

УДК 579.64

**ФУНКЦІОНУВАННЯ АСОЦІАТИВНОЇ СИСТЕМИ
ДІАЗОТРОФИ-ОЗИМЕ ЖИТО ЗАЛЕЖНО ВІД
СОРТОВИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ РОСЛИН**

Надкернична О.В.

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

*Досліджено асоціативну азотфіксацію різних сортів озимого жита. Показано, що сорти Харківське 79, Струна, Новозибківське 150, Боротьба, Верхняцьке 32 характеризуються високим азотфіксувальним потенціалом. Зазначені сорти відзначалися високою здатністю відзиватися на інокуляцію ризосферними діазотрофами родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* і забезпечувати ефективне функціонування асоціативної системи діазотрофи – озиме жито.*

Ключові слова: сорти озимого жита, ризосферні діазотрофи, асоціативна азотфіксація.

Як нами було показано раніше, озиме жито належить до сільськогосподарських культур з високою активністю асоціативної азотфіксації. В кореневій зоні цієї культури створюються сприятливі умови для розвитку діазотрофів різних систематичних та екологічних груп. Найбільш поширеними і численними є гетеротрофні аеробні бактерії, серед яких представники родів *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Анаеробні гетеротрофи представлені видами роду *Clostridium* [1]. З різних сфер кореневої системи озимого жита виділено і одержано чисті культури бактерій, що належать до зазначених родів і відзначаються високою нітрогеназною активністю. Але не завжди діазотрофи, що активно фіксують молекулярний азот у чистій культурі на живильному середовищі, здатні формувати ефективні асоціації з рослинами і підсилювати процес асоціативної азотфіксації за інтродукції їх у кореневу зону рослин. У серії вегетаційних дослідів нами було перевірено 140 штамів діазотрофів з високим рівнем азотфіксувальної активності (від 1,02 до 11,2 мкг азоту на 1 мл живильного середовища за добу) і встановлено,

що інтродукція ризосферних бактерій родів *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum* у кореневу зону рослин озимого жита сприяла формуванню активної азотфіксувальної асоціації діазотрофи – озиме жито. При цьому найбільш суттєве збільшення нітрогеназної активності відмічено за використання представників роду *Azospirillum*. Застосування бактерій родів *Agrobacterium* і *Enterobacter* не сприяло одержанню ефективних асоціацій з озимим житом і підвищенню азотфіксувальної активності в кореневій зоні рослин [2].

Зважаючи на те, що активне функціонування асоціативної системи діазотрофи-рослина обумовлюється рівною мірою як мікро-, так і макросимбіонтом й існує міжсортова мінливість озимого жита за ознакою асоціативної азотфіксації [3], метою цієї роботи було визначити характерні особливості реагування різних сортів зазначеної культури на інокуляцію активними штамми діазотрофів.

Матеріали й методи. Здатність діазотрофів фіксувати атмосферний азот в асоціації з рослинами озимого жита вивчали газохроматографічним методом у непорушених ґрунтових монолітах за умов польових і вегетаційних дослідів. Польові досліді проводили на чорноземі глибокому малогумусному вилугуваному легкосуглинковому. Вміст гумусу в орному шарі – 2,8 %, рухомих форм фосфору (за Кірсановим) – 14,8 мг P_2O_5 , обмінного калію (за Чириковим) – 8,5 мг K_2O на 100 г ґрунту, $pH_{\text{сол}}$ – 5,4. Вегетаційні досліді проводили на дерново-підзолистому ґрунті з вмістом гумусу (за Тюрніним) – 0,6 %, P_2O_5 (за Кірсановим) – 8–10 мг, K_2O (за Масловою) – 10-15 мг на 100 г ґрунту, $pH_{\text{сол}}$ – 6,0.

У дослідях використовували сорти озимого жита Харківське 78, Струна, Новозибківське 150, Боротьба, Верхняцьке 32, Зоря, Зубровка. Інокуляцію насіння проводили трьохдобовими культурами діазотрофів з розрахунку 200-300 тис. бактеріальних клітин на одну насінину. Використовували культури діазотрофів, які згідно з попередніми дослідженнями стимулювали активність азотфіксації при інтродукції в кореневу зону озимого жита і утворювали стійкі асоціації з рослинами (*Pseudomonas sp.* 9-1, *Azospirillum brasilense* 18-2, *Azotobacter sp.* C-16, *Bacillus sp.* 1024) [2].

Потенційну нітрогеназну активність ризосферного ґрунту і відмитих коренів рослин зазначених сортів визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі “Chrom-8

4” з полум’яноіонізаційним детектором і колонкою з β - β -оксидипропіонітрилом. Як джерело вуглецю використовували цукрозу.

Математичну обробку одержаних даних проводили методом дисперсійного аналізу [4].

Результати та їх обговорення. Скринінг 52 сортів і гібридів озимого жита за ознакою асоціативної азотфіксації за умов польових дослідів показав, що спектр мінливості нітрогеназної активності залучених до роботи генотипів зазначеної культури складає від 0 до 65 мкг азоту на рослину за годину. Сорти з дуже високою і низькою азотфіксувальною активністю (більше, ніж 50 і менше, ніж 10 мкг азоту на рослину за годину) трапляються рідко. Біля 75 % досліджених сортів і гібридів озимого жита мали нітрогеназну активність у кореневій зоні від 15 до 25 мкг азоту на рослину за годину. Встановлено, що сорти Харківське 78, Струна, Новозибківське 150, Боротьба, Верхняцьке 32 забезпечують найвищу активність асоціативної азотфіксації, яка становить відповідно 32,0; 37,8; 41,7; 49,4; 52,5 мкг азоту на рослину за годину. Сорти Зоря, Зубровка мали низький азотфіксувальний потенціал і активність азотфіксації в їхній кореневій зоні складала відповідно 7,2 та 10,6 мкг азоту на рослину за годину. Підсумовуючи одержані результати багаторічних польових дослідів, можна констатувати, що азотфіксація є дуже мобільним процесом, на який впливають численні екологічні фактори (температура, вологість, фаза розвитку рослин, кількість продуктів кореневого екзоосмосу та ін.). Висока варіабельність фіксації атмосферного азоту викликана також динамічністю процесів трансформації азоту в ґрунті (денітрифікації, амоніфікації, нітрифікації) і перетворенням сполук азоту, які виникли в результаті їх перебігу. Зважаючи на вище зазначене, щоб уникнути впливу неконтрольованих факторів навколишнього середовища, у вегетаційних дослідях перевіряли потенційну нітрогеназну активність сортів озимого жита, які в умовах польових дослідів виявили контрастний рівень активності асоціативної азотфіксації.

В таблицях 1 і 2 представлено результати визначення потенційної азотфіксувальної активності на відмитих коренях і в ризосфері зазначених сортів озимого жита.

Як видно з наведених даних, найактивніше процес фіксації атмосферного азоту проходить у кореневій зоні озимого жита. У

фазу цвітіння рослин спостерігали максимальну потенційну активність азотфіксації як у ризосферному ґрунті, так і на відмитих коренях озимого жита. У зазначену фазу нітрогеназна активність у ризосферному ґрунті не залежала істотно від сортових особливостей рослин, проте спостерігали сортові відмінності азотфіксувального

Таблиця 1. Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях різних сортів озимого жита, нмоль C_2H_4/g коренів за годину

Сорт озимого жита	Фаза розвитку рослин		
	кущіння	колосіння	цвітіння
Харківське 78	185,3±7,04	120,8±9,42	802,7±36,85
Струна	168,6±5,43	184,2± 7,62	942,8±49,07
Новозибківське 150	180,8±10,13	275,8± 3,62	1209,6±33,27
Боротьба	190,6±12,38	404,6± 2,92	1063,6±52,08
Верхняцьке 32	320,1±18,04	464,8± 1,75	1330,8±42,16
Зоря	151,3±13,04	208,4± 10,28	331,8±12,88
Зубровка	88,0±18,58	126,7± 23,19	450,4±24,32

