

СТВОРЕННЯ ЕФЕКТИВНИХ АСОЦІАЦІЙ “ПШЕНИЦЯ ЯРА-ДІАЗОТРОФИ РОДУ AZOSPIRILLUM”

**¹Воробей Ю.О., ¹Надкернична О.В., ¹Шаховніна О.О.,
¹Ушакова М.А., ²Леонов О.Ю.**

¹Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Україна, 14027

²Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН,
Московський проспект, 142, м. Харків, Україна, 61060
E-mail: isgm@ukrpost.ua

Для створення ефективної асоціації “пшениця-діазотрофи роду Azospirillum” відібрано сорт ярої м'якої пшениці Варяг, що характеризується високим потенціалом нітрогеназної активності в кореневій зоні та значним вмістом хлорофілу в листі, і активний штам азотфіксувальних бактерій Azospirillum sp. 77, виділений з ризоплани ярої пшениці зазначеного сорту. Обробка насіння пшениці сорту Варяг бактеріальною суспензією Azospirillum sp. 77 сприяє достовірному підвищенню нітрогеназної активності в ризоплані рослин (на 46 %), вмісту хлорофілу в листі (на 18 %) та змін структурних показників урожаю даної культури (маса зерна з 1 колосу і маса 1000 зерен підвищились у результаті інокуляції на 16,5 і 16 % відповідно).

Ключові слова: пшениця яра, діазотрофи роду Azospirillum, нітрогеназна активність, деформації кореневих волосків, хлорофіл, структурні показники урожаю.

Активність азотфіксації в кореневій зоні сільськогосподарських культур залежить від комплексу факторів, у якому велику роль відіграють генотипні властивості рослин [1]. Ці властивості визначені як піс-ознака [2], яка має полігенну структуру і характеризується багатоступінчастим процесом формування і функціонування асоціації рослина-діазотроф [3]. Селекція за піс-ознакою, як правило, не проводиться, а відбір сортів, здатних відзиватися на азотні добрива, може призвести до послаблення зазначеної ознаки у сучасних інтенсивних сортів [2]. Тому актуальним є виявлення сортів з підвищеним потенціалом азотфіксації з метою створення ефективної асоціації “рослина-діазотроф”.

Створення такої асоціації передбачає також скринінг

асоціативних мікроорганізмів, що мають комплекс корисних властивостей та сприяють підвищенню врожайності сільськогосподарських культур [4]. Скринінг діазотрофів, що утворюють стійкі ефективні асоціації з рослинами, включає вивчення нітрогеназної активності бактерій у чистій культурі, біотести на здатність продукувати біологічно активні речовини, а також дослідження властивості бактерій приживатися в кореневій зоні рослин та аналіз впливу інокуляції діазотрофами на показники урожайності рослин.

Слід зазначити, що в умовах Полісся потенціал перспективних сортів ярої твердої пшениці не завжди проявляється повною мірою. Це зумовлено певними її особливостями як окремого біологічного виду. Зокрема, тверда пшениця менш пристосована до несприятливих умов вирощування, ніж м'яка, більш вимоглива до температурного режиму, вологості та родючості ґрунту. Крім того, через слабкий розвиток кореневої системи і низьку водоутримуючу здатність листя у перший період розвитку тверда пшениця поступається м'якій за енергією кущіння та конкурентоздатністю з бур'янами [5]. Тому у дослідженнях було використано сорти саме м'якої ярої пшениці.

Мета нашої роботи – виявити сорти пшениці ярої, що характеризуються високим азотфіксувальним потенціалом, виділити з кореневої зони зазначених рослин активні штами азотфіксувальних мікроорганізмів та створити ефективну асоціацію “яра м'яка пшениця-діазотрофи роду *Azospirillum*”.

