

## **ВПЛИВ МІСЦЕВИХ ШТАМІВ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICIAE* НА РОСЛИНИ ГОРОХУ ПОСІВНОГО**

**Стамбульська У.Я., Лушчак В.І.**

Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника,  
вул. Шевченка, 57, м. Івано-Франківськ, 76025, Україна  
E-mail: lushchak@pu.if.ua

*Вивчали вплив інокуляції бульбочковими бактеріями на ефективність утворення бобово-ризобіального симбіозу та вміст хлорофілу а у рослинах гороху посівного – Pisum sativum L. Інокуляція насіння бактеріями Rhizobium leguminosarum, штамми RRL9 та RRL11, привела до збільшення надземної маси рослин і маси кореневих бульбочок порівняно з інокуляцією іншими місцевими штамми і стандартним штамом Rhizobium leguminosarum 245a. На початкових етапах онтогенезу гороху концентрація хлорофілу а в усіх інокульованих бактеріями рослинах була більшою порівняно з контролем.*

Ключові слова: *бульбочкові бактерії, Pisum sativum L., інокуляція, хлорофіл а*

Важливим джерелом рослинного білка для людини є горох. Рівень продуктивності цієї культури значною мірою залежить від ефективності симбіозу з бульбочковими бактеріями, що визначається активністю та конкурентоспроможністю штамів за конкретних ґрунтово-кліматичних умов, комплементарністю їх до певного сорту та ін. [1]. Застосування активних штамів азотфіксувальних бактерій для передпосівної обробки насіння забезпечує підвищення рівня азотфіксації у ризосфері, сприяє інтенсифікації фотосинтезу, що, в свою чергу, приводить до збільшення врожайності бобових рослин [2, 3]. Тому на даний час проводиться інтенсивний пошук нових високоефективних штамів азотфіксувальних бактерій.

Метою роботи було вивчення впливу бульбочкових бактерій гороху, виділених на території Івано-Франківської області, на формування бобово-ризобіального симбіозу та концентрацію хлорофілу а в листі *Pisum sativum L.*

**Матеріали й методи.** Об'єктом дослідження були швидкорослі бульбочкові бактерії *Rhizobium leguminosarum bv.*

*viciae*, штами RRL7, RRL8, RRL9 і RRL11, ізольовані з корневих бульбочок рослин гороху посівного, відібраних на полях в Івано-Франківській області. Для визначення ефективності місцевих штамів використовували стандартний штам *Rhizobium leguminosarum* 245a, отриманий з колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного.

Бактерії вирощували в рідкому живильному середовищі Фреда при 27 °С на шейкері (120 коливань за хвилину) [4].

Польовий експеримент проводили на базі дендропарку “Дружба” Прикарпатського національного університету ім. В. Стефаника (м. Івано-Франківськ) на дерново-підзолистому ґрунті. Розмір ділянок становив 2,0 × 1,5 м. Ширина міжрядь – 15 см, глибина загортання насіння – 5-7 см [5]. Поверхнево стерилізоване насіння гороху сорту Альфа обробляли суспензією різних штамів бульбочкових бактерій, інокуляційне навантаження становило  $1,2 \cdot 10^8$  клітин на насінину. Насіння у контрольному варіанті обробляли водою.

Обліки проводили тричі впродовж вегетаційного періоду у фази: 4-5 листків (14 днів після появи сходів), бутонізації (30 днів після появи сходів) і цвітіння (42 дні після появи сходів). Визначали приріст надземної частини і коренів рослин, вміст хлорофілу *a* у листках, кількість і масу корневих бульбочок [8, 9].

Концентрацію хлорофілу *a* в листках визначали спектрофотометрично [6] і обчислювали за формулою:

$$C_{\text{chl } a} = 13,36 A_{664,2} - 5,19 A_{648,6},$$

де  $C_{\text{chl}}$  – концентрація хлорофілу (мкг/мл),  $A$  – оптична густина зразка за відповідної довжини хвилі.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп’ютерної програми MYNOVA [7], використовуючи критерій Стьюдента. Дані представлені як середнє ± похибка середнього ( $M \pm m$ ).

**Результати та їх обговорення.** В результаті проведених експериментів показано, що висота інокульованих рослин гороху у фази 4-5 листків і бутонізації перевищувала таку в контролі на 13-37 %. У фазу цвітіння висота рослин гороху, інокульованих штамми RRL7, RRL8 і RRL11 була більшою порівняно з контролем у 1,3-1,6 рази. У рослин, оброблених бактеріями штаму RRL11, у фази 4-5 листків і цвітіння довжина пагона була більшою, ніж у рослин, інокульованих штамом 245a, на 24 і 34 %, відповідно.