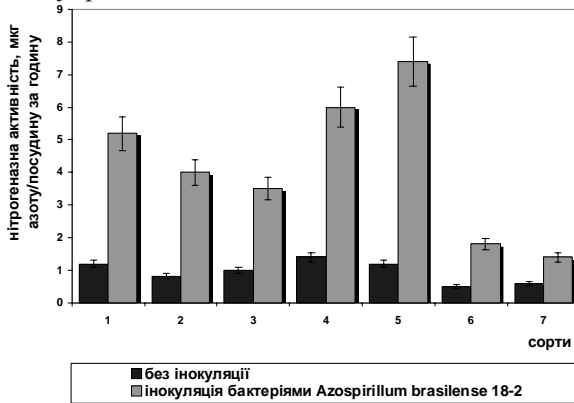
Таблиця 2. Потенційна нітрогеназна активність у ризосферному ґрунті різних сортів озимого жита, нмоль C_2H_4/g ґрунту за годину

Сорт озимого жита	Фаза розвитку рослин		
	кущіння	колосіння	цвітіння
Харківське 78	28,4±1,04	26,8±1,44	53,7±2,13
Струна	35,6±2,83	34,2± 3,12	72,8±4,87
Новозибківське 150	20,8±2,03	45,8± 3,62	49,6±5,27
Боротьба	18,6±1,88	44,6± 2,92	63,6±2,58
Верхняцьке 32	20,1±2,04	20,8± 1,75	45,8±2,16
Зоря	30,3±3,64	28,4± 3,88	31,8±2,18
Зубровка	15,02±4,88	26,7± 3,14	50,4±4,32

потенціалу на відмитих коренях. Аналогічно результатам, одержаним у польових дослідах, сорти Зоря і Зубровка характеризувалися найнижчим потенціалом азотфіксації, який був у 2-4 рази меншим від потенційної азотфіксувальної здатності відмитих коренів рослин жита сортів Харківське 78, Струна, Новозибківське 150,

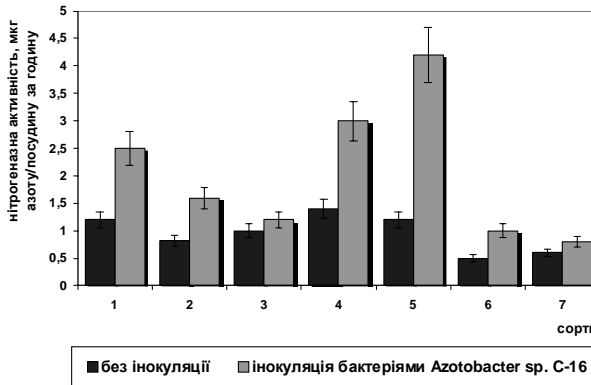
Боротьба, Верхняцьке 32.

Здатність досліджуваних сортів озимого жита відзиватися на інокуляцію діазотрофами вивчали в серії вегетаційних дослідів. Як свідчать одержані дані (рис. 1-4), сорти Харківське 78, Струна, Новозибківське 150, Боротьба, Верхняцьке 32 відзначалися більшою здатністю відзиватися на інокуляцію азотфіксувальними бактеріями родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, ніж сорти Зоря і Зубровка.



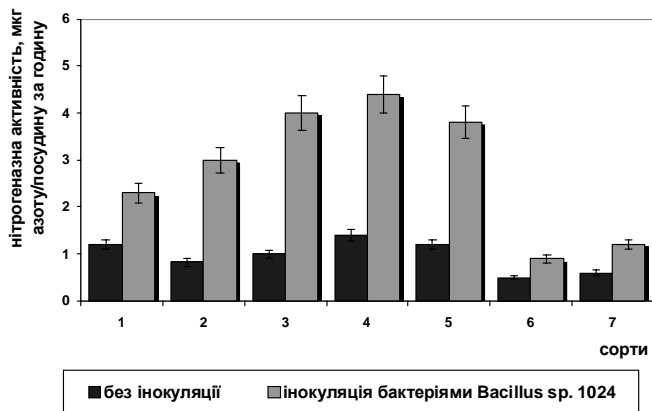
1 – Харківське 78; 2 – Струна; 3 – Новозибківське 150; 4 – Боротьба; 5 – Верхняцьке 32; 6 – Зоря; 7 – Зубровка

Рис. 1. Нітрогеназна активність у кореневій зоні озимого жита різних сортів за інокуляції азоспірилами



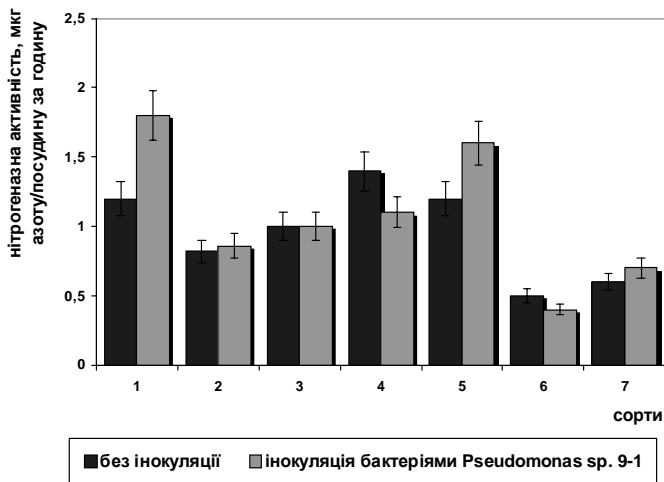
1 – Харківське 78; 2 – Струна; 3 – Новозибківське 150; 4 – Боротьба; 5 – Верхняцьке 32; 6 – Зоря; 7 – Зубровка

Рис. 2. Нітрогеназна активність у кореневій зоні озимого жита різних сортів за інокуляції азотобактером



1 – Харківське 78; 2 – Струна; 3 – Новозибківське 150;
4 – Боротьба; 5 – Верхняцьке 32; 6 – Зоря; 7 – Зубровка

Рис. 3. Нітрогеназна активність у кореневій зоні озимого жита різних сортів за інокуляції бацілами



1 – Харківське 78; 2 – Струна; 3 – Новозибківське 150;
4 – Боротьба; 5 – Верхняцьке 32; 6 – Зоря; 7 – Зубровка

Рис. 4. Нітрогеназна активність у кореневій зоні озимого жита різних сортів за інокуляції псевдомонадами

Одержані нами результати узгоджуються з даними літератури, згідно з якими ті сорти ячменю, в кореневій зоні яких мала місце підвищена активність азотфіксації, більш ефективно відзивалися на інокуляцію діазотрофами [5].

Завершальним етапом при відборі сортів озимого жита за їх здатністю забезпечувати активне функціонування асоціативної азотфіксувальної системи діазотрофи-рослина можна вважати визначення впливу бактеризації діазотрофами на продуктивність зазначеної культури. Ефективність бактеризації насіння озимого жита досліджуваних сортів ми вивчали за умов вегетаційних дослідів. Одержані результати показали, що при застосуванні азотфіксувальних бактерій значно підвищувалась продуктивність озимого жита тих сортів, які відзначалися високим азотфіксувальним потенціалом (табл. 3). Так, приріст сухої речовини надземної маси рослин озимого жита сортів Харківське 78, Струна, Новозибківське 150, Боротьба, Верхняцьке 32 у варіантах з діазотрофами складав від 16 до 40,1%. Найефективнішою виявилась інокуляція насіння озимого жита сорту Верхняцьке 32

Таблиця 3. Вплив діазотрофів на продуктивність озимого жита різних сортів (вміст сухої речовини в надземній масі рослин, г/посудину)

Варіанти дослідів	Сорти						
	Зоря	Зубровка	Струна	Верхняцьке 32	Боротьба	Новозибківське 150	Харківське 78
Без інокуляції (контроль)	4,9	5,2	5,7	6,3	7,5	5,0	7,2
Інокуляція <i>A. brasilense</i> 18-2	5,3	5,9	7,8	8,9	10,2	5,8	9,2
Без інокуляції (контроль)	5,3	5,8	6,4	6,8	7,2	5,7	7,4
Інокуляція <i>Azotobacter sp.</i> C-16	5,8	6,3	8,8	8,1	9,2	7,9	9,8
Без інокуляції (контроль)	5,1	5,7	6,2	6,7	7,8	6,0	7,7
Інокуляція <i>Bacillus sp.</i> 1024	5,4	6,0	8,3	9,1	10,0	7,8	10,3
Без інокуляції (контроль)	5,5	5,3	6,0	7,1	7,3	5,8	8,0
Інокуляція <i>Pseudomonas sp.</i> 9-1	5,7	5,2	7,2	9,0	8,2	7,0	9,6

Примітка: для варіанту з *A. brasilense* 18-2 $НІР_{05} = 0,20$;
 для варіанту з *Azotobacter sp.* C-16 $НІР_{05} = 0,28$;
 для варіанту з *Bacillus sp.* 1024 $НІР_{05} = 0,38$;
 для варіанту з *Pseudomonas sp.* 9-1 $НІР_{05} = 0,34$.

діазотрофом *Azospirillum brasilense* 18-2 (приріст до контролю – 40,1 %) та сорту Новозибківське 150 – бактеріями *Azotobacter sp.* С-16 (38,0 %). Продуктивність сортів з низьким азотфіксувальним потенціалом (Зоря, Зубровка) під впливом інокуляції азоспірилами і азотобактером підвищувалась незначною мірою (приріст від 8,2 до 13,5 %), застосування бацил і псевдомонад не дало позитивного результату.

Накопичені дотепер відомості стосовно контролю геномом рослини процесу асоціативної азотфіксації потребують аналізу, доповнення експериментальними даними і оцінки генотипів рослин за ознакою асоціативної азотфіксації. Селекція активних штамів діазотрофів та їх інтродукція в ризосферу рослин не може бути високоефективною без урахування здатності рослин забезпечувати умови оптимального перебігу процесу фіксації молекулярного азоту.

Таким чином, критеріями відбору сортів рослин, здатних забезпечувати ефективне функціонування азотфіксувальної системи діазотрофи-рослина, можуть бути: підвищена активність азотфіксування в кореневій зоні рослин, їхня спроможність реагувати на інокуляцію діазотрофами підвищенням асоціативної азотфіксації та зрештою – збільшенням продуктивності.

Відбір сортів рослин, які сприяють формуванню високоактивних щодо азотфіксації рослинно-мікробних асоціацій, дасть змогу розробити заходи, спрямовані на вирішення актуальної проблеми – поліпшення живлення рослин за рахунок біологічного азоту.

В останні роки у багатьох країнах почали створювати програми селекції бобових рослин з урахуванням ознак симбіозу. У деяких бобових (соя, червона конюшина, горох, люцерна) описано гени, що визначають їх здатність формувати ефективний симбіоз з бульбочковими бактеріями. Координована селекція бобових рослин і бульбочкових бактерій приносить значні успіхи [6-7].

Що стосується небобових сільськогосподарських культур, то підвищення ефективності функціонування асоціацій діазотрофи – небобова рослина проводиться, здебільшого, шляхом інтродукції в ризосферу рослин високоактивних штамів азотфіксувальних бактерій. При цьому роль рослини-живителя недооцінюється, селекція на здатність рослини до фіксації азоту атмосфери не ведеться. Стабільні позитивні результати при інтродукції

високоактивних штамів діазотрофів у ризосферу небобових рослин можна одержати за умови проведення координованої селекції рослин і мікроорганізмів. Перший принцип такої стратегії базується на тому, що більшість сортів інтенсивного типу в процесі селекції втратили природну здатність використовувати взаємодію з мікроорганізмами для оптимізації умов свого розвитку. Другий принцип ґрунтується на тому, що ефективність асоціативних взаємодій у системі діазотрофи – небобова рослина не є функцією тільки рослинного, або тільки мікробного генотипу. Характер взаємодії залежить від сумісності генів партнерів, і тому селекція на підвищення активності асоціативного симбіозу повинна бути спрямована на створення комплементарних комбінацій генотипів мікро- і макросимбіонту.

Отже, для того, щоб істотно підвищити інтенсивність асоціативної азотфіксації, необхідно об'єктом селекційної роботи визначити асоціативну систему діазотрофи – рослина як єдине ціле. Така стратегія за сучасного стану науки є справою майбутнього, тому що вона вимагає значних коштів і зусиль селекціонерів, мікробіологів, генетиків, екологів, молекулярних біологів, фізіологів рослин тощо. Селекція асоціативних систем діазотрофи – небобова рослина може стати новим напрямом у селекції, який буде реалізований шляхом паралельного поліпшення генотипів обох партнерів з наступним їх з'єднанням в оптимальних комбінаціях. Важливо відзначити, що вже є перші спроби проведення таких досліджень як на бобових, так і небобових культурах [8]. Це свідчить про принципову можливість розробки універсальної стратегії селекції рослин, за допомогою якої можна буде створювати принципово нові сорти, здатні повноцінно розвиватися не тільки за рахунок використання агрохімікатів, але й завдяки взаємодії з асоціативними мікроорганізмами. Саме ці взаємодії відкривають можливості розширення адаптивної амплітуди рослин, активізації метаболічних функцій і, на основі цього, одержання високоякісної і екологічно чистої сільськогосподарської продукції.

1. Мальцева Н.Е., Надкерничная Е.В., Волкогон В.В., Ушакова М.А. Активность азотфиксации и азотфиксирующие микроорганизмы ризосферы озимой ржи //Микробиол. журн. – 1992. – Т. 54, № 6. – С. 10–16.

2. Надкернична О.В. Здатність діазотрофів до формування

асоціативних систем з рослинами озимого жита //Агроекол. журн. – 2003. – № 3. – С. 17–20.

3. Надкернична О.В. Генетичний поліморфізм озимого жита за здатністю до асоціативної азотфіксації //Агроекол. журн. – 2003. – № 4. – С. 62–65.

4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

5. Шумный В.К., Степаненко И.Ю. Полиморфизм по ассоциативной азотфиксации у ячменя //Биологическая фиксация азота /Шумный В.К., Сидорова К.К., Клевенская И.Я. и др. – Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, 1991. – 271 с.

6. Тихонович И.А. Повышение эффективности симбиотической азотфиксации у бобовых //Микробиол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 14–22.

7. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под ред. Тихоновича И.А., Проворова Н.А. – С.-Пб.: Наука, 1998. – 194 с.

8. Tikhonovich I.A., Kozhemyakov A.P., Provorov N.A. et al. Genetic potential of plants for improving the beneficial microbe interactions //Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. – Berlin; Heidelberg, 1997. – P. 191–194.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АССОЦИАТИВНОЙ СИСТЕМЫ ДИАЗОТРОФЫ-ОЗИМАЯ РОЖЬ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОРТОВЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСТЕНИЙ

Надкерничная Е.В.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

*Изучена ассоциативная азотфиксация различных сортов озимой ржи. Показано, что сорта Харьковская 79, Струна, Новозыбковская 150, Борьба, Верхнячская 32 характеризуются высоким азотфиксирующим потенциалом. Указанные сорта отличались высокой способностью отзываться на инокуляцию ризосферными diaзотрофами родов *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и обеспечивать эффективное функционирование ассоциативной системы diaзотрофы-озимая рожь.*

Ключевые слова: сорта озимой ржи, ризосферные diaзотрофы, ассоциативная азотфиксация.

THE FUNCTIONING OF ASSOCIATIVE SYSTEM OF NITROGEN-FIXING BACTERIA-WINTER RYE ACCORDING TO PLANT SORT FEATURES

Nadkernychna E.V.

The Institute of Agriculture Microbiology, UAAS, Chernihiv

*The associative nitrogen fixation of different winter rye sorts has been studied. It has been shown that such sorts as Charkovskoe 79, Struna, Novozibkovskoe 150, Borba, Verchniachskoe 32 have high N_2 -fixing potential. The mentioned sorts were noted by their high sensitivity to inoculation of nitrogen fixing bacteria from *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* genuses and ability to supply with effective functioning of N_2 -fixing bacteria – winter rye associative system.*

Key words: winter rye sorts, rhizosphere N_2 -fixing bacteria, associative nitrogen fixation.