

## ОПТИМІЗАЦІЯ АЛЕЛОПАТИЧНОГО ТА МІКРОБІОЛОГІЧНОГО СТАНУ ПРИКОРЕНЕВОГО СЕРЕДОВИЩА РОСЛИН *CITRUS LIMON* (L.) BURM. ЗА УМОВ ОРАНЖЕРЕЙНОЇ КУЛЬТУРИ

Н. Павлюченко\*, Н. Елланська, О. Юношева, В. Доброскок, С. Крупа

Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України  
вул. Тімірязєвська, 1, Київ 01014, Україна  
e-mail: npavliuch@gmail.com

Досліджено вплив кремнієвмісної суміші на алелопатичні та мікробіологічні характеристики прикореневого середовища рослин лимону (*Citrus limon* (L.) Burm.) з метою збереження генофонду цінних інтродуцентів. Кремнієвмісну суміш вносили у ґрунт під багаторічні насадження *Citrus limon* сорту Genua колекції цитрусових рослин Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України за умов оранжерейної культури. Виявлено позитивний вплив кремнієвмісної суміші на ґрунтову мікробіоту лимонарію. Застосування кремнієвмісної суміші призводило до зростання кількості досліджуваних еколого-трофічних груп мікроорганізмів, крім мікроміцетів, у ґрунті під рослинами *Citrus limon* в усі терміни спостережень. Інтенсифікація трансформації органічної речовини сприяла зменшенню темпів акумуляції рухливих форм фенольних сполук, що виконують алелопатичну функцію та можуть знижувати продуктивність рослин, у прикореневого середовища *Citrus limon*. Використання кремнієвмісної суміші оптимізувало окисно-відновний режим і алелопатичний стан прикореневого ґрунту багаторічних насаджень *Citrus limon*. Ефективність застосування кремнієвмісної суміші, загалом, підвищувалася зі збільшенням терміну після її внесення.

*Ключові слова:* *Citrus limon* (L.) Burm., фенольні алелохімікати, мікроміцети, бактерії, кремнієвмісна суміш

Останнім часом гостро постає проблема зниження врожайності багаторічних цитрусових насаджень і зростає ризик їхньої масової загибелі у провідних країнах-постачальниках даної продукції, що у більшості випадків пов'язують із ураженням збудниками інфекційних захворювань і шкідниками [10, 19]. Однак однією з причин цього може бути алелопатична складова, оскільки у цитрусових садах вже давно спостерігали явище ґрунтовтоми, головним чинником якого вважають фітотоксини корневих решток [16]. Основними ознаками ґрунтовтоми є погіршення росту і порушення фізіолого-біохімічних процесів рослинного організму, що характерно за беззмінного вирощування низки плодкових культур, таких як яблуна, абрикоса, персик, виноград та ін. [11, 13, 18, 22]. Алелопатична ґрунтовтома притаманна перш за все одновидовим штучним фітоценозам тривалої експлуатації.

Як відомо, у замкнутих штучних екосистемах (насамперед за оранжерейних умов) вплив алелопатичного фактора на функціонування останньої посилюється внаслідок акумуляції рослинних екзометаболітів і продуктів деструкції в обмеженому просторі [2]. При цьому вагомою ланкою, що визначає характер його прояву, є ґрунтова мікробіота. Адаптивна ризосфера – зона активної комунікації рослин і мікроорганізмів, яка відбувається за допомогою обміну метаболітами [15, 17]. Фізіологічно активні речовини (фенольні сполуки, гормони, амінокислоти, вуглеводи та ін.), що накопичуються у ризосфері рослин, впливають, у свою чергу, на розвиток і функціональну активність ґрунтових мікроорганізмів.

Ґрунтова мікробіота бере участь у формуванні та регулюванні практично усіх корисних властивостей ґрунту.

З огляду на це, особливої актуальності набуває впровадження безпечних надійних заходів оздоровлення прилеглого ґрунту цитрусових культур і їхнє збереження в інтродукційних осередках, таких як ботанічні сади з оранжерейними комплексами.

Численні дослідження підтверджують ефективність застосування природних кремнієвмісних мінералів для покращення фізико-хімічних властивостей ґрунту, підвищення його родючості, подолання наслідків ґрунтової та зростання стійкості інтродукованих рослин до несприятливих факторів довкілля за умов монокультури [5, 8, 9].

Мета нашого дослідження – проаналізувати вплив кремнієвмісної суміші на алелопатичні та мікробіологічні характеристики прикореневого середовища багаторічних насаджень лимону (*Citrus limon* (L.) Burm.) за умов оранжерейної культури для збереження цінних інтродуцентів.

### Матеріали та методи

Кремнієвмісну суміш (перегній і анальцим – 10:1) у дозі 50 г/м<sup>2</sup> вносили у прикореневий ґрунт багаторічних насаджень лимону (*Citrus limon* (L.) Burm.) сорту Генуа колекції цитрусових рослин Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України, закладеної у 50-ті рр. ХХ ст. [10] за умов оранжерейної культури.

Зразки ґрунту аналізували через 1, 3 та 5 місяців після застосування зазначеної суміші. Контроль – ґрунт лимонарію без додавання суміші.

Виділення мікроорганізмів зі свіжовідібраних зразків ґрунту здійснювали методом посіву ґрунтових суспензій у відповідних розведеннях на селективні агаризовані живильні середовища за загальноприйнятими у ґрунтовій мікробіології методиками [6, 14]. Спрямованість мікробіологічних процесів визначали за К. Андреюк зі співавт. [1] і методикою, описаною В. Мухом [12].

Коефіцієнт мінералізації-імобілізації розраховували за формулою:

$K_m-i = C_{КАА} / C_{МПА}$ , де  $C_{КАА}$ ,  $C_{МПА}$  – кількість мікроорганізмів, що виростили на, відповідно, крохмаль-аміачному (КАА) та м'ясопептонному (МПА) агарах.

Показник мікробіологічної трансформації органічної речовини ґрунту розраховували за співвідношенням сумарної кількості мікроорганізмів на МПА і КАА та показника мінералізації.

Чисельність бактерій роду *Azotobacter* визначали методом аплікації на поверхню агаризованого середовища Ешбі [7].

Ідентифікацію ґрунтових мікроміцетів проводили за [20].

Фенольні речовини виділяли з ґрунту методом іонного обміну (десорбції), використовуючи іонообмінник КУ-2-8 (H<sup>+</sup>) як модель кореневої системи з розчинювальною і поглинальною здатністю щодо рухливих органічних сполук [3]. Контакт ґрунту зі смолою відбувався у плоскодонній колбі з притертою пробкою в нейтральному середовищі (етилловий спирт) за співвідношення ґрунт:смола:спирт – 1:1:2. Вміст колби добре перемішували і залишали для контакту на 48 год. Після цього елюати відокремлювали шляхом центрифугування при 6 тис. об./хв протягом 20 хв. Після видалення надосадової рідини вміст центрифужних пробірок змивали етиловим спиртом і продовжували елюювання протягом 18 год. У подальшому екстракцію проводили у такій же послідовності двократно водним ацетоном (2:1 по об'єму). Отримані елюати концентрували на водяній бані або ротаційному випарнику. Сухі залишки спиртових елюатів розчиняли в 5 мл 96 %-ного, а

водно-ацетонових – в 10 мл 48 %-ного етанолу. В отриманих спиртових розчинах двох елюатів (спиртовий і водно-ацетоновий) проводили визначення суми фенольних речовин з реактивом Фоліна-Чокальте спектрофотометрично на довжині хвилі 730 нм.

Визначали окисно-відновний потенціал (ОВП) ґрунту [3]. Для цього ґрунтову пасту (ґрунт і дистильована вода – 1:1) добре перемішували й аналізували за допомогою іономіра И-160 (Гомельський завод вимірювальних приладів, Білорусь).

Алелопатичний аналіз ґрунту здійснювали методом прямого біотестування [4]. Наважку ґрунту 50 г (середня проба) вміщували у ступку та зволожували водою приблизно до 75 % від повної вологості, що відповідало пастоподібному стану ґрунту, ретельно розтирали його товчачиком. Потім суспензію переносили у чашку Петрі. Під час струшування чашки на поверхні ґрунту утворювалося легке водне дзеркало, на яке накладали фільтр, що точно відповідав діаметру чашки. На фільтр розклали проростки крес-салату (*Lepidium sativum* L.) (15 штук). Чашки Петрі без кришок вміщували у загальну кювету, в яку для зволоження наливали трохи води, накривали її склом і ставили у термостат при 26 °С. Через добу вимірювали довжину коренів у досліді та контролі. Головним критерієм відтворення результатів є використання для аналізу свіжовідібраного ґрунту.

Статистичну обробку даних здійснено за допомогою пакету програм *Microsoft Excel*.

#### Результати і їхнє обговорення

Біохімічний стан ґрунту під рослинами *Citrus limon* оцінювали за значеннями окисно-відновного потенціалу (ОВП). ОВП ґрунту зростав через 3 та 5 місяців після застосування кремнієвмісної суміші відповідно в 1,2 та 1,4 разу порівняно з контролем, що свідчить про сповільнення темпів акумуляції лабільних органічних сполук під дослідними рослинами лимону (рис. 1). Треба відмітити, що у контролі переважали інтенсивно відновні процеси. За внесення кремнієвмісної суміші характер окисно-відновного процесу змінювався до помірно відновного, що є більш сприятливим для перебігу гуміфікації, поживного режиму, росту й розвитку рослин.

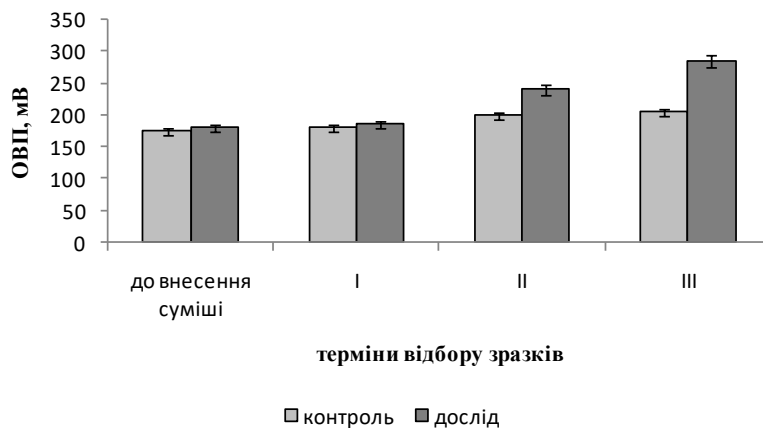


Рис. 1. Окисно-відновний потенціал ґрунту під рослинами *Citrus limon* (L.) Burm. при внесенні кремнієвмісної суміші, мВ. Терміни відбору зразків: I – 1 місяць після внесення кремнієвмісної суміші; II – 3 місяці; III – 5 місяців

Фенольні речовини вважають одним із найважливіших класів алелохімікатів завдяки їхній надзвичайній розповсюженості та широкому спектру дії, що охоплює як фізіолого-біохімічні процеси рослин, так і функціонування певних груп мікроорганізмів [21]. Окрім того, виявлено саме фенольну природу фітотоксинів, які вивільняються у ґрунт при

трансформації корневих залишків рослин лимону [16]. У зв'язку з цим досліджено динаміку акумуляції фенольних сполук у прикореневому середовищі *Citrus limon* за використання кремнієвмісної суміші.

Встановлено зниження вмісту фенольних речовин через 3 та 5 місяців після її внесення відповідно в 1,3 і 1,8 разу порівняно з контролем (рис. 2). Необхідно зазначити, що концентрація фенолів у контролі поступово збільшувалася протягом експерименту. Така тенденція, очевидно, є результатом як особливостей продукування екзометаболітів культурою лимону, так і їхнього мікробіологічного перетворення.

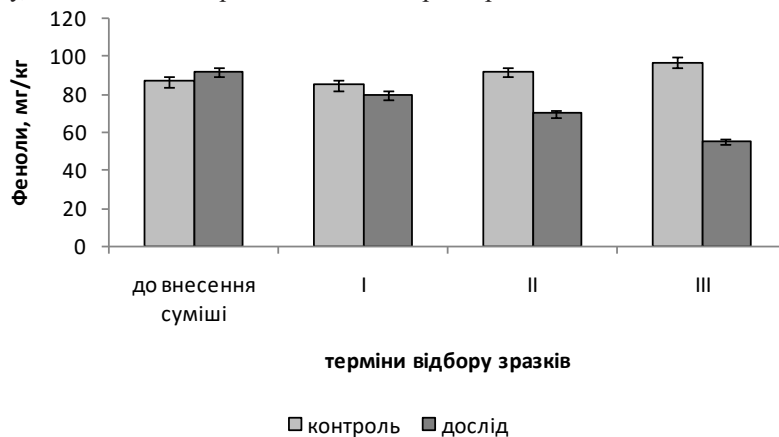


Рис. 2. Вміст фенольних речовин у ґрунті під рослинами *Citrus limon* (L.) Burm. при застосуванні кремнієвмісної суміші. Терміни відбору зразків див. рис.1

Протягом вегетаційного періоду рослин проводився мікробіологічний моніторинг ґрунту під дослідними об'єктами. Отримані дані показали, що внесення кремнієвмісної суміші призводить до зростання кількості досліджуваних еколого-трофічних груп мікроорганізмів, крім мікроміцетів, у ґрунті під рослинами *Citrus limon* (рис. 3, А, Б, В) в усі терміни спостережень.

Вплив суміші на збільшення чисельності актиноміцетів та іммобілізаторів мінерального нітрогену був помітний уже за місяць, тоді як амоніфікатори відреагували на її внесення лише за 3 місяці. З часом вплив кремнієвмісної суміші на активність мікроорганізмів послаблюється, але їхня кількість у досліді все ж більша за контроль.

Чисельність мікроміцетів у контрольних зразках була доволі високою протягом усього періоду спостережень, що може бути однією з причин посиленої акумуляції фенольних речовин, яка спостерігалася нами, оскільки саме ця група мікроорганізмів вважається причетною до їхнього синтезу (рис. 3, Г). За внесення кремнієвмісної суміші кількість мікроміцетів зменшилась (особливо через 3 місяці), що може розглядатись як позитивна її дія. При цьому видовий склад ґрунтових грибів був доволі обмеженим і не дуже різнився між контролем та дослідом. Переважали представники роду *Fusarium*, *Gliocladium* та *Penicillium*. Найбільше темнопігментованих видів трапляється у досліді, що свідчить про інтенсивність процесів гумусоутворення у ґрунті.

Мінералізація рослинних решток сприяє вивільненню водорозчинних органічних сполук і біосинтезу фізіологічно активних речовин, у тому числі й фенолів. Мінералізаційні процеси у досліді відбувалися повільно, на що вказують дані показника коефіцієнта мінералізації-іммобілізації (рис. 3, Д) (за винятком I терміну спостережень, де виявлено значну чисельність мікроорганізмів, що споживають мінеральний нітроген). При цьому

трансформація органічної речовини у ґрунті, яка завершується гуміфікацією, найбільш інтенсивно відбувалася за 3 місяці впливу кремнієвмісної суміші (рис. 3, Е).

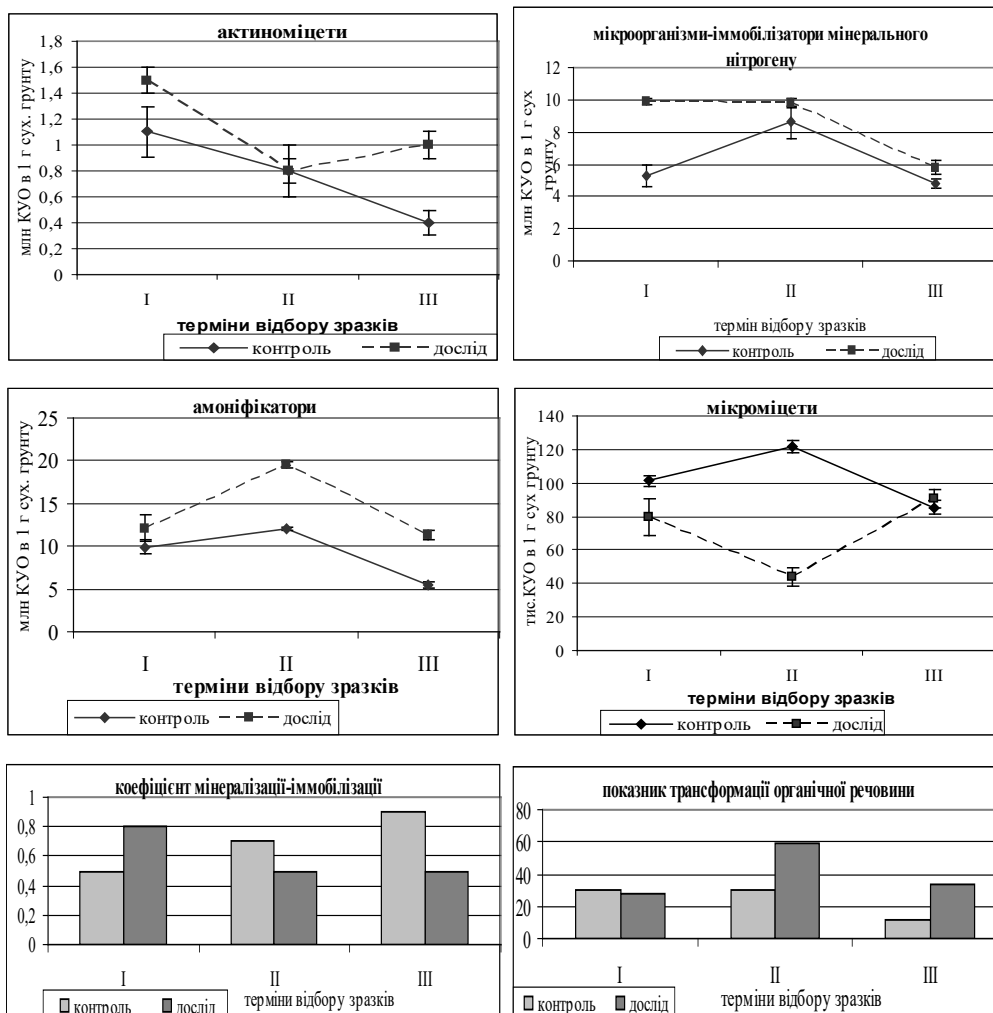


Рис. 3. Чисельність мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп та спрямованість мікробіологічних процесів у ґрунті під рослинами *Citrus limon* (L.) Burm. за дії кремнієвмісної суміші. Терміни відбору зразків див. рис. 1

У наших дослідках спостерігався інтенсивний розвиток вільноживучих азотофіксувальних мікроорганізмів, що може свідчити про відсутність надмірного вмісту сполук, які пригнічують процес азотофіксації. Відмінностей між варіантами дослідку нами не відмічено.

Аналіз алелопатичної активності прикореневого ґрунту показав ріст-стимулювальну дію на рослини-акцептори у відповідь на внесення зазначеної суміші на рівні 11 % (через 3 місяці) та 40 % (через 5 місяців) порівняно з контролем, що, очевидно, є наслідком зниження вмісту фітотоксичних речовин фенольної природи, поліпшення окисно-відновного режиму та характеристик мікробних угруповань (рис. 4).

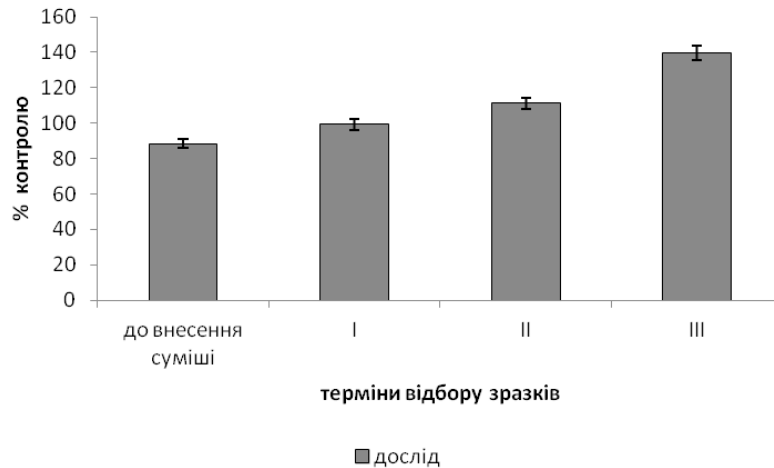


Рис. 4. Алелопатична активність ґрунту під рослинами *Citrus limon* (L.) Burm. за дії кремнієвмісної суміші, приріст коренів *Lepidium sativum* L. (% контролю). Терміни відбору зразків див. рис. 1

Отже, виявлено позитивний вплив внесення кремнієвмісної суміші на ґрунтову мікробіоту лимонарію. Інтенсифікація трансформації органічної речовини сприяла зменшенню темпів акумуляції рухливих форм фенольних сполук, що виконують алелопатичну функцію та можуть знижувати продуктивність рослин, у прикореновому середовищі *Citrus limon*. В цілому, застосування кремнієвмісної суміші оптимізувало окисно-відновний режим і алелопатичний стан прикоренового ґрунту багаторічних насаджень *Citrus limon* за умов оранжерейної культури, що є важливим для збереження генофонду цінних інтродукованих плодкових рослин з огляду на дію несприятливих факторів довкілля у межах природних ареалів. Ефективність використання кремнієвмісної суміші, загалом, підвищувалася зі збільшенням терміну після її внесення.

Автори висловлюють щиру вдячність кураторові колекції цитрусових рослин НБС НАН України І. В. Кикавському за сприяння у проведенні даних досліджень.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреюк Е. И., Валагурова Е. В., Мальцева Н. Н. Инструментальные методы в почвенной микробиологии. К.: Наук. думка, 1982. 220 с.
2. Гродзинский А. М., Головка Э. А., Безменов А. Я. и др. Взаимодействие летучих выделений в замкнутой экосистеме. К.: Наук. думка, 1992. 128 с.
3. Гродзинский А. М., Горобец С. А., Крупа Л. И. Руководство по применению биохимических методов в аллелопатических исследованиях почв. К., 1988. 18 с.
4. Гродзинский А. М., Кострома Е. Ю., Шроль Т. С., Хохлова И. Г. Прямые методы биотестирования почвы и метаболитов микроорганизмов // Аллелопатия и продуктивность растений. К.: Наук. думка, 1990. С. 121–124.
5. Довгалюк Н., Заценко Н., Павлюченко Н., Горб В. Проблемы многолетнего экспонирования *Syringa* L. в условиях монокультуры в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины // Formation of Urban Green Areas. 2016. Vol. 1. N 13. P. 84–89.
6. Елланська Н. Е., Левчик Н. Я., Юношева О. П. Мікробні угруповання прикоренового ґрунту представників роду *Vitex* L. // Gruntoznavstvo. Soil science. Ґрунтознавство. 2013. Т. 14. № 1–2 (22). С. 61–69.

7. Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособ. М.: Изд-во МГУ, 1991. 223 с.
8. Козлов А. В., Куликова А. Х., Яшин Е. А. Роль и значение кремния и кремнийсодержащих веществ в агроэкосистемах // Вестн. Мининск. ун-та. 2015. № 2. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://vestnik.mininuniver.ru/reader/search/rol-i-znachenie-kremniya-i-kremniysoderzhashchikh/>.
9. Кудренко І. К., Левон В. Ф., Заїменко Н. В., Мороз П. А. Використання анальциму для зниження вмісту фенольних речовин у ґрунті під плодовими рослинами // Інтродукція рослин. 2011. № 3. С. 93–97.
10. Кулян Р. В., Самарина Л. С., Рахмангулов Р. С. и др. Генетические ресурсы цитрусовых культур в России, Украине и Беларуси: хранение и использование // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. DOI 10.18699/VJ17.21-о [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://vavilov.elpub.ru/jour/article/download/945/907>.
11. Мороз П. А. Екологічні аспекти алелопатичної післядії едифікаторів садових фітоценозів: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.16. Дніпропетровськ, 1995. 51 с.
12. Муха В. Д. Естественнo-антропогенная эволюция почв. М.: Колос, 2004. 271 с.
13. Осипова І. Ю. Алелопатичні особливості нових плодових культур: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.12. К., 2000. 17 с.
14. Теннер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
15. Barea J. M., Pozo M. J., Azcon R. Microbial cooperation in the rhizosphere // J. Exp. Bot. 2005. Vol. 56. P. 1761–1778.
16. Bitters W. P. Citrus rootstocks: their characters and reactions. 1986. 230 p. [Electronic Resource]. Mode of Access: <http://www.citrusvariety.ucr.edu/links/documents/Bitters.pdf>.
17. Brensic A., Winans S. C. Detection and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005. Vol. 69. P. 155–194.
18. Brinker A. M., Creasy L. L. Inhibitors as a possible basis for grape replant problem // J. Amer. Soc. Hort. Science. 1988. N 113. P. 304–309.
19. Cronje C., Le Roux H. F., Truter M. et al. Long-term effects of preplant soil solarisation on growth of replant citrus trees in South Africa // African Plant Protection. 2002. Vol. 8. N 1&2. P. 41–49.
20. Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (10th ed.). Wallingford (UK): CABI, 2008. 771 p.
21. Li Z.-H., Wang Q., Ruan X. et al. Phenolics and plant allelopathy // Molekules. 2010. Vol. 15. P. 8933–8952.
22. Westphal A., Browne G. T., Schneider S. Evidence for biological nature of the grape replant problem in California // Plant and Soil. 2002. Vol. 242. N 2. P. 197–203.

Стаття: надійшла до редакції 30.05.17

доопрацьована 25.09.17

прийнята до друку 02.10.17

**OPTIMIZATION OF ALLELOPATHIC AND MICROBIOLOGICAL STATE  
OF *CITRUS LIMON* (L.) BURM. PLANTS ROOT ENVIRONMENT  
UNDER GREENHOUSE CONDITIONS**

**N. Pavliuchenko, N. Ellanska, O. Yunosheva, V. Dobroskok, S. Krupa**

*M. M. Gryshko National Botanical Gardens, NAS of Ukraine  
1, Timiryazevska St., Kyiv 01014, Ukraine  
e-mail: npavliuch@gmail.com*

To preserve gene pool of valuable introduced plants the effect siliceous mixture on allelopathic and microbiological characteristics of lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) root environment was studied. Siliceous mixture was added into soil under Genoa cultivar *Citrus limon* perennial plantations of citrus plants collection of the M.M. Gryshko National Botanical Gardens of NAS of Ukraine in greenhouse conditions. The positive effect of siliceous mixture on soil microbiota of lemon trees was found. Siliceous mixture application led to an increase in the number of investigated ecological trophic groups of microorganisms, except micromycetes, in the soil under *Citrus limon* plants in all terms of observation. Intensification of organic matter transformation contributed to the reduce the rate of the accumulation of phenolic allelochemicals mobile forms, which can decrease the productivity of plants, in the *Citrus limon* root environment. Using a siliceous mixture optimized redox and allelopathic state of soil under perennial *Citrus limon* plants. The efficiency of the siliceous mixture generally was raised with increasing time after its application.

*Keywords:* *Citrus limon* (L.) Burm., phenolic allelochemicals, micromycetes, bacteria, siliceous mixture