

В.П. Патика¹, О.В. Надкернична², О.О. Шаховніна²

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, МСП ДО3680 Україна

² Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового
виробництва НААН, вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна

ВПЛИВ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 10/1 НА АСОЦІАТИВНУ АЗОТФІКСАЦІЮ І ВНУТРІШНЬО- СОРТОВИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО

*Показано, що перспективