективний симбіоз лише з певними видами козлятника. Деякі автори, підкреслюючи високу видову специфічність *R. galegae*, розділяють їх на два біовари – *R. galegae* *bv. orientalis* та *R. galegae* *bv. officinalis*, які є активними симбіонтами відповідно козлятника східного та козлятника лікарського [10].

Однак сьогодні в Україні немає біопрепаратів на основі мікосимбіонтів козлятника лікарського. Тому селекція штамів *R. galegae*, які були б активними біоагентами відповідних мікробних препаратів і сприяли б підвищенню продуктивності культури, є актуальною.

Метою нашої роботи було вивчити вплив нових активних штамів *R. galegae* на формування та функціонування симбіозу з козлятником лікарським у перший та другий роки вегетації.

Матеріали й методи. Дослідження з козлятником лікарським проводили в умовах польового досліду на дерново-підзолистому супіщаному ґрунті (рН – 6,47; вміст гумусу 0,8–1,1 %; азоту, що легко гідролізується 56,0–57,0 мг на 1 кг ґрунту) протягом 2006–2007 років. Насіння козлятника лікарського надане відділом нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка. Рослини вирощували широкорядним способом, ширина міжрядь – 40 см. Норма висіву насіння – 10 кг/га. Розміщення ділянок – рендомізоване. Площа облікової ділянки – 5 м². Повторність досліду - чотириразова.

Насіння перед посівом скарифікували та інокулювали досліджуваними штамми із розрахунку 200–300 тис. клітин на насінину. В контрольному варіанті насіння зволожували водою. Для бактеризації використовували штам *R. galegae* 0703 (стандартний штам бульбочкових бактерій козлятника східного, отриманий з колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН) та 4 нові штамми *R. galegae* Л-8, Л-12, Л-13 та Л-16, які виділені з бульбочок козлятника лікарського. За результатами проведених лабораторних та вегетаційних дослідів дані штамми характеризувались високою вірulentністю та активністю.

Протягом першого та другого років вирощування козлятника

вивчали вплив бактеризації на формування та функціонування симбіозу рослини-господаря з досліджуваними штамми бульбочкових бактерій. Для оцінки активності та ефективності бобово-ризобіального симбіозу визначали кількість бульбочок на коренях рослин, активність симбіотичної азотфіксації, вміст хлорофілу в листках рослин та продуктивність козлятника.

В основні фази розвитку рослин для визначення інтенсивності наростання кореневих бульбочок та їх нітрогеназної активності відбирали ґрунтово-рослинні моноліти, розміром 22×22×27 см. Активність симбіотичної азотфіксації досліджували ацетиленовим методом [1]. Для визначення цього показника корені обережно відділяли від ґрунту, відмивали та поміщали у флакони, в які вводили ацетилен. Тривалість інкубації – година. Кількість відновленого етилену визначали на газовому хроматографі Chrom-4. Після цього корені виймали з флаконів та підраховували кількість бульбочок.

Вміст хлорофілів *a* і *b* в листі визначали спектрофотометрично [6]. З цією метою у фазі цвітіння козлятника відбирали листки, які розміщувалися на рівні 70-100 см від поверхні ґрунту.

Облік урожаю проводили після скошування рослин. Визначали вагу повітряно сухої надземної маси козлятника.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Б.О. Доспеховим [3] та використовуючи комп'ютерну програму Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення. Аналіз зразків, відібраних в основні фази розвитку рослин, свідчить, що інтенсивні бульбочкоутворення та фіксація азоту відбувалися у фазі бутонізації-початку цвітіння як першого, так і другого років вирощування. Отримані результати щодо кількості бульбочок та їх нітрогеназної активності наведені у табл. 1.

Встановлено, що всі досліджувані штами *R. galegae* є вірулентними. Підтвердженням цьому є формування великої кількості бульбочок на коренях інокульованих рослин.

Проте, за ступенем інфікування коренів, рослини першого та другого року вегетації суттєво розрізняються. Інтенсивність бульбочкоутворення на коренях рослин другого року всіх варіантів досліду суттєво зростає (табл. 1). Тобто, формування бульбочок після зимівлі не припиняється, а, навпаки, продовжується з більшою інтенсивністю в порівнянні з першим роком.

З даних, наведених в табл. 1, видно, що в перший рік

вирощування на коренях рослин контрольного варіанту досліду бульбочки практично не формувались. Це свідчить про низьку чисельність представників природної популяції *R. galegae* в ґрунті.

За інокуляції рослин досліджуваними штамми утворювалось від 21 до 91 бульбочки. За цим показником штам 0703 був найгіршим. Бактеризація козлятника лікарського штамми Л-8, Л-12, Л-13 та Л-16 виявилась значно ефективнішою в порівнянні з контролем та варіантом з інокуляцією неспецифічним штамом 0703. Серед вищезгаданих штамів бульбочкових бактерій козлятника найвищу вірулентність мали штамми Л-13 та Л-16, які сприяли формуванню відповідно 91 та 72 бульбочок на рослину.

Таблиця 1. Вплив досліджуваних штамів *Rhizobium galegae* на формування кореневих бульбочок та їх нітрогеназну активність (фаза бутонізації-початку цвітіння)

Варіанти досліду	Середня кількість бульбочок, одиниць на рослину		Азотфіксувальна активність, мкг N/ рослину за годину	
	1-й рік вирощування	2-й рік вирощування	1-й рік вирощування	2-й рік вирощування
Контроль (без інокуляції)	0,63	193,75	0,69	26,96
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. 0703	22,50	292,75	5,80	32,76
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-8	66,13	415,25	22,03	50,15
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-12	56,13	426,00	14,16	76,86
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-13	90,50	392,50	11,22	70,81
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-16	71,75	419,50	18,79	86,69
НІР ₀₅	13,13	35,02	4,80	9,40

На другий рік вирощування кількість бульбочок на коренях рослин продовжувала збільшуватись. Значний їх приріст спостерігали вже з перших фаз весняного відростання зеленої маси козлятника.

Як і в перший рік вирощування, на коренях рослин другого року вегетації у контрольному варіанті досліді чисельність бульбочок була найнижчою і становила в середньому 194 одиниці на рослину. Проте, їх приріст порівняно з першим роком був суттєвим. На нашу думку, однією з причин значного зростання даного показника є те, що рослини другого року вегетації вступали в симбіоз з ризобіями, які частково вивільнилися в ґрунт внаслідок руйнації частини бульбочок при зимуванні. Значно зросла кількість кореневих бульбочок і при інфікуванні рослин штамом 0703. Чисельність бульбочок за інокуляції козлятника лікарського специфічними штамми була високою: всі штами сприяли достовірному зростанню бульбочок на коренях рослин відносно контролю в 2,0–2,2 рази.

За результатами дослідження інтенсивності симбіотичної фіксації азоту встановлено, що використані в досліді штами *R. galegae* є активними азотфіксаторами. Визначення рівня даного показника в основні фази розвитку рослин свідчить про те, що максимальна інтенсивність зв'язування азоту спостерігається у фазі бутонізації-початку цвітіння як в перший, так і другий роки вирощування. Варто зазначити, що азотфіксувальний процес інтенсивніше протікає у рослин другого року використання (табл. 1).

Рівень нітрогеназної активності кореневих бульбочок рослин першого року свідчить про різну активність досліджуваних штамів. Слід підкреслити, що активність нітрогенази бульбочок неінокульованих рослин становила лише 0,69 мкг N/рослину за годину. Бактеризація козлятника лікарського штамом 0703 сприяла формуванню малоактивного симбіозу. Найвищий рівень показників азотфіксувальної активності спостерігався у варіантах з інокуляцією козлятника лікарського специфічними штамми ризобій, що виділені з бульбочок рослини-господаря. Так, нітрогеназна активність бульбочок у цих варіантах досліді була в 1,9–3,8 рази вищою за даний показник у варіанті з інокуляцією неспецифічним штамом 0703. Кращими азотфіксаторами є бульбочкові бактерії *R. galegae* шт. Л-8 та Л-16. Менш активними виявились штами Л-12 та Л-13.

На другий рік вирощування активність симбіотичної

азотфіксації козлятника лікарського в контрольному варіанті дослідження становила 26,96 мкг N/рослину за годину. Підвищення рівня даного показника спостерігали і у варіанті з інокуляцією штамом 0703.

За інтенсивністю азотфіксувального процесу рослини козлятника лікарського другого року вирощування, інокульовані специфічними штамми бульбочкових бактерій, значно переважали рослини контрольного варіанту та варіанту з інокуляцією штамом 0703. Найвищу активність симбіотичної азотфіксації спостерігали у варіантах з бактеризацією рослин штамми Л-12, Л-13 та Л-16 (70,81–86,69 мкг N/рослину за годину). Інтенсивність зв'язування азоту у рослин, інокульованих цими штамми, була в 2,6–3,2 раза вищою, ніж у контролі.

Вміст хлорофілу в листках рослин – один з головних показників, що характеризує активність протікання фотосинтезу. Від інтенсивності даного процесу залежить накопичення рослинами органічної речовини. Ряд досліджень вказують на тісний взаємозв'язок між цими процесами [4, 7].

Встановлено, що за інокуляції досліджуваними штамми разом зі зростанням рівня симбіотичної азотфіксації відбувається збільшення вмісту хлорофілів *a* і *b* в листках рослин, як у перший, так і другий роки вирощування козлятника (табл. 2).

