

ВИВЧЕННЯ МІКРОФЛОРИ НАСІННЯ СОЇ ЯК ОДНОГО З ЙМОВІРНИХ ФАКТОРІВ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Крутило Д.В.

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

Наведено результати вивчення наявності бульбочкових бактерій сої в складі епіфітної та ендоефітної мікрофлори насіння сої різних сортів. Ризобій сої не виявлено на поверхні та в глибоких шарах насіння сої. Мікробіота насіння сої досліджених сортів представлена кількома морфологічними типами бактерій та грибів, кількість яких залежить від тривалості зберігання насіння.

Ключові слова: насіння сої, бульбочкові бактерії сої, епіфітна мікрофлора, ендоефітна мікрофлора.

Відомо, що поверхня рослин заселена різноманітними мікроорганізмами, які живуть і розмножуються на них. Значна кількість мікробів заноситься на рослини та насіння з повітрям, пилом, дощем та ін. Видовий склад цих мікроорганізмів залежить від рослини-живителя та умов навколишнього середовища [13]. Епіфітна мікрофлора здатна інтенсивно розвиватися за рахунок численних органічних та мінеральних речовини, що виділяються рослиною [5, 6].

Оскільки після проростання насіння епіфіти потрапляють на корені та інші органи рослин, вони можуть виступати одним із факторів, який впливає на їх ріст і розвиток [7]. С. Лебен одним із перших вивчав насіння як джерело мікроорганізмів для колонізації листків [11]. Він показав, що за умов високої вологості, коли проростки поміщали у вологу камеру, міграція бактерій відбувалася в тонкій плівці води з насіння на поверхню стебел. При підтриманні високої вологості всі частини проростків могли бути колонізовані бактеріями. Деякі автори вважають, що на рослинах-живителях цикл перенесення мікроорганізмів відбувається з насіння на поверхню листків та назад на насіння [3, 7].

Дослідники, які вивчають епіфітну мікрофлору, включають її до біотичних чинників, що діють у системі рослина – мікроорганізм

[10, 12]. Роботами багатьох вчених було показано, що епіфітна мікрофлора насіння може спричиняти істотний як позитивний, так і негативний вплив на розвиток та врожайність рослин [4]. Багато епіфітів здатні продукувати вітаміни та речовини, які стимулюють ріст коренів і надземної частини рослин, а інші є фітопатогенними мікроорганізмами. Рослини, в свою чергу, можуть впливати на чисельність епіфітів. І. Кошевський із співавт. [1], вивчаючи епіфітну мікрофлору сої, показав, що її кількісний та якісний склад залежить від сортової належності досліджуваної культури і змінюється від погодних умов та періоду вегетації рослин. Найбільш різноманітною вона була у стійких та середньостійких до пероноспорозу сортів сої.

Літературні дані щодо наявності бульбочкових бактерій у складі мікрофлори насіння бобових культур досить суперечливі. Деякі вчені вважають, що ризобії можуть потрапляти на насіння під час збирання урожаю певної культури, а після висівання насіння приживатися у ґрунті і формувати місцеві популяції ризобій. Але єдиної думки з цього питання не існує. Вивчення наявності бульбочкових бактерій у складі мікрофлори насіння сої як одного із факторів, який може сприяти розповсюдженню мікросимбіонта в різних регіонах України, є важливим для розуміння особливостей формування ґрунтових популяцій ризобій.

Метою нашої роботи було вивчити наявність бульбочкових бактерій сої (*Bradyrhizobium japonicum*) серед епіфітної та ендоефітної мікрофлори насіння сої різних сортів.

Матеріали й методи. Об'єктом дослідження було насіння сої різних сортів: Устя, Романтика, Київська 27, Київська 91, Артеміда, Побужанка, Мрія та Чернятка. Вилучення епіфітної мікрофлори проводили методом змивів поверхні насіння стерильною водою. Кількісний склад мікроорганізмів визначали шляхом висіву десятикратних розведень нативного змиву на пластинки бобового агару (г/л: K_2HPO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,5; $MgSO_4$ – 0,2; $CaSO_4$ – 0,1; $(NH_4)_2MoO_4$ – сліди; манніт – 20,0; люпиновий відвар – 100,0; агар-агар – 20,0; рН 6,8-7,0), який є основним середовищем для бульбочкових бактерій сої.

Вивчення ендоефітних мікроорганізмів проводили кількома методами:

1) Насіння сої двох сортів (Устя, Романтика) протягом 15 хвилин поверхнево стерилізували у 96 % спирті та промивали

стерильною водою. Стерилізоване насіння розтирали разом із стерильним піском у фарфорових ступках. Гомогенат переносили в колби із 100 мл стерильної води та готували серію десятикратних розведень. Оскільки бульбочкові бактерії належать до мікроорганізмів, яким властивий повільний ріст, з особливою ретельністю нами досліджувалися всі колонії, які з'являлися на 7–10 добу після посіву. З метою визначення належності мікроорганізмів до роду *Bradyrhizobium* кожен ізолят одночасно висівали на бобовий агар, м'ясо-пептонний агар (МПА) та лакмусове молоко.

2) Повехнево стерилізоване насіння сої пророщували на поверхні агарових пластинок у чашках Петрі. Після проростання насіння корінці розтирали в краплі води на предметному скельці та проводили мікроскопію.

3) Повехнево стерилізоване насіння вирощували в пробірках розміром 20 × 200 мм на безазотному середовищі (стерильний вермикуліт). За утворенням бульбочок на корінні рослин судили про наявність бульбочкових бактерій у складі ендofітної мікрофлори.

4) Нестерильне насіння сої сорту Устя вирощували в умовах вегетаційних дослідів на зразках ґрунту з різних регіонів України. Зразки ґрунту були відібрані з дослідних полів господарств, де сою вирощували вперше і насіння не інокулювали біопрепаратами на основі бульбочкових бактерій сої.

Результати та їх обговорення. Як видно з даних табл. 1, загальна чисельність мікроорганізмів на поверхні нестерильного насіння сої досліджених сортів коливається в широких межах і з часом поступово зменшується. Якщо в перший місяць зберігання насіння після збору урожаю вона становила 0,96–22,20 тис./насінину в залежності від сорту, то через шість місяців зберігання кількість епіфітів знизилася до 0,21–9,50 тис./насінину. Слід відмітити, що при механізованому збиранні врожаю кількість мікроорганізмів на насінні була значно більшою, ніж при збиранні врожаю вручну.

Встановлено, що колонії мікроорганізмів на поверхні агаризованого бобового середовища різняться за морфологією і пігментацією та представлені переважно бактеріями і грибами. Основна частина мікробів, що ізолюються з насіння сої – це рожево- та жовто-пігментовані бактеріальні форми. Слід зазначити, що багатьма дослідниками відмічалася наявність рожево-пігментованих бактеріальних форм серед представників епіфітної мікрофлори лікарських, сільськогосподарських та дикоростучих рослин [1,8,9].

Таблиця 1. Епіфітна та ендоефітна мікрофлора насіння сої

Варіанти (сорт сої)	Загальна чисельність мікроорганізмів, тис./насінину		Чисельність бульбочкових бактерій сої, клітин/насінину
	через один місяць зберігання насіння	через шість місяців зберігання насіння	
Епіфітні мікроорганізми			
Устя (механізований збір урожаю)	1,93 ± 0,85	–	0
Устя (збір урожаю вручну)	0,96 ± 0,19	0,21 ± 0,05	0
Київська 91 (механізований збір урожаю)	39,85 ± 7,53	8,30 ± 1,24	0
Київська 27 (механізований збір урожаю)	22,20 ± 2,63	9,50 ± 0,18	0
Ендоефітні мікроорганізми			
Романтика (механізований збір урожаю)	0,54 ± 0,18	–	0
Устя (механізований збір урожаю)	0,60 ± 0,00	–	0

Примітка: “–” – не визначали.

З насіння сої різних сортів у найбільшій кількості були ізольовані бактерії, що відносяться до роду *Bacillus*. Аналогічні дані отримані І. Кошевським із співавт. [1].

Оскільки бульбочковим бактеріям сої властивий повільний ріст, колонії мікроорганізмів, які з’являлися на 7–10 добу, висівали на діагностичні для ризобій середовища (МПА та лакмусове молоко). Серед них не виявлено бактерій, які за морфолого-культуральними властивостями можна було б віднести до бульбочкових бактерій сої. Всі вони росли на м’ясо-пептонному агарі, давали нетипову реакцію з лакмусовим молоком і за морфологією клітин відрізнялися від бульбочкових бактерій. Одержані дані свідчать, що серед епіфітної мікрофлори досліджених сортів сої бактерії виду *Bradyrhizobium japonicum* відсутні.

Вивчення морфолого-культуральних властивостей ендоефітних бактерій показало, що серед них також відсутні бульбочкові

бактерії сої. Загальна чисельність мікроорганізмів на поверхні та у глибоких шарах поверхнево стерилізованого насіння сої, яке зберігалось впродовж місяця після збору урожаю, становила 0,54–0,60 тис./насінину.

Незважаючи на наявність ендofітних мікроорганізмів, при вирощуванні стерильного насіння сої на поверхні бобового середовища в чашках Петрі ми не спостерігали росту бактерій навколо корінців. У тканинах корінців під час мікроскопії нами також не було виявлено бактерій. Можливо на початкових етапах проростання насіння ендofітні мікроорганізми ще залишаються в сім'ядолях.

Невідмічено інфікування кореневої системи сої бульбочковими бактеріями при вирощуванні стерилізованого насіння сої сорту Устя на стерильному субстраті (табл. 2). Нами також не виявлено бульбочок на коренях рослин і при пророщуванні на вермикуліті нестерилізованого насіння сої сортів Артеміда, Романтика, Устя, Київська 27, Київська 98, Побужанка, Мрія та Чернятка.

Таблиця 2. Наявність бульбочкових бактерій сої в складі епіфітної та ендofітної мікрофлори насіння сої

Варіанти досліджу	Субстрат, на якому висівали насіння	Сорти сої	Загальна кількість рослин, од.	Кількість рослин з бульбочками на коренях, од.
Епіфітна мікрофлора				
Нестерилізоване насіння	Вермикуліт	Артеміда	50	0
		Романтика	25	0
		Устя	50	0
		Київська 27	25	0
		Київська 91	50	0
		Побужанка	25	0
		Мрія	50	0
		Чернятка	50	0
Ендofітна мікрофлора				
Повехнево стерилізоване насіння	Вермикуліт	Устя	225	0

В іншому досліді нестерилізоване насіння сої сорту Устя висівали у ґрунт, на якому цю культуру ніколи не вирощували і в якому були відсутні бульбочкові бактерії сої (табл. 3). Більшість рослин на різних типах ґрунтів не були інфіковані ризобіями. Лише на коренях 2 із 203 рослин спостерігали утворення поодиноких (1–2 одиниць на рослину) бульбочок. Нами не встановлено, що було джерелом бактерій, які інфікували ці рослини.

Важливо зазначити, що за наявності ризобій сої в складі мікрофлори насіння коренева система рослин у посівах цієї культури повинна бути інфікована бульбочковими бактеріями. Однак при вивченні розповсюдження бактерій виду *Bradyrhizobium japonicum* в різних регіонах України, за відсутності фонові ризобіальної мікробіоти, ми не спостерігали утворення бульбочок на коренях рослин [2]. Отримані дані свідчать про те, що для сої наявність бульбочкових бактерій на поверхні та в глибоких шарах насіння не є характерною.

Таблиця 3. Утворення бульбочок на коренях сої сорту Устя при вирощуванні рослин на різних типах ґрунтів

Типи ґрунтів	Загальна кількість рослин, од.	Кількість рослин з бульбочками на коренях, од.
Лучно-чорноземний	25	0
Темно-сірий	24	0
Сірий лісовий	42	1
Чорнозем типовий	30	1
Чорнозем вилугуваний	25	0
Чорнозем південний	35	0
Дерново-підзолистий	22	0

Таким чином, бульбочкових бактерій сої в складі епіфітної та ендоефітної мікрофлори насіння сої нами не виявлено. Можна вважати, що інфікування рослин сої “власними бульбочковими бактеріями” з насіння не відбувається або ж це явище є дуже рідкісним. Воно не може суттєво впливати на загальну картину поширення бульбочкових бактерій в ґрунтах України. Для формування повноцінного соєво-ризобіального симбіозу обов’язковим агроприємом повинна бути штучна бактеризація насіння специфічними бульбочковими бактеріями.

