УДК 631.461:633.11:57.083.12/.13:581.431

ВПЛИВ БАКТЕРІЙ РОДУ *AZOSPIRILLUM* НА ПОТЕНЦІЙНУ НІТРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ І БІОСИНТЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В РОСЛИНАХ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ТА ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО

[1]Шаховніна О.О., [1]Надкернична О.В., [1]Воробей Ю.О., [2]Кривопиша В.В.

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

[2]Чернігівський державний педагогічний університет
імені Т.Г. Шевченка,
вул. Гетьмана Полуботка, 53, м. Чернігів, 14038
E-mail: helenshah@ukr.net

Застосування активного штаму азотфіксувальних бактерій Azospirillum sp. 77 для інокуляції пшениці ярої і тритикале ярого дозволило сформувати ефективну асоціативну систему «діазотрофи – рослина», що сприяло підвищенню потенційної нітрогеназної активності у кореневій зоні рослин на 38-220 % та активізації біосинтетичних процесів, а саме: активність глутамінсинтетази підвищилася на 57,0-71,9 %, вміст білка – на 9,7-16,3 %, надземна маса рослин збільшилася на 11,9-18,9 %, маса коренів – на 7,2-7,3 %.

Ключові слова: *яра пшениця, яре тритикале, діазотрофи роду Azospirillum, біосинтетичні процеси, глутамінсинтетаза, нітрогеназа, потенційна азотфіксувальна активність.*

Для кореневої зони злакових культур характерне велике різноманіття діазотрофів. Насамперед, це представники родів *Azospirillum, Azotobacter, Agrobacterium, Bacillus, Klebsiella, Enterobacter, Pseudomonas* [1]. Найбільш привабливими інокулянтами зернових культур, на думку багатьох дослідників, є азоспірили, які здатні утворювати тісні і значною мірою стійкі асоціації з рослинами і характеризуються високою азотфіксувальною активністю [2-4]. Для пояснення позитивного ефекту від інокуляції зернових активними штамами азотфіксувальних бактерій роду *Azospirillum* необхідно дослідити, яким чином змінюється нітрогеназна активність інокульованих рослин та перебіг біосинтетичних процесів у рослинному організмі під впливом діазотрофа.

Згідно сучасних уявлень, молекулярний азот атмосфери,

який у процесі функціонування асоціативних систем «діазотрофи – рослина» перетворюється на амоній, асимілюється рослиною у вигляді органічних сполук азоту. Ключовим ферментом азотного обміну, як для бактерій, так і для рослин є глутамінсинтетаза, що каталізує утворення амінокислоти глутаміну з L-глутамату за участю АТФ (так звана прогресивна гілка азотного обміну). Шляхом трансамінування за участю глутамінової кислоти відбувається процес дезамінування більшості амінокислот і значною мірою забезпечується взаємозв'язок між обміном білків, вуглеводів та ліпідів. Амід глутамінової кислоти відіграє важливу роль як транспортна форма азотистих сполук, яка забезпечує їх відтік з одного органу рослини до інших [5].

Вивчення особливостей бактеріальної глутамінсинтетази було розпочато ще у середині 70-х років минулого століття. Особливу увагу привертають роботи, де показана кореляція між активностями ферментів нітрогенази і глутамінсинтетази [6-8]. Так, Я. Окон і його колеги показали, що додавання в середовище незворотних інгібіторів глутамінсинтетази призводить до депресії синтезу нітрогенази за наявності катіонів амонію [7]. Д. Готьє і К. Елмері отримали глутамінзалежні мутанти *Azospirillum brasilense,* в одному з яких активність глутамінсинтетази була абсолютно відсутня, а у чотирьох інших складала 8-50 % активності батьківського штаму *A. brasilense* Sp7 [8]. Дослідниками було показано, що у чотирьох мутантних штамів з низьким рівнем активності глутамінсинтетази активність нітрогенази також є низькою і прямо пропорційна активності глутамінсинтетази, а у штамів, де вона відсутня, активність нітрогенази не була виявлена взагалі. Ревертантам з рівнем активності глутамінсинтетази, близьким до нормального, була властива нормальна нітрогеназна активність. Така жорстка кореляція дала змогу авторам зробити припущення, що у азоспірили глутамінсинтетаза та її структурний ген *glnA* залучені до репресії або депресії нітрогенази [8]. За останні роки дослідниками показано особливості складної системи корегуляції двох найважливіших ферментів азотного обміну – глутамінсинтетази і нітрогенази в клітинах азоспірил, як на рівні біосинтезу, так і на посттрансляційному рівні [9-11].

Отже, мікробна глутамінсинтетаза детально вивчається у багатьох лабораторіях світу, проте вплив бактеризації діазотрофами на активність рослинної глутамінсинтетази залишається мало

дослідженим.

З огляду на вищезазначене, метою нашої роботи було дослідити вплив нового штаму азотфіксувальних бактерій роду *Azospirillum* на нітрогеназну активність у кореневій зоні пшениці ярої та тритикале ярого, активність рослинної глутамінсинтетази, вміст білка та накопичення біомаси рослинами.

Матеріали і методи. Вивчення нітрогеназної активності у кореневій зоні пшениці ярої та тритикале ярого, активності рослинної глутамінсинтетази, вмісту білка та накопичення біомаси рослинами під впливом інокуляції проводили в умовах вегетаційного досліду. Дослід закладали у вегетаційному будиночку. Пластикові посудини ємністю 1 л наповнювали темно-сірим опідзоленим глеюватим ґрунтом, який характеризується наступними агрохімічними показниками: вміст гумусу – 3,56 %; азоту, що легко гідролізується (за Корнфільдом) – 95; рухомих форм фосфору (P_2O_5) (за Кирсановим) – 251; обмінного калію (K_2O) (за Кирсановим) – 108 мг на 1 кг ґрунту; $pH_{сольове}$ – 6,0. Вологість ґрунту підтримували на рівні 60 % від повної вологоємності. Повторність досліду шестиразова.

Вегетаційний дослід проводили за схемою: варіант 1 – яра пшениця (контроль); 2 – яра пшениця, інокульована *Azospirillum sp.* 77; 3 – яре тритикале (контроль); 4 – яре тритикале, інокульоване *Azospirillum sp.* 77.

У досліді використовували пшеницю яру сорту Варяг і тритикале яре сорту Оберіг. Інокуляцію насіння здійснювали трьохдобовою культурою *Azospirillum sp.* 77, яку вирощували на рідкому живильному середовищі з меласою та кукурудзяним екстрактом, із розрахунку 200 тис. бактеріальних клітин на одну насінину. Штам азотфіксувальних бактерій *Azospirillum sp.* 77 був одержаний у 2006 році шляхом аналітичної селекції з ризоплани ярої пшениці сорту Варяг. Тривалість досліду – 50 діб після посіву.

Потенційну азотфіксувальну активність ризосферного ґрунту та відмитих коренів рослин (ризоплани) визначали ацетиленовим методом [12] 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 (у мл/хвилину): водню – 30, азоту – 100, повітря – 500.

Для визначення потенційної нітрогеназної активності (ПНА)

ризосферний ґрунт і корені рослин поміщали у флакони на 40 $см^3$, 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.

Активність глутамінсинтетази у листках рослин оцінювали фосфатним методом [13]. Інкубаційна суміш (кінцевий об'єм 3,4 мл) містила: 100 мМ трис-HCl, pH 7,2; 150 мМ моноглутамату натрію; 7,5 мМ NH_4Cl; 10 мМоль АТР; 10 мМ $MgCl_2$. Реакцію зупиняли внесенням 0,5 мл 20 % трихлороцтової кислоти. В освітленому центрифугуванням розчині визначали вміст фосфору (Р) молібденовим реактивом за утворенням фосфорно-молібденового комплексу [14].

Обрахунки проводили за формулою:

$$A = \frac{P_{стандарт} \cdot (D_{дослідна} - D_{контрольна}) \cdot V \cdot 1000}{D_{стандарта} \cdot m_{білка} \cdot M\,(P)}$$

де А – активність глутамінсинтетази, мкмоль Р/мг білка/година;

$P_{стандарт}$ – вміст фосфору у розчині стандарту, мг/мл;

$D_{дослідна}$ – оптична густина досліджуваних розчинів;

$D_{контрольна}$ – оптична густина розчинів, в яких реакція була зупинена одразу додаванням ТХОК;

$D_{стандарта}$ – оптична густина розчину з відомою концентрацією фосфору;

V – об'єм інкубаційної суміші;

$m_{білка}$ – вміст білка у досліджуваній пробі, мг;

M (P) – молярна маса фосфору, г/моль;

1000 – коефіцієнт для перерахунку мг у мкг;

Вміст білка в листках рослин визначали за Лоурі [15].

Після завершення досліду зрізали надземну частину рослин, відмивали корені і висушували за температури 105 °С. Визначали масу сухих рослин.

Результати та їх обговорення. Вивчення потенційної нітрогеназної активності в кореневій зоні рослин пшениці ярої сорту Варяг і тритикале ярого сорту Оберіг показало, що інокуляція насіння штамом *Azospirillum sp.* 77 сприяє підвищенню питомої азотфіксувальної активності як у ризосфері, так і у ризоплані

культур (табл. 1). Слід зазначити, що питома нітрогеназна активність відмитих коренів рослин перевищує таку у ризосферному ґрунті у 50-180 разів, що свідчить про розвиток найбільш активних азотфіксувальних мікроорганізмів безпосередньо на поверхні коренів рослин. У варіантах з інокуляцією потенційна нітрогеназна активність відмитих коренів пшениці ярої підвищилася на 38 %, тритикале ярого – на 220 %. Одержані дані засвідчують той факт, що дія азоспірил на рослини не є специфічною.

Таблиця 1. ***Вплив Azospirillum sp. 77 на потенційну нітрогеназну активність у кореневій зоні пшениці ярої та тритикале ярого*** *(вегетаційний дослід, 2009)*

Варіанти досліду	ПНА, нмоль етилену/г ґрунту (коренів) /година
Ризосферний ґрунт	
Пшениця яра (контроль)	8,7±2,5
Пшениця яра, інокульована *Azospirillum sp.* 77	43,6±4,4
Тритикале яре (контроль)	16,2±3,6
Тритикале яре, інокульоване *Azospirillum sp.* 77	37,5±1,0
Відмиті корені рослин	
Пшениця яра (контроль)	1590,6±323,6
Пшениця яра, інокульована *Azospirillum sp.* 77	2192,0±144,5
Тритикале яре (контроль)	815,2±90,2
Тритикале яре, інокульоване *Azospirillum sp.* 77	2606,7±37,5

Як видно з даних таблиці 2, інокуляція рослин активним штамом *Azospirillum sp.* 77 приводить до достовірного підвищення глутамінсинтетазної активності тканин пшениці ярої сорту Варяг на 58 %, тритикале ярого сорту Оберіг – на 71 %. Активність зазначеного ферменту, в свою чергу, впливає на синтез білка у листках рослин. Так, за інокуляції азоспірилами вміст білка у листках рослин пшениці ярої та тритикале ярого підвищився відповідно на 9,7 і 16,3 %.

Таким чином, застосування штаму *Azospirillum sp.* 77 дозволило поліпшити азотне живлення рослин, що сприяло збільшенню надземної маси рослин пшениці ярої і тритикале ярого на 18,9 і 11,9 %, маси коренів – на 7,2 % і 7,3 %, відповідно (табл. 3).

Таблиця 2. ***Вплив інокуляції Azospirillum sp. 77 на активність глутамінсинтетази та вміст розчинного білка у листках рослин пшениці ярої та тритикале ярого*** *(вегетаційний дослід, 2009)*

Варіанти досліду	Активність глутамінсинтетази, мкмоль P_i/ мг білка/ год	Вміст розчинного білка, мг/мл
Пшениця яра (контроль)	2,42	45,76
Пшениця яра, інокульована *Azospirillum sp.* 77	3,80	50,18
Тритикале яре (контроль)	3,49	39,11
Тритикале яре, інокульоване *Azospirillum sp.* 77	6,00	45,49
$НІР_{05}$	0,57	0,49

Таблиця 3. ***Вплив інокуляції Azospirillum sp. 77 на накопичення маси рослин пшениці ярої та тритикале ярого*** *(вегетаційний дослід, 2009)*

Варіанти досліду	Маса сухої надземної частини рослин, мг на одну рослину	Маса сухих коренів, мг на одну рослину
Пшениця яра (контроль)	65,8±1,7	37,4±1,1
Пшениця яра, інокульована *Azospirillum sp.* 77	78,3±2,1	40,1±1,8
Тритикале яре (контроль)	57,9±1,0	35,5±0,4
Тритикале яре, інокульоване *Azospirillum sp.* 77	64,8±0,3	38,1±0,9

Отже, застосування нового штаму азотфіксувальних бактерій *Azospirillum sp.* 77 для інокуляції пшениці ярої та тритикале ярого дозволило сформувати ефективну асоціативну систему діазотроф – рослина, що сприяло підвищенню потенційної нітрогеназної активності у кореневій зоні рослин на 38-220 % та активізації біосинтетичних процесів, а саме: активність глутамінсинтетази підвищилася на 57,0-71,9 %, вміст білка – на 9,7-16,3 %, надземна маса рослин збільшилася на 11,9-18,9 %, маса коренів – на 7,2-7,3 %.

1. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика /[В.В. Волкогон, О.В. Надкернична, Т.М. Ковалевська та ін.]. – К.: Аграрна наука, 2006. – 312 с.

2. Мальцева Н.Н. Азотфиксирующие ассоциации азоспирилл и некоторых видов злаковых культур /Н.Н. Мальцева, В.В. Волкогон, Е.В. Надкерничная //Мікробіол. журн. – 1995. – Т. 57, № 1. – С. 24-30.

3. Надкернична О.В. Здатність діазотрофів до формування асоціативних систем з рослинами озимого жита /О.В. Надкернична //Агроекол. журн. – 2003. – № 3. – С. 17-20.

4. Steenhoudt O. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects /O. Steenhoudt, J. Vanderleyden //FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – № 24. – P. 487-506.

5. Полевой В.В. Физиология растений /В.В. Полевой. – М.: Высшая школа, 1989. – 464 с.

6. Gallori E. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* /E. Gallori, M. Bazzicalupo //FEMS Microbiol. Lett. – 1985. – Vol. 28. – P. 35-38.

7. Okon Y. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum* /Y. Okon, S.L. Albrecht, R.H. Burris //J. Bacteriol. – 1976. – Vol. 128. – № 2 – P. 592-597.

8. Gauthier D. Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in *Spirillum lipoferum* /D. Gauthier, C. Elmerich //FEMS Microbiol. Lett. – 1977. – Vol. 2. – P. 101-104.

9. Zhang Y. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* /Y. Zhang, R.H. Burris, P.W. Ludden, G.P. Roberts //FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – Vol. 152. – № 2. – P. 195-204.

10. Смирнова В.Е. Свойства и регуляция глутаминсинтетазы *Azospirillum brasilense* с разными степенями аденилирования: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 – биохмия; 03.00.07 – микробиология /В.Е. Смирнова; Ин-т биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. – Саратов, 2003. – 22 с.

11. Антонюк Л.П. Глутаминсинтетаза ризобактерии *Azospirillum brasilense*: особенности катализа и регуляции /Л.П. Антонюк //Прикл. биохим. и микробиол. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 272-278.

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

13. Евстигнеева З.Г. Определение активности глутаминсинтетазы /З.Г. Евстигнеева, Е.А. Громыко, К.Б. Асеева /Прикл. биохим. и микробиол. – 1972. – Т. 8, № 1. – С. 251-253.

14. Кретович В.Л. Биохимия растений /В.Л. Кретович. – М.:

Высшая школа, 1986. – 503 с.

15. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии /Ю.Б. Филиппович. – М.: Просвещение, 1975. – 318 с.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* НА ПОТЕНЦИАЛЬНУЮ НИТРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПШЕНИЦЫ ЯРОВОЙ И ТРИТИКАЛЕ ЯРОВОГО

[1]Шаховнина Е.А., [1]Надкернична Е.В., [1]Воробей Ю.А., [2]Кривопиша В.В.

[1]Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернігів

[2]Черниговский государственный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко

Применение нового штамма азотфиксирующих бактерий Azospirillum sp. 77 для инокуляции яровых пшеницы и тритикале позволило сформировать эффективную ассоциативную систему диазотроф – растение. Бактеризация способствовала повышению потенциальной нитрогеназной активности в корневой зоне растений на 38-220 % и активизации биосинтетических процессов, а именно: активность глутаминсинтетазы повысилась на 57,0-71,9 %, содержание белка – на 9,7-16,3 %, надземная масса растений увеличилась на 11,9-18,9 %, масса корней – на 7,2-7,3 %.

Ключевые слова: *яровая пшеница, яровое тритикале, диазотрофы рода Azospirillum, биосинтетические процессы, глутаминсинтетаза, нитрогеназа, потенциальная азотфиксирующая активность.*

THE INFLUENCE OF BACTERIA OF GENUS *AZOSPIRILLUM* ON POTENTIAL NITROGENASE ACTIVITY AND BIOSYNTETIC PROCESSES OF SPRING WHEAT AND SPRING TRITICALE

[1]Shahovnina O.O., [1]Nadkernichna O.V., [1]Vorobey Y.O., [2]Krivopisha V.V.

[1]Institute of Agricultural Microbiology UAAS

[2]T.G. Shevchenko state pedagogical university of Chernigov, Chernigiv

Use of new strain of nitrogen fixing bacteria Azospirillum sp. 77 for inoculation of spring wheat and spring triticale permitted to form an effective associative system diasotroph – plant. The bacterization promoted the reliable increase of potential nitrogenase activity in root zone of plant by 38-220 %, activated the biosynthetic processes, in particular, glutamine synthetase activity increased by 57,0-71,9 %, content of protein in leaves – by 9,7-16,3 %, top of the plants – by 11,9-18,9 %, weight of the roots – by 7,2-7,3 %.

Key words: *spring wheat, spring triticale, diasotrophs of genus Azospirillum, biosynthetic processes, glutamine synthetase, nitrogenase, potential nitrogenase activity.*