Як свідчать наведені в табл. 2 дані, найменший вміст хлорофілу *a* і *b* спостерігався у контрольному варіанті дослідження та варіанті з інокуляцією штамом *R. galegae* 0703. За загальним вмістом хлорофілу в листках бактеризовані неспецифічним штамом 0703 рослини поступалися рослинам контрольного варіанту дослідження на 17,6 %. За інокуляції козлятника лікарського штамми *R. galegae* Л-8, Л-12, Л-13 та Л-16 вміст хлорофілу *a* збільшився відносно контролю в 1,1–1,5 раза, хлорофілу *b* – в 1,6 – 2,8 раза. За сумою хлорофілів варіанти з бактеризацією цими штамми значно відрізнялися від варіантів без інокуляції та з інокуляцією неспецифічним штамом. Штами Л-13 та Л-16 сприяли збільшенню загального вмісту хлорофілу в листках рослин відносно контролю на 62,1–78,0 %.

Як і в перший рік вирощування, неінокульовані та інокульовані штамом 0703 рослини козлятника лікарського другого року характеризувались найнижчим вмістом хлорофілів у листках серед рослин всіх варіантів дослідження. Загальний вміст хлорофілу в листках рослин, інокульованих специфічними штамми Л-8,

Л-12, Л-13 та Л-16, був високим. Як і в перший рік, штами Л-8, Л-13 та Л-16 виявилися кращими і забезпечували збільшення вмісту хлорофілу відносно контролю на 25,7–37,6 %.

Таблиця 2. Вплив інокуляції штамами *R. galegae* на вміст хлорофілу в листках козлятника лікарського першого та другого років вирощування (фаза цвітіння)

Варіанти дослідів	1-й рік вирощування			2-й рік вирощування		
	хлорофіл <i>a</i> , мг/100г	хлорофіл <i>b</i> , мг/100г	сума хлорофілів <i>a</i> і <i>b</i> , мг/100г	хлорофіл <i>a</i> , мг/100г	хлорофіл <i>b</i> , мг/100г	сума хлорофілів <i>a</i> і <i>b</i> , мг/100г
Контроль (без інокуляції)	121,26	39,02	160,28	143,79	41,14	184,93
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. 0703	95,96	40,31	136,27	164,36	32,77	197,13
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-8	146,92	62,34	209,26	187,60	44,91	232,51
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-12	153,11	80,19	233,30	179,52	36,95	216,47
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-13	177,59	107,72	285,31	204,47	46,02	250,49
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-16	165,58	94,27	259,85	203,21	51,18	254,39
НІР ₀₅	27,85	15,07		14,84	6,61	

Інокуляція досліджуваними штамами бульбочкових бактерій сприяла зростанню продуктивності козлятника лікарського як першого, так і другого років вирощування (табл. 3). Як свідчать результати, наведені в табл. 3, у перший рік вегетації рослин спостерігається значне зростання вмісту повітряно сухої речовини в надземній масі козлятника, інокульованого штамами Л-8, Л-12, Л-13 та Л-16, в порівнянні з іншими варіантами дослідів. Так, при бактеризації рослин цими штамами приріст врожаю сухої маси до контролю був у межах 30,0–58,6 %.

Найефективнішими виявились штами Л-13 та Л-16, які

збільшували врожайність сухої надземної маси козлятника лікарського відносно контролю відповідно на 2,8 та 2,0 т/га. Слід зазначити, що у варіанті з інокуляцією рослин неспецифічним штамом *R. galegae* 0703 продуктивність рослин була менша, ніж у контролі.

На другий рік вирощування достовірний приріст урожайності до контролю забезпечували лише рослини, інокульовані штамми Л-13 та Л-16 (відповідно 16,6 та 12,4 %). Продуктивність козлятника лікарського у варіанті з бактеризацією штамом 0703 була нижчою за аналогічний показник у контрольних рослин. Низька ефективність штаму 0703 щодо козлятника лікарського підтверджує існуючі літературні дані про високу специфічність макро- та мікросимбіонтів у системі козлятник - *R. galegae*.

Сукупний урожай, отриманий за два роки вегетації козлятника лікарського, свідчить про те, що ризобії (шт. Л-13 та Л-16), ізольовані з бульбочок рослини-господаря є набагато ефективнішими, ніж штам 0703, і за цим показником є значно кращими за представників природної популяції *R. galegae*.