Матеріали і методи. Досліджували нітрогеназну активність у кореневій зоні рослин ярої м'якої пшениці сортів Харківська 26, Етюд, Героїня (Харківська 34), Sunnap, Рання 93, Варяг, Скороспілка 99, що були отримані з колекції Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Визначення потенційної азотфіксувальної активності (ПНА) на корінні рослин проводили в умовах польового дрібноділянкового досліді Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН на дерново-середньоопідзоленому пилувато-супіщаному ґрунті, який характеризується наступними агрохімічними показниками: вміст гумусу – 1,2 %; азоту, що легко гідролізується (за Тюріним і Кононовою) – 57,0-58,0 мг на 1 кг ґрунту; рухомих форм фосфору (за Кірсановим) – 160,0-165,0 мг P_2O_5 ; обмінного калію (за Кірсановим) – 110,0-112,0 мг K_2O на 1 кг ґрунту; $pH_{\text{водне}}$ – 6,0.

Площа ділянки – 1 м², повторність чотириразова.

Нітрогеназну активність бактерій у чистій культурі визначали ацетиленовим методом [6].

Потенційну азотфіксувальну активність ризосферного ґрунту та відмитих коренів рослин (ризоплани) визначали ацетиленовим методом [6] на газовому хроматографі “Chrom-4” з полум’яноіонізаційним детектором. Колонка довжиною 370 см була заповнена хромосорбом з β - β '-оксидіпропіонітрилом. Температура термостату – 50 °С, газ-носій – азот, витрата газів (в мл/хв): водню – 30, азоту – 100, повітря – 500.

Для визначення потенційної нітрогеназної активності ризосферний ґрунт і корені рослин поміщали у флакони об’ємом 40 см³, додавали 10 мл напіврідкого середовища Доберейнер. Флакони герметизували, вводили ацетилен (10 % від об’єму газової фази у флаконі) та інкубували протягом доби за температури 26-28 °С. Після закінчення строку інкубації зразки аналізували на газовому хроматографі.

Вміст хлорофілу визначали в листі пшениці у фазу цвітіння спектрофотометричним методом [7]. У лабораторних дослідах вивчали вплив діазотрофів на схожість насіння та масу проростків пшениці [7].

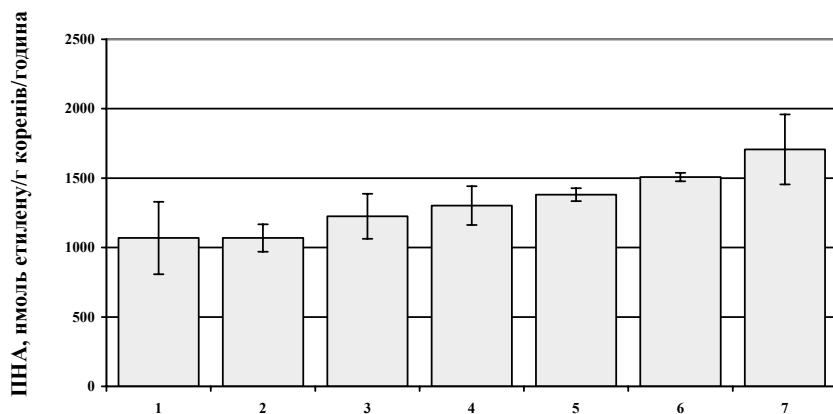
Початкові етапи взаємодії штамів азоспірил з рослинами пшениці вивчали в умовах лабораторних дослідів. Поверхнево стерилізоване насіння інокулювали суспензією бактерій з титром 200 тис. клітин на одну насінину. Через 18-24 години після інокуляції коріння проростків довжиною 1 см мікроскопіювали і підраховували кількість морфологічно змінених кореневих волосків [8].

З метою дослідження впливу інокуляції азоспірилами пшениці ярої сорту Варяг на структурні показники урожаю даної культури відбирали по 50 типових рослин з варіанту. Визначали довжину колоса, кількість зерен в колосі, масу зерен з одного колосу і масу 1000 зерен.