Мікробіота насіння сої досліджених сортів представлена кількома морфологічними типами мікроорганізмів. Кількість епіфітів коливається в досить широких межах (0,96–22,20 тис. на насініну) і суттєво знижується при зберіганні насіння.

1. Кошевський І.І., Житкевич Н.В., Митько В.С. Епіфітна мікрофлора сої в умовах Лісостепу України //Наук. вісн. УжНУ. – 2001. – № 9 – С. 114–115.

2. Крутило Д.В., Ковалевська Т.М. Особливості поширення бульбочкових бактерій сої в різних регіонах України //Агроекол. журн. – 2003. – № 3. – С. 59–63.

3. Макарчик Є.А. Епіфітні бактерії: ріст і взаємодія на поверхні листків //Захист і карантин рослин. – 1999. – Вип. 45. – С. 100–109.

4. Мишустин Е.Н., Петрова А.Н., Карашук И.М. Эпифитная микрофлора семян эспарцета и повышение его урожайности //Изв. АН СССР. – 1955, № 2. – С. 23.

5. Новикова Н.С. Бактериальная флора надземных органов растений. – К.: Изд-во АН УССР, 1963. – 89 с.

6. Пасічник Л.А., Гвоздик Р.І., Ходос С.Ф. Епіфітні бактерії пшениці та їх вплив на *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* //Наук. вісн. УжНУ. – 2001. – № 9. – С. 158–160.

7. Петренко М.Б. Изучение микрофлоры, сопутствующей развитию гороха //Микробиологические и биохимические исследования почв. – К.: Урожай, 1971. – С. 61–63.

8. Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Р.М. Распространение бактерий рода *Methylobacterium* в различных экосистемах Украины //Мікробіол. журн. – 1996. – Т. 58, № 3. – С. 3–10.

9. Austin B., Goodfellow M. *Pseudomonas mesophillica*, a new species of pink bacteria and selected from leaf surfaces //Int. J. Syst. Bacteriol. – 1979. – Vol. 29, № 4. – P. 373–378.

10. Lebel C. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease // Ann. Rev. Phytopathol. – 1965. – № 3. – P. 209–230.

11. Leben C. Microorganisms of cucumber seedling //Phytopathol. – 1961. – Vol. 51. – P. 553–557.

12. Mew T.W., Kennedy B.W. Seasonal variation in populations of pathogenic *Pseudomonas* on soybean leaves //Phytopathol. – 1982. – Vol. 72. – P. 103–105.

13. O'Brien R.D., Lindow S.E. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic populations sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria //Phytopathol. – 1989. – Vol. 79. – P. 619–627.

**ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ СЕМЯН СОИ
КАК ОДНОГО ИЗ ВЕРОЯТНЫХ ФАКТОРОВ
РАСПРОСТРАНЕНИЯ *BRADYRHIZOBIUM
JAPONICUM***

Крутило Д.В.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

Приведены результаты изучения наличия клубеньковых бактерий сои в составе эпифитной и эндофитной микрофлоры семян сои разных сортов. Ризобии сои не обнаружены на поверхности и в глубоких слоях семян сои. Микробиота семян сои исследованных сортов представлена несколькими морфологическими типами бактерий и грибов, количество которых зависит от длительности хранения семян.

Ключевые слова: *семена сои, клубеньковые бактерии сои, эпифитная микрофлора, эндофитная микрофлора.*

**STUDY OF SOYBEAN SEED MICROFLORA
AS A ONE OF PROBABLE FACTORS OF
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM DISTRIBUTION**

Krutylo D.V.

Institute of Agriculture Microbiology, UAAS, Chernihiv

The results of studying of the soybean nodule bacteria presence in epiphytic and endophytic microflora of different grades of soybean seeds are presented. The soybean rhizobia was not revealed on the surface and in deep layers of soybean seeds. The soybean seed microbiota of investigated varieties is presented by several morphological types of bacteria and fungi. Their quantity depends on the period of seed storage.

Key words: *soybean seeds, soybean nodule bacteria, epiphytic microflora, endophytic microflora.*