Довжина кореня у фазу 4-5 листків була більшою відносно контролю у рослин, інокульованих як референтним штамом, так і місцевими штамми RRL8, RRL9, RRL11. У фазу цвітіння у рослин, інокульованих штамми RRL7 та RRL9, довжина кореня була меншою за таку в контролі на 28 і 22 %, відповідно.

Одним із критеріїв при аналізі ефективності бобово-ризобіального симбіозу є маса рослин [8]. Як видно з табл. 1, у фази бутонізації і цвітіння у рослин, оброблених штамом RRL11, маса пагона була більшою порівняно з контролем на 51 і 41 %, відповідно. Подібний ефект простежували на 30-й день після сходів у рослин, інокульованих бактеріями штамів RRL8 і RRL7.

Маса коренів рослин, інокульованих бактеріями штамів RRL8, RRL9 і RRL11, у фазу 4-5 листків була більшою відносно контролю у 1,2-1,3 раза. У фазу бутонізації маса кореня достовірно не відрізнялась від контролю, а у фазу цвітіння у рослин, інокульованих бактеріями штамів RRL7, RRL8, RRL9 і 245a, була нижчою.

*Таблиця 1. Вплив досліджуваних штамів бульбочкових бактерій на масу рослин гороху*

Варіанти досліджу	Фаза 4-5 листків		Фаза бутонізації		Фаза цвітіння	
	маса надземної частини, г	маса кореня, г	маса надземної частини, г	маса кореня, г	маса надземної частини, г	маса кореня, г
Контроль (без інокуляції)	1,91±0,15	1,02±0,11	8,1±1,3	1,65±0,22	18,9±3,1	1,99±0,20
Штам RRL7	2,01±0,19	1,26±0,10	10,0±1,2	1,36±0,15	27,0±2,9 <sup>1</sup>	0,95±0,15 <sup>3</sup>
Штам RRL8	2,13±0,11	1,30±0,11 <sup>1</sup>	12,0±1,4 <sup>1</sup>	1,34±0,09 <sup>a</sup>	19,5±1,4	1,49±0,15 <sup>1</sup>
Штам RRL9	2,18±0,13	1,23±0,06 <sup>1</sup>	11,4±1,4	1,40±0,09	16,2±2,8	0,93±0,07 <sup>3</sup>
Штам RRL11	2,10±0,10	1,31±0,09 <sup>1</sup>	12,2±1,5 <sup>1</sup>	1,57±0,10	26,7±3,0 <sup>1</sup>	1,58±0,26
Штам 245a	1,89±0,13	1,24±0,06	10,7±2,0	1,63±0,17	20,4±2,5	1,31±0,21 <sup>2</sup>

*Примітка:* <sup>1</sup> значення достовірно відмінне від контролю,  $P < 0,05$ ; <sup>2</sup> $P < 0,025$ ; <sup>3</sup> $P < 0,005$ ; <sup>a</sup> значення достовірно відмінне від показників варіанту з інокуляцією штамом 245a,  $P < 0,05$ ;  $n = 9-20$ .

Як відомо, кількість і маса кореневих бульбочок також є важливим критерієм для оцінки ефективності бобово-ризобіально-го симбіозу [8]. Формування максимальної кількості бульбочок спостерігали у фази 4-5 листків і бутонізації за інокуляції насіння бактеріями штаму RRL9 (табл. 2).

**Таблиця 2. Вплив досліджуваних штамів бактерій на формування кореневих бульбочок**

Варіанти досліджу	Фаза 4-5 листків		Фаза бутонізації		Фаза цвітіння	
	кількість бульбочок, од. на одну рослину	маса бульбочок, мг на одну рослину	кількість бульбочок, од. на одну рослину	маса бульбочок, мг на одну рослину	кількість бульбочок, од. на одну рослину	маса бульбочок, мг на одну рослину
Контроль (без інокуляції)	12,2±3,5	6,2±1,7	14,2±2,0	18,3±4,9	11,6±2,5	16,3±7,4
Штам RRL7	13,7±2,6	15,2±3,9 <sup>3</sup>	15,6±1,8	24,5±5,5	7,2±1,3 <sup>6</sup>	5,0±0,9 <sup>6</sup>
Штам RRL8	17,0±2,5	8,5±1,1	15,8±1,6	21,4±4,6	10,9±1,7	9,4±3,7 <sup>a</sup>
Штам RRL9	22,5±2,6 <sup>3</sup>	13,6±2,9 <sup>2</sup>	25,9±2,0 <sup>4</sup>	31,8±5,2 <sup>1</sup>	9,8±1,7	10,0±2,7 <sup>b</sup>
Штам RRL11	13,9±2,4	14,0±3,4 <sup>1</sup>	23,6±3,7 <sup>1</sup>	45,8±11,9 <sup>1</sup>	11,8±1,8	13,2±3,9
Штам 245a	17,0±3,4	11,9±3,3	19,4±4,2	24,6±4,8	15,8±3,3	23,8±6,0