Таблиця 3. Продуктивність козлятника лікарського першого та другого років вирощування

Варіанти дослідів	Урожайність сухої надземної маси, т/га, (1-й рік вирощування)	Урожайність сухої надземної маси, т/га, (2-й рік вирощування)	Продуктивність у сумі за 2 роки вирощування, т/га
Контроль (без інокуляції)	4,73	4,83	9,56
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. 0703	3,90	4,50	8,40
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-8	6,15	5,13	11,28
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-12	6,25	5,20	11,45
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-13	7,50	5,63	13,13
Інокуляція <i>R. galegae</i> шт. Л-16	6,75	5,43	12,18
НІР ₀₅	0,80	0,48	

Таким чином, за результатами дворічних польових досліджень з вивчення впливу інокуляції козлятника лікарського специфічними штамми бульбочкових бактерій *R. galegae* на активність та ефективність симбіозу встановлено, що всі штами є активними симбіонтами даної культури. Бактеризація насіння козлятника цими штамми сприяє зростанню кількості бульбочок на коренях рослин, активності симбіотичної азотфіксації, забезпечує підвищення вмісту хлорофілів у листках рослин та значно збільшує урожайність надземної маси. Штами Л-13 та Л-16 є перспективними для застосування як біоагентів препаратів для передпосівної обробки козлятника лікарського.

1. Волкогон В.В. Методичні рекомендації по визначенню азотфіксації в ґрунті та кореневій зоні рослин ацетиленовим методом. – Чернівці, 1997. – 14 с.

2. Губаньов О.Г. Вивчення основної і передпосівної підготовки ґрунту при вирощуванні козлятнику лікарського // Вісн. Полтавської держ. аграрн. акад. – 2002. - № 4. – С. 34–36.

3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

4. Емцев В.Т., Нице Л.К., Годова Т.В. и др. Эффективность фотосинтеза и активность фиксации азота в корневой зоне сельскохозяйственных растений // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. – М., 1985. – С. 252–260.

5. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник / За ред. А.М. Родзінського. – К., 1990. – 544 с.

6. Методы биохимического исследования растений. / Под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.

7. Нгуен Тхи Чи, Т.Ф. Андреева, Л.Е. Строгонова и др. Взаимосвязь фотосинтеза с азотфиксацией у растений люпина. // Физиол. раст. – 1983. – Т. 30, Вып. 5. – С. 925–930.

8. Рахметов Д.Б. Кормовые мальвы в агрофитоценозах Лесостепи Украины: интродукция, биология, сорта, возделывание. – К.: Фитосоциоцентр, 2000. – 288 с.

9. Утешу Ю.А., Лобас М.Г. Кормові ресурси флори України. – К.: Наук. думка, 1996. – 222 с.

10. Andronov E.E., Terefework Z., Roumiantseva M.L. et al. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, № 2. – P. 1067–1074.

ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ *RHIZOBIUM GALEGAE* НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ КОЗЛЯТНИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПЕРВОГО И ВТОРОГО ГОДА ВЫРАЩИВАНИЯ

¹Воробей В.С., ¹Ковалевская Т.М., ²Рахметов Д.Б.

¹Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

²Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко, г. Киев

*В условиях полевого опыта изучали эффективность инокуляции козлятника лекарственного новыми штаммами ризобий, изолированными из клубеньков растения-хозяина. Отмечено положительное влияние бактеризации растений исследуемыми штаммами клубеньковых бактерий на основные показатели бобово-ризобиального симбиоза как в первый, так и второй год вегетации козлятника лекарственного. По результатам исследований отобраны два штамма *R. galegae* – Л-13 и Л-16, которые способствуют увеличению численности клубеньков на корнях растений, активности симбиотической азотфиксации, содержания хлорофилла в листьях растений и продуктивности козлятника.*

Ключевые слова: козлятник лекарственный, *Rhizobium galegae*, инокуляция, бобово-ризобиальный симбиоз.

THE INFLUENCE OF *RHIZOBIUM GALEGAE* STRAINS ON THE DEVELOPMENT OF PLANTS OF *GALEGA OFFICINALIS* AT FIRST AND SECOND YEAR OF CULTIVATION

¹Vorobey V.S., ¹Kovalevska T.M., ²Rahmetov D.B.

¹Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

²N.N. Grishko National Botanical Garden, NASU, Kyiv

*The efficiency of inoculation of *Galega officinalis* by new strains of rhizobium allocated from nodules of the plant-owner was studied in conditions of field experience. Positive influence of bacterization of the plants by researching strains of nodule bacteria on the basic parameters of legume- rhizobial symbiosis as in the first and second year of vegetation of *Galega officinalis* is noted. Two strains *R. galegae* - Л-13 and Л-16 which promote increase in number nodules on roots of plants, activity symbiotic nitrogen fixation, contents of a chlorophyll in leaves of plants and productivity of *Galega* were selected by results of researches.*

Key words: *Galega officinalis*, *Rhizobium galegae*, inoculation, legume- rhizobial symbiosis.