

СКРИНІНГ ДІАЗОТРОФІВ, ЩО ЗДАТНІ УТВОРЮВАТИ ЕФЕКТИВНІ АСОЦІАЦІЇ З РОСЛИНАМИ ПШЕНИЦІ

Гончар Ю.О.

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

*Проведено скринінг діазотрофів, виділених з ризосфери та ризоплани рослин пшениці 13 сортів. Показано, що найвищою нітрогеназною активністю характеризувався штам *Azospirillum sp. 77*, виділений з ризоплани ярої пшениці сорту Варяг. Інокуляція зазначеним штамом насіння пшениці сприяла підвищенню його схожості на 22,3 % та сухої маси паростків на 18,2 % у порівнянні з контролем, що свідчить про здатність *Azospirillum sp. 77* виділяти біологічно активні речовини. Досліджуваний штам індукує деформації кореневих волосків, що підтверджує властивість *Azospirillum sp. 77* викликати реакцію рослин пшениці сорту Варяг на інокуляцію. За даними попереднього скринінгу відібрано штам, здатний утворювати ефективні асоціації з рослинами пшениці.*

Ключові слова: *діазотрофи, рослини пшениці, нітрогеназна активність, схожість насіння*

Асоціативні мікроорганізми мають комплекс корисних властивостей, що сприяють підвищенню врожайності сільськогосподарських культур [1]. Так, бактерії родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus* та ін. характеризуються наявністю ферментного комплексу нітрогенази, яка забезпечує унікальну здатність до фіксації молекулярного азоту атмосфери [2–7]. В результаті інокуляції рослин діазотрофами підвищується продуктивність асоціативної азотфіксації, що сприяє додатковому нахожденню азоту, збільшенню врожайності й підвищенню вмісту азоту в зерні та фітомасі рослин. Крім того, майже всі діазотрофи ефективно впливають на рослини, стимулюючи їх ріст і фотосинтетичну активність [6]. Це відбувається внаслідок виділення діазотрофами біологічно активних речовин: вітамінів і фітогормонів [6, 8].

Однак, поряд з даними про позитивний вплив інокуляції на розвиток рослин, в літературних джерелах є повідомлення і про його відсутність [9], що може бути результатом несприятливої дії

факторів навколишнього середовища або неспецифічності бактерій до рослини.

Проблема пошуку і селекції високоактивних штамів азотфіксуючих бактерій для інокуляції небобових рослин – одна з найбільш важливих і разом з тим складних. Такі мікроорганізми повинні відповідати багатьом вимогам, і в тому числі, володіти здатністю колонізувати поверхню коренів рослин та протистояти конкуренції з боку природних угруповань мікроорганізмів [10].

Скринінг діазотрофів, що утворюють стійкі ефективні асоціації з рослинами, включає вивчення нітрогеназної активності бактерій у чистій культурі, біотести на здатність виділяти біологічно активні речовини, а також дослідження здатності бактерій приживатися в кореневій зоні рослин та аналіз впливу інокуляції діазотрофами на продуктивність рослин. Одним з достатньо швидких тестів виявлення реакції рослин на інокуляцію діазотрофами є аналіз деформацій корневих волосків за допомогою світлової мікроскопії. Морфологічні зміни коренів під впливом ґрунтових мікроорганізмів відомі давно і ретельно досліджені у бобово-ризобіальному симбіозі [11]. Показано також, що за інокуляції злакових рослин ефективними штамми *Azospirillum* відбувається підвищення кількості корневих волосків, їх розгалуження, потовщення та скручування [12–15]. Підрахунок кількості деформованих корневих волосків паростків є кількісним показником здатності рослин реагувати на інокуляцію досліджуваним штамом [16]. За даними С.А. Коннової та І.В. Єгоренкової [17, 18] деформації корневих волосків рослин ініціюються позаклітинними поліцукридними комплексами бактерій. Авторами показано штамову селективність азоспірил за здатністю індукувати морфологічні зміни корневих волосків паростків пшениці. Ефект деформації корневих волосків демонструє реакцію рослин у відповідь на присутність активних діазотрофів або їх метаболітів. Цей показник використовується при попередньому скринінгу бактерій, що утворюють ефективні асоціації і симбіози з рослинами.

Мета нашої роботи – виділити з кореневої зони ярої пшениці азотфіксуючі бактерії, що здатні утворювати ефективні асоціації з рослинами пшениці.

Матеріали й методи. Виділення азотофіксуючих бактерій проводили з використанням методик, що описані в оригінальних роботах. Флуоресцентні псевдомонади виявляли на середовищі

Гізука-Комогата з гліцерином (0,1 %), лактатом аммонію (0,025 %) та глутаматом натрію (0,05 %) [19], азотобактер – на напіврідкому середовищі Ешбі, бактерії роду *Azospirillum* – на середовищі Доберейнер модифікованого складу [20] та на агаризованому середовищі з конго червоним [21]. Виділення діазотрофів, вивчення їх морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей проводили загальноприйнятими у ґрунтовій мікробіології методами [22, 23].

Нітрогеназну активність бактерій у чистій культурі (на напіврідких середовищах) визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі Chrom-4 з полум'яно-іонізаційним детектором на колонці з β - β' -оксидіпропіонітрилом [24].

У лабораторних дослідах вивчали вплив діазотрофів на схожість насіння і масу паростків пшениці [25].

Початкові етапи взаємодії штамів азоспірил з рослинами пшениці вивчали в умовах лабораторних дослідів. Поверхнево стерилізоване насіння інокулювали суспензією бактерій з титром 200 тис. клітин на одну насінину. Через 18-24 годин після інокуляції коріння паростків довжиною 1 см мікроскопіювали і підраховували кількість морфологічно змінених кореневих волосків [17].

Математичну обробку одержаних даних проводили за В.А. Доспеховим [26].

Результати та їх обговорення. З кореневої зони ярої пшениці було виділено 79 чистих культур азотфіксувальних бактерій. Їх здатність засвоювати молекулярний азот у чистій культурі коливалась від 0,06 до 9,07 мкг азоту на 1 мл живильного середовища за добу. 24 ізоляти бактерій, які характеризувалися високим рівнем нітрогеназної активності, були ідентифіковані до роду. Всі виділені бактерії являли собою рухомі палички. Переважали неспороутворюючі ізоляти. Високу нітрогеназну активність проявили 7 штамів бактерій, що характеризувались утворенням великих опуклих слизистих світло-коричневих та темно-коричневих колоній зі складчастою поверхнею на середовищі Ешбі та середовищі Федорова. Для цих ізолятів характерним було утворення цист при старінні культури. За культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями дані штами були віднесені до роду *Azotobacter*.

В окрему групу були виділені ізоляти, які утворювали на картопляному агарі світло- та темно-рожеві колонії з специфічним металевим блиском, червоні блискучі колонії на середовищі Касераса

та характеризувалися ростом у вигляді плівки на напіврідкому середовищі Доберейнер з підлужуванням. Дані бактерії, вирощені на рідких або напіврідких середовищах, здійснювали гвинтоподібний рух, характерний для представників роду *Azospirillum*.

Рухомі грамнегативні бактерії, що утворювали на селективному середовищі з гліцерином та глутаматом флуоресцентний пігмент, були віднесені до роду *Pseudomonas*.

Азотфіксувальні бактерії виявлено серед ізолятів – представників родів *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* (табл. 1). Найефективніше фіксували азот у чистій культурі бактерії з родів *Azospirillum* та *Azotobacter*. Найвищою нітрогеназною активністю серед досліджуваних ізолятів (9,07 мкг азоту/мл середовища за добу) характеризувався штам *Azospirillum sp. 77*, виділений з ризоплани пшениці сорту Варяг.

Досліджували вплив інокуляції даними бактеріями насіння пшениці на показники його схожості та сухої маси паростків (табл. 2). У досліді використовували насіння ярої пшениці сорту Варяг. Інокуляція пшениці *Azospirillum sp. 77* сприяла підвищенню схожості насіння на 22,3 %, сухої маси паростків пшениці – на 18,2 % у порівнянні з контролем, що свідчить про здатність даних бактерій продукувати біологічно активні речовини.

Таблиця 2. Вплив інокуляції пшениці сорту Варяг бактеріями *Azospirillum sp. 77* на схожість насіння та масу сухих паростків

Варіанти дослідів	Схожість насіння, %	Маса сухих паростків, мг
Контроль	56,0	31,68
Інокуляція <i>Azospirillum sp. 77</i>	68,5	37,43
НІР ₀₅	9,52	5,06

Досліджували здатність *Azospirillum sp. 77* викликати деформації кореневих волосків пшениці сорту Варяг. Показано, що в результаті інокуляції утворюються потовщення на кінці кореневих волосків (рис. 1) та біля їх основи (рис. 2). Спостерігали також зигзагоподібні (рис. 3) та гачкоподібні (рис. 4) кореневі волоски на коренях пшениці у результаті інокуляції *Azospirillum sp. 77*.

Таблиця 1. Нітрогеназна активність чистих культур діазотрофів, виділених з корневої зони ярої пшениці

Штами	Джерело виділення	Живильне напіврідке середовище	Нітрогеназна активність, мкг азоту/мл середовища за добу
1	2	3	4
<i>Azotobacter sp. P1</i>	ризоплана пшениці сорту Варяг	Ешбі	8,06
<i>Azotobacter sp. F2</i>	ризосфера пшениці сорту Рання 93		4,65
<i>Azotobacter sp. P6</i>	ризоплана пшениці сорту Етюд		5,71
<i>Azotobacter sp. F8</i>	ризосфера пшениці сорту Мелянопус 69		3,92
<i>Azotobacter sp. P10</i>	ризоплана пшениці сорту Харківська 39		4,70
<i>Azotobacter sp. F10</i>	ризосфера пшениці сорту Харківська 39		4,98
<i>Azotobacter sp. F13</i>	ризосфера пшениці сорту Спадщина		5,71
<i>Azospirillum sp. 77</i>	ризоплана пшениці сорту Варяг	Доберейнер	9,07
<i>Azospirillum sp. F1</i>	ризосфера а пшениці сорту Варяг		7,00
<i>Azospirillum sp. P2</i>	ризоплана пшениці сорту Рання 93		6,10
<i>Azospirillum sp. P3</i>	ризоплана пшениці сорту Скороспілка 99		6,72
<i>Azospirillum sp. P4</i>	ризоплана пшениці сорту Героїня		3,42
<i>Azospirillum sp. F5</i>	ризосфера пшениці сорту Харківська 26		3,92
<i>Azospirillum sp. P6</i>	ризоплана пшениці сорту Етюд		6,27

Продовження таблиці 1

1	2	3	4
<i>Azospirillum sp. P7</i>	ризоплана пшениці сорту Sunnan	Доберейнер	4,42
<i>Azospirillum sp. P9</i>	ризоплана пшениці сорту Харківська 27		5,77
<i>Azospirillum sp. F9</i>	ризосфера пшениці сорту Харківська 27		4,20
<i>Azospirillum sp. P10</i>	ризоплана пшениці сорту Харківська 39		7,78
<i>Azospirillum sp. P11</i>	ризоплана пшениці сорту Харківська 41		7,00
<i>Azospirillum sp. P12</i>	ризосфера пшениці сорту Чадо		6,61
<i>Azospirillum sp. P13</i>	ризоплана пшениці сорту Спадщина		3,75
<i>Azospirillum sp. F13</i>	ризосфера пшениці сорту Спадщина		5,21
<i>Pseudomonas sp. P2</i>	ризоплана пшениці сорту Рання 93	Ізука- Комогата	0,45
<i>Pseudomonas sp. F12</i>	ризосфера пшениці сорту Чадо		0,67
НСП ₀₅	—		4,01

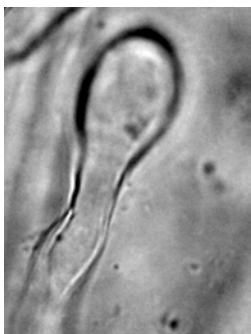


Рис. 1. Потовщення на кінці
корневих волосків пшениці

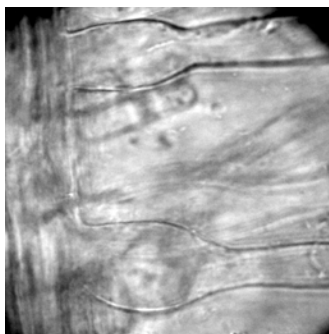


Рис. 2. Потовщення біля основи
корневих волосків пшениці



Рис. 3. Зигзагоподібні деформації
корневих волосків пшениці



Рис. 4. Гачкоподібні деформації
корневих волосків пшениці

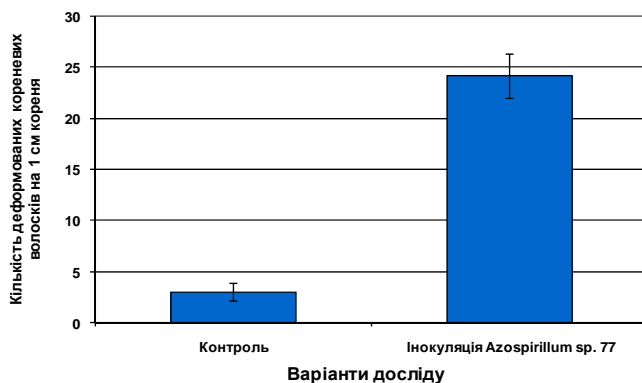


Рис. 5. Вплив інокуляції *Azospirillum* sp. 77 на кількість деформованих корневих волосків пшениці

Інокуляція насіння пшениці бактеріями *Azospirillum sp. 77* сприяла зростанню кількості морфологічно змінених корневих волосків в порівнянні з контролем у 8 разів (рис. 5), що свідчить про здатність досліджуваного штаму азоспірил викликати реакцію пшениці на інокуляцію.

Таким чином, з кореневої зони ярої пшениці виділено 15 ізолятів бактерій, що були віднесені до роду *Azospirillum*. Найвищою нітрогеназною активністю в чистій культурі (9,07 мкг азоту/мл середовища за добу) характеризувався штам *Azospirillum sp. 77*, ізольований з ризоплани пшениці сорту Варяг. Інокуляція даними бактеріями насіння пшениці сприяла підвищенню його схожості на 22,3 % та маси сухих паростків – на 18,2 % у порівнянні з контролем, що свідчить про здатність *Azospirillum sp. 77* виділяти біологічно активні речовини. Досліджуваний штам викликає деформації корневих волосків пшениці, що підтверджує властивість *Azospirillum sp. 77* викликати реакцію рослин пшениці сорту Варяг на інокуляцію. Встановлено, що досліджуваний штам здатний утворювати ефективні асоціації з рослинами пшениці.

1. Glick B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria //Can. J. Microbiol. – 1995. – Vol. 41, № 2. – P. 109–117.

2. Звягинцев Д.Г. Проблема управління азотфіксаторами в ризосфері і ризоплані //Бюл. ВНИИСХМ. – 1985. – № 42. – С. 6–9.

3. Шерстобоева Е.В., Шерстобоев Н.К., Патыка В.Ф. Азот-фіксуючі анаеробні бактерії роду *Clostridium* із ризосфери риса, вирощуваного в севообороті і бессменно //С.-х. біологія. – 1986. – № 8. – С. 51–56.

4. Puppel S. Vorkommen diazotropher Bakterien in der Endorhizosphäre und Rhizoplane von Winterweizen auf Sandstandort mit demäßigtem Klima // Zbl. Microbiol. – 1988. – Vol. 143, № 8. – P. 621–629.

5. Бажанов Д.П., Бажанова А.А., Рудова Е.В. и др. Азотфіксуючі ризобактерії роду *Pseudomonas*: ізолювання, характеристика, генетическіє і екологіческіє дослідження //9-й Баховський коллоквиум (Москва, 1995): Тез. докл. – Пушино, 1995. – С. 57.

6. Біологічний азот /В.П. Патики, С.Я. Коць, В.В. Волкогон та ін. – К.: Світ, 2003. – 424 с.

7. Idris M., Memon G.H., Vinter F.P. Occurrence of *Azospirillum* and *Azotobacter* and nitrogenase activity in Danish agricultural soils under conditions of barley cultivation //Acta Agr. Scand. – 1981. – Vol. 31, № 4. – P. 433–437.

8. Tonkikk A.H., Abdirova A.C., Likianova S.V., Hagelgans A.I.

Vitamin B12 produced by procarיות is a prospective regulator of plants // Modern Problems of Microbial Biochemistry and Biotechnology: Int. Symp. (25-30 June 2000): Programme and Abstracts. – Pushchino, 2000. – P. 129.

9. **Okon Y.** *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture // Trends Biotechnol. – 1985. – № 3. – P. 223–228.

10. **Skipper H.D., Palmer J.H., Giddens J.E. et al.** Evaluation of commercial inoculants from South Carolina and Georgia // Agr. J. – 1980. – Vol. 72, № 4. – P. 673–674.

11. **Halverson L.J., Stacey G.** Signal exchange in plant-microbe interactions // Microbiol. Rev. – 1986. – Vol. 50, № 2. – P. 193–225.

12. **Федоненко Ю.П., Егоренкова И.В., Коннова С.А., Игнатов В.В.** Участие липополисахаридов азоспирилл во взаимодействии с поверхностью корней пшеницы // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 3. – С. 384–390.

13. **Okon Y., Kapulnik Y.** Development and function of *Azospirillum* inoculated roots // Plant Soil. – 1986. – Vol. 90. – P. 3–16.

14. **Kapulnik Y., Gafni R., Okon Y.** Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃ uptake in wheat (*Triticum aestivum* L. W. Miriam) in hydroponic systems // Can. J. Bot. – 1985. – Vol. 63, № 3. – P. 627–631.

15. **Zamudio M., Bastarrachea F.** Adhesiveness and root hair deformation capacity of *Azospirillum* strains for wheat seedlings // Soil Biol. Biochem. – 1994. – Vol. 26, № 6. – P. 791–797.

16. **Jain D.K., Patriquin D.G.** Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs // Can. J. Microbiol. – 1985. – Vol. 31, № 3. – P. 206–210.

17. **Коннова С.А.** Полисахаридсодержащие биополимеры бактерий рода *Azospirillum*: разнообразие химического строения и функций: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 09.00.08 / Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. – М., 2003. – 43 с.

18. **Егоренкова И.В., Коннова С.А., Скворцов И.М., Игнатов В.В.** Исследование начальных этапов взаимодействия бактерий *Azospirillum brasilense* с корнями проростков пшеницы: адсорбции, деформации корневых волосков // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 1. – С. 120–126.

19. **Iizuka H., Komogata K.** An attempt at grouping of genus *Pseudomonas* // J. Gen. Microbiol. – 1963. – Vol. 9, № 1. – P. 73–83.

20. **Калининская Т.А., Редькина Т.В., Белов Ю.М. и др.** Применение ацетиленового метода для качественного учёта разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений // Микробиология. – 1981. – Т. 50, № 5. – С. 924–927.

21. **Caceras S.A.R.** Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. // Appl. Environ. Microbiol. – 1982. – Vol. 44, № 4. – P. 990–991.

22. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе /Методические рекомендации. – Л., 1991. – 60 с.

23. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: МГУ, 1980. – 224 с.

24. Шмаров М.М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях //Почвоведение. – 1976. – № 11. – С. 119–123.

25. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. – К.: Наукова думка, 1973. – 398 с.

26. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 352 с.

СКРИНИНГ ДИАЗОТРОФОВ, СПОСОБНЫХ ОБРАЗОВЫВАТЬ ЭФФЕКТИВНЫЕ АССОЦИАЦИИ С РАСТЕНИЯМИ ПШЕНИЦЫ

Гончар Ю.А.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

*Проведен скрининг diaзотрофов, выделенных из ризосферы и ризопланы растений пшеницы 13 сортов. Показано, что наибольшей нитрогеназной активностью характеризовался штамм *Azospirillum sp. 77*, выделенный из ризопланы яровой пшеницы сорта Варяг. Инокуляция указанным штаммом семян пшеницы способствовала увеличению всхожести на 22,3 % и сухой массы проростков на 18,2 %. в сравнении с контролем, что свидетельствует о способности *Azospirillum sp. 77* выделять биологически активные вещества. Исследуемый штамм индуцирует деформации корневых волосков, что подтверждает способность *Azospirillum sp. 77* вызывать реакцию растений пшеницы сорта Варяг на инокуляцию. По данным предварительного скрининга отобран штамм, способный образовывать эффективные ассоциации с растениями пшеницы.*

Ключевые слова: diaзотрофы, растения пшеницы, нитрогеназная активность, всхожесть семян.

SCREENING OF DIASOTROPHS, CAPABLE TO FORM EFFECTIVE ASSOCIATIONS WITH WHEAT PLANTS

Gonchar Yu.A.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

*It is carried out a screening of diazotrophs, allocated from rhizosphere and rhizoplane of wheat plants of 13 sorts. It is shown, that strain *Azospirillum* sp. 77, allocated from rhizoplane of a spring wheat of sort Varyag, was characterized by the greatest nitrogenase activity. Inoculation of wheat seeds by specified strain promoted the increase of its germination on 22,3 % and dry weight of sprouts increase on 18,2 % in comparison with the control, that testifies the ability of *Azospirillum* sp. 77 to produce biologically active substances. The researched strain causes deformations of root fuzz that confirms the ability of *Azospirillum* sp. 77 to cause reaction on inoculation of wheat plants sorts Varyag. According to preliminary screening it is selected the strain, which capable to form effective associations with wheat plants.*

Key words: diazotrophs, wheat plants, nitrogenase activity, germination of seeds.