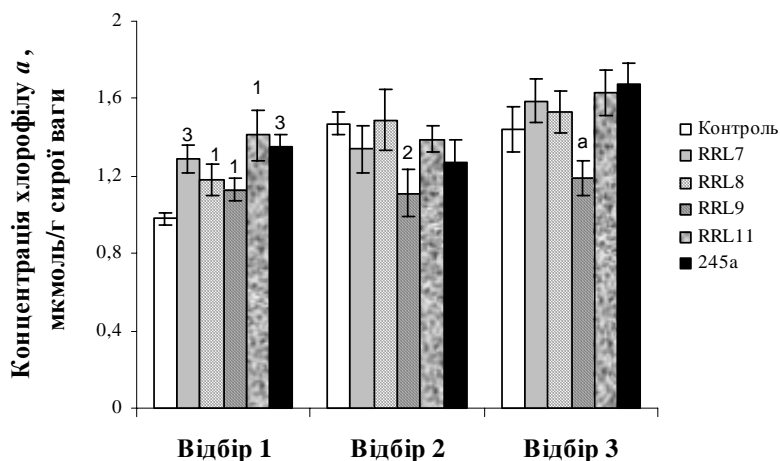
*Примітка:* <sup>1</sup> значення достовірно відмінне від контролю, P<0,05; <sup>2</sup>P<0,01; <sup>3</sup>P<0,025; <sup>4</sup>P<0,001; <sup>a</sup>значення достовірно відмінне від показників варіанту з інокуляцією штамом 245a, P<0,05; <sup>6</sup>P<0,01; <sup>b</sup>P<0,025; n=9-20.

На 30-й день після появи сходів кількість кореневих бульбочок у рослин за інокуляції штамом RRL11, перевищувала таку в контролі на 66 %. У фазу цвітіння рослин гороху кількість бульбочок, утворених у варіантах обробки насіння місцевими штамми, достовірно не відрізнялась від такої в контролі і спостерігалось її зменшення порівняно з попередніми фазами росту рослин. Даний ефект можна пояснити тим, що при переході на пізні стадії онтогенезу розвиток кореневої системи рослин припиняється і посилюються процеси деградації [10]. У фазу 4-5 листків маса бульбочок за інокуляції штамми RRL7, RRL9 та RRL11 перевищувала такий показник у рослин без інокуляції у 134

2,2-2,5 раза. За обробки насіння бактеріями штамів RRL9 і RRL11 у фазу бутонізації маса кореневих бульбочок також була більшою порівняно до контролю у 1,7 і 2,5 раза, відповідно. На 42-й день після сходів маса бульбочок у рослин гороху достовірно не відрізнялась від контролю. У рослин, інокульованих штамми RRL7, RRL8 і RRL9, даний показник був нижчий, ніж у референтного штаму.

Симбіотична азотфіксація функціонально пов'язана з фотосинтезом [1]. З літератури відомо, що існує позитивний зв'язок між інтенсивністю азотфіксації у кореневих бульбочках і вмістом хлорофілу *a* в листках [9,11]. У фазу 4-5 листків у рослин, інокульованих досліджуваними штамми бактерій, концентрація хлорофілу *a* в листках перевищувала показники контролю (рис.).

Значення достовірно відмінне від контролю:  $^1P < 0,05$ ,



$^2P < 0,025$ ,  $^3P < 0,005$ ; достовірно відмінне від значень для штаму 245a,  $^aP < 0,05$ ;  $n=3-6$ .

Рис. Вміст хлорофілу *a* у листках рослин гороху за обробки насіння досліджуваними штамми бульбочкових бактерій

Отримані результати свідчать, що рослини, інокульовані місцевими штамми *Rhizobium leguminosarum* RRL9 та RRL11, мали вищі, порівняно з контрольними рослинами, показники вмісту в листі хлорофілу *a*, а також кращі показники формування бобово-ризобіального симбіозу, в порівнянні з обробкою іншими досліджуваними штамми. За ефективністю формування бобово-ризобіального симбіозу стандартний штам *Rhizobium legumino-*

*sarum* 245a займав проміжне місце серед досліджуваних штамів бактерій. Таким чином, бульбочкові бактерії гороху утворюють ефективний бобово-ризобіальний симбіоз в тих кліматичних умовах, з яких їх було виділено.

1. Мандровская Н. М. Симбиотические свойства клубеньковых бактерий гороха, образующих клубеньки на фоне повышенного содержания азота / Н. М. Мандровская, С. М. Охрименко, Е. П. Старченков // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1994. — Т. 26, № 3. — С. 240–249.

2. Патыка В. Ф. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современной земледелии Украины / В. Ф. Патыка, Н. З. Толкачев, О. Ю. Бутвина // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2005. — Т. 37, № 5. — С. 384–393.

3. Тихонович И. А. *Rhizobiaceae*, молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / И. А. Тихонович, Н. А. Прохорова. — СПб, 2002. — 567 с.

4. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. — М. : Агропромиздат, 1987. — 135 с.

5. Лихочвор В. В. Рослиництво / В. В. Лихочвор. — Львів : Українські технології, 2002. — 717 с.

6. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes / H. K. Lichtenthaler // Methods Enzymol. — 1987. — Vol. 148. — P. 331–382.

7. Brooks S. P. J. A simple computer program with statistical test for the analysis of enzyme kinetics / S. P. J. Brooks // BioTechniques. — 1992. — Vol. 13. — P. 909–911.

8. Антипчук А. Ф. Особливості формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу за умов забруднення важкими металами / [А. Ф. Антипчук, О. М. Краснобрига, Н. О. Леонова та ін.] // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2002. — Т. 34, № 1. — С. 63–69.

9. Охрименко С. М. Вміст пігментів у рослинах гороху при інокуляції клонами бульбочкових бактерій, стійкими до мінерального азоту / С. М. Охрименко // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2001. — Т. 33, № 6. — С. 535–538.

10. Тарчевский И. А. Процессы деградации у растений / И. А. Тарчевский // Соросовский образовательный журнал. — 1996. — № 6. — С. 13–19.

11. Мандровская Н. М. Влияние инокуляции азотустойчивыми клонами клубеньковых бактерий на интенсивность фотосинтеза и азотфиксации у гороха / Н. М. Мандровская, С. М. Охрименко, Д. А. Киризий, Е. П. Старченков // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1995. — Т. 27, № 3. — С. 169–173.

## **ВЛИЯНИЕ МЕСТНЫХ ШТАММОВ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICIAE* НА РАСТЕНИЯ ГОРОХА ПОСЕВНОГО**

**Стамбульская У.Я., Лушчак В.И.**

Прикарпатский национальный университет им. В. Стефаныка, Ивано-Франковск

*Изучали влияние инокуляции клубеньковыми бактериями Rhizobium leguminosarum bv. viciae на эффективность формирования бобово-ризобияльного симбиоза и концентрацию хлорофилла а в растениях гороха – Pisum sativum L. Инокуляция семян бактериями Rhizobium leguminosarum, штаммами RRL9 и RRL11, приводила к увеличению надземной массы растений и массы корневых клубеньков по сравнению с инокуляцией другими местными штаммами и стандартным штаммом Rhizobium leguminosarum 245a. На начальных этапах онтогенеза гороха концентрация хлорофилла а у всех инокулированных бактериями растений была выше по сравнению с контролем.*

*Ключевые слова: клубеньковые бактерии, Pisum sativum L., инокуляция, хлорофилл а*

## **EFFECT OF LOCAL STRAINS OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICIAE* ON PEA PLANTS**

**Stambulska U.Ya., Lushchak V.I.**

Vassyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk

*Influence of inoculation with nodule bacteria Rhizobium leguminosarum bv. viciae on the efficiency of legume-rhizobium symbiosis formation as well as chlorophyll content in pea plants was studied. Seed inoculation with bacteria Rhizobium leguminosarum, strains RRL9 and RRL11 resulted in increase of aboveground plant mass and mass of nodules in the comparison with effects of inoculation with other local strains and collection Rhizobium leguminosarum 245a strain. At the initial stages of the pea ontogenesis the concentrations of chlorophyll a in all inoculated plants was more than in control. The local wild strains of pea nodule bacteria were effective in legume-rhizobium symbiosis formation under specific climate conditions, which are a natural ecological niche for those bacterial strains.*

*Key words: nodule bacteria, pea – Pisum sativum L., inoculation, chlorophyll a.*