Математичну обробку одержаних даних проводили за Б.А. Доспеховим [9].

Результати та їх обговорення. Одержані протягом 2006-2007 рр. результати досліджень свідчать, що потенційна нітрогеназна активність у ризоплані різних сортів ярої м’якої пшениці змінюється у діапазоні 1069-1707 нмоль етилену/г коренів/годину

(рис. 1) і у 3-5 разів перевищує активність ризосферного ґрунту. Тому надалі визначальною вважали азотфіксувальну активність на відмитих коренях рослин.



1 – Харківська 26, 2 – Скороспілка 99, 3 – Рання 93,
4 – Героїня (Харківська 34), 5 – Варяг, 6 – Етюд, 7 – Sunnap.

Рис. 1. Потенційна нітрогеназна активність у кореневій зоні м'якої пшениці різних сортів (фаза колосіння-початок цвітіння, 2007 р.)

Результати дослідження потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях ярої м'якої пшениці протягом трьох років засвідчили, що найнижчим потенціалом азотфіксації (504 нмоль C_2H_4 /г коренів/годину) характеризується сорт Харківська 26, найвищу нітрогеназну активність (969-1014 нмоль C_2H_4 /г коренів/годину) спостерігали в кореневій зоні рослин пшениці сортів Етюд і Варяг (табл. 1).

Аналіз трирічних даних (табл. 1, 2) показав, що між нітрогеназною активністю і вмістом хлорофілу в листі сортів м'якої пшениці, контрастних за ПНА, існують кореляційні зв'язки. Сорти м'якої пшениці з високим потенціалом нітрогеназної активності Етюд і Варяг характеризувалися більшим на 24–32 % вмістом хлорофілу в листі у порівнянні з показником сорту Харківська 26 з низьким значенням ПНА.

Для створення ефективної асоціації “пшениця-діазотрофи роду *Azospirillum*” нами відібрано сорт ярої м'якої пшениці Варяг, що характеризувався найвищим потенціалом нітрогеназної активності та значним вмістом хлорофілу в листі, що корелював зі

значенням ПНА.

Таблиця 1. ПНА в кореневій зоні різних сортів м'якої пшениці (середні значення за три вегетаційні періоди 2006-2008 рр.)

Сорт ярої м'якої пшениці	ПНА, нмоль C_2H_4 /г коренів за годину
Харківська 26	504,41
Героїня (Харківська 34)	774,64
Рання 93	806,46
Sunnap	834,69
Скороспілка 99	839,94
Етюд	969,38
Варяг	1014,13

Таблиця 2. Вміст хлорофілів а і b в листі ярої пшениці сортів, контрастних за ПНА, в їх кореневій зоні (середні значення за 2006-2008 рр.)

Сорт пшениці	Хлорофіл а, мг/100 г сирової речовини	Хлорофіл b, мг/100 г сирової речовини	Сума хлорофілів а+b, мг/100 г сирової речовини
Харківська 26	217,81	55,14	272,95
Варяг	255,95	75,83	331,78
Етюд	282,60	78,26	360,86

Наступним етапом нашої роботи було проведення скринінгу діазотрофів роду *Azospirillum*. З кореневої зони ярої пшениці виділено та ідентифіковано до роду 54 чисті культури азотфіксувальних бактерій [10]. Високу нітрогеназну активність у чистій культурі мали ізоляти *Azospirillum sp.*, виділені з кореневої зони ярої м'якої пшениці сортів Рання 93, Скороспілка 99, Етюд і Варяг. Штам *Azospirillum sp.* 77, виділений з ризоплани пшениці сорту Варяг, характеризувався найвищою нітрогеназною активністю серед досліджуваних ізолятів (табл. 3).

Вивчали вплив інокуляції насіння пшениці даними бактеріями на показники його схожості та сухої маси проростків (табл. 4). У досліді використовували насіння ярої пшениці сорту Варяг. Інокуляція пшениці *Azospirillum sp.* 77 сприяла підвищенню схожості насіння на 22,3 %, сухої маси проростків пшениці – на 18,2 % у порівнянні з контролем, що свідчить про здатність

зазначеного діазотрофа продукувати біологічно активні речовини.

Таблиця 3. Нітрогеназна активність чистих культур бактерій роду *Azospirillum*, виділених з кореневої зони ярої пшениці

Штами бактерій	Джерело виділення	Нітрогеназна активність, мкг азоту/мл середовища за добу
<i>Azospirillum sp.</i> 77	ризоплана пшениці сорту Варяг	9,07
<i>Azospirillum sp.</i> F1	ризосфера пшениці сорту Варяг	7,00
<i>Azospirillum sp.</i> P2	ризоплана пшениці сорту Рання 93	6,10
<i>Azospirillum sp.</i> P3	ризоплана пшениці сорту Скороспілка 99	6,72
<i>Azospirillum sp.</i> P4	ризоплана пшениці сорту Героїня	3,42
<i>Azospirillum sp.</i> F5	ризосфера пшениці сорту Харківська 26	3,92
<i>Azospirillum sp.</i> P6	ризоплана пшениці сорту Етюд	6,27
<i>Azospirillum sp.</i> P7	ризоплана пшениці сорту Sunnan	4,42
НІР ₀₅	—	4,01

Таблиця 4. Вплив інокуляції пшениці сорту Варяг бактеріями *Azospirillum sp.* 77 на схожість насіння та масу сухих проростків

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

Досліджували здатність *Azospirillum sp.* 77 викликати деформації корневих волосків пшениці сорту Варяг. У результаті інокуляції утворюються потовщення на кінці корневих волосків та біля їх основи, зигзагоподібні та гачкоподібні деформації волосків на коренях інокульованих проростків пшениці. Інокуляція насіння пшениці бактеріями *Azospirillum sp.* 77 сприяла достовірному підвищенню кількості морфологічно змінених корневих волосків у порівнянні з контролем у 8 разів (рис. 2), що свідчить про здатність

досліджуваного штаму азоспірил викликати реакцію пшениці на інокуляцію.

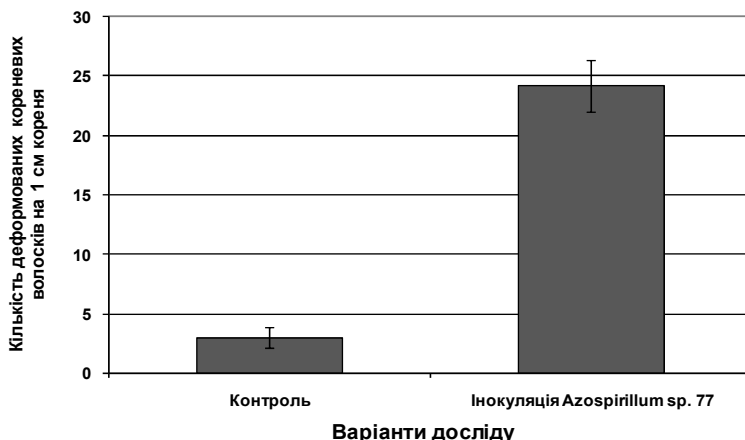


Рис. 2. Вплив інокуляції *Azospirillum sp. 77* на кількість деформованих кореневих волосків пшениці

В умовах польового дрібноділянкового досліджу вивчено вплив інокуляції насіння пшениці сорту Варяг суспензією *Azospirillum sp. 77* на нітрогеназну активність у кореневій зоні (табл. 5), вміст хлорофілу в листі (табл. 6) та структурні показники врожаю (табл. 7).

Таблиця 5. Вплив інокуляції *Azospirillum sp. 77* пшениці сорту Варяг на нітрогеназну активність у ризоплані даної культури (польовий дослід, фаза цвітіння, 2008 р.)

Варіанти досліджу	ПНА, нмоль C_2H_4 /г коренів за годину
Контроль (без інокуляції)	794,41
Інокуляція <i>Azospirillum sp. 77</i>	1156,10
НІР ₀₅	351,99

Слід зазначити, що всі досліджувані показники достовірно підвищувалися в результаті інокуляції насіння пшениці бактеріальною суспензією *Azospirillum sp. 77*. Так, потенційна нітрогеназна активність у кореневій зоні пшениці сорту Варяг у варіанті з інокуляцією перевищувала ПНА у контролі на 46 % (табл. 5). За сумарним вмістом хлорофілів в листі ярої пшениці сорту Варяг приріст від інокуляції *Azospirillum sp. 77* становив

18 % (табл. 6).

Таблиця 6. Вплив інокуляції *Azospirillum sp. 77* на вміст хлорофілу в листі пшениці сорту Варяг (польовий дослід, фаза цвітіння, 2008 р.)

Варіанти дослідів	Хлорофіл <i>a</i> , мг/100г сирової речовини	Хлорофіл <i>b</i> , мг/100г сирової речовини	Сума хлорофілів <i>a+b</i> , мг/100г сирової речовини
Контроль (без інокуляції)	218,13	53,95	272,08
Інокуляція <i>Azospirillum sp. 77</i>	269,07	51,54	320,61
НІР ₀₅	24,10	4,46	–

Інокуляція азоспірами позитивно вплинула і на структурні показники урожаю (табл. 7). Ми не спостерігали значного позитивного впливу обробки насіння пшениці *Azospirillum sp. 77* на показники довжини колосу та кількості зерна в одному колосі. Однак, маса зерна з одного колосу і маса 1000 зерен підвищилась у результаті інокуляції на 16,5 і 16 % відповідно.

Таблиця 7. Вплив інокуляції *Azospirillum sp. 77* на структурні показники урожаю пшениці сорту Варяг (польовий дослід, 2008)

Варіанти дослідів	Довжина колосу, см	Кількість зерен в колосі, од.	Маса зерен з одного колоса, г	Маса 1000 зерен, г
Контроль (без інокуляції)	14,00	25,05	1,09	4,77
Інокуляція <i>Azospirillum sp. 77</i>	14,91	27,32	1,27	5,54
НІР ₀₅	0,54	1,71	0,10	0,11

Таким чином, для створення ефективної асоціації “пшениця-діазотрофи роду *Azospirillum*” відібрано сорт ярої м’якої пшениці Варяг, що характеризувався найвищим потенціалом нітрогеназної активності та значним вмістом хлорофілу в листі. За результатами скринінгу діазотрофів, виділених з кореневої зони рослин пшениці, показано, що найвищою нітрогеназною активністю характеризувався штам *Azospirillum sp. 77*, виділений з ризоплани ярої пшениці сорту Варяг. Інокуляція зазначеним штамом насіння пшениці сприя-

ла підвищенню його схожості на 22,3 % та сухої маси проростків – на 18,2 % у порівнянні з контролем, що свідчить про здатність *Azospirillum sp. 77* продукувати біологічно активні речовини. Встановлено, що досліджуваний штам викликає деформації корневих волосків, це підтверджує здатність *Azospirillum sp. 77* викликати реакцію рослин пшениці сорту Варяг на інокуляцію. Обробка насіння пшениці сорту Варяг бактеріальною суспензією *Azospirillum sp. 77* сприяє достовірному підвищенню нітрогеназної активності в ризоплані рослин (на 46 %), вмісту хлорофілу в листі (на 18 %) та зміні структурних показників урожаю культури (маса зерна з 1 колосу і маса 1000 зерен підвищились у результаті інокуляції на 16,5 і 16 % відповідно).

1. Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай /А.А. Завалин. – М.: Изд.ВНИИА, 2005. – 302 с.

2. Rennie R.J. Potential use of induced mutation to improve symbioses of crop plants with N₂-fixing bacteria /R.J. Rennie //Induced mutation – a tool in plant breeding /Vienna: IAEA, 1981. – P. 293-321.

3. Емцев В.Т. Об эффективности азотфиксирующего симбиоза у небобовых растений /В.Т. Емцев, М.И Чумаков //Почвоведение. – 1990. – № 11. – С. 116-126.

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

5. Гамзиков Г.П. Возделывание яровой твердой пшеницы в Алтайском крае: Рекомендации /Г.П. Гамзиков, В.В. Яковлев, В.И. Усенко. – Барнаул: Изд. АГУ, 1999. – 36 с.

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

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

8. Коннова С.А. Полисахаридсодержащие биополимеры бактерий рода *Azospirillum*: разнообразие химического строения и функций: автореф. дис. ...д-ра биол. наук: спец. 03.00.04 /С.А. Коннова; Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. – М., 2003. – 43 с.

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

10. Гончар Ю.О. Скринінг діазотрофів, що здатні утворювати ефективні асоціації з рослинами пшениці /Ю.О. Гончар //С.-г. мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2007. – Вип. 6 – С. 92-102.

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ АССОЦИАЦИЙ “ПШЕНИЦА ЯРОВАЯ-ДИАЗОТРОФЫ РОДА *AZOSPIRILLUM*”

¹Воробей Ю.А., ¹Надкерничная Е.В., ¹Шаховнина Е.А.,
¹Ушакова М.А., ²Леонов О.Ю.

¹Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

²Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН, г. Харьков

*Для создания эффективной ассоциации “пшеница-дiazотрофы рода *Azospirillum*” отобран сорт яровой мягкой пшеницы Варяг, который характеризуется высоким потенциалом нитрогеназной активности и значительным содержанием хлорофилла в листьях, и активный штамм азотфиксирующих бактерий *Azospirillum* sp. 77, выделенный из ризопланы яровой пшеницы данного сорта. Обработка семян пшеницы сорта Варяг бактериальной суспензией *Azospirillum* sp. 77 способствует достоверному повышению нитрогеназной активности в ризоплане растений (на 46 %), содержания хлорофилла в листьях (на 18 %) и изменению структурных показателей урожая данной культуры (масса зерна с 1 колоса и масса 1000 зерен увеличились в результате инокуляции на 16,5 и 16 %, соответственно).*

*Ключевые слова: пшеница яровая, diaзотрофы рода *Azospirillum*, нитрогеназная активность, деформации корневых волосков, хлорофилл, структурные показатели урожая.*

CREATION OF EFFECTIVE ASSOCIATIONS “SPRING WHEAT-DIASOTROPHS OF GENUS *AZOSPIRILLUM*”

**¹Vorobey Y.O., ¹Nadkernichna O.V., ¹Shahovnina O.A.,
¹Ushakova M.A., ²Leonov O.Y.**

¹Institute of Agricultural Microbiology UAAS, Chernihiv

²Institute of Plant Production named after V.Y.Yuriev

*The spring wheat variety Varyag whith high potential nitrogenase activity and the greater contents of chlorophyll in leaves and the active strain of the bacteria *Azospirillum* sp. 77, selected from the washed roots of the spring wheat variety Varyag, were used for creation of effective association “wheat – diasotrophs of genus *Azospirillum*”. Inoculation of wheat variety Varyag seeds with the bacterial suspension *Azospirillum* sp. 77 promoted the reliable increase of nitrogenase activity on roots of plants (by 46 %), content of chlorophyll in leaves (by 18 %) and structural parameters of wheat crop (weight of grain from 1 ear and weight of 1000 grains were increased as a result of inoculation by 16,5 and 16 % accordingly).*

*Key words: spring wheat, diasotrophs of genus *Azospirillum*, nitrogenase activity, deformations of root fuzz, chlorophyll, structural parameters of a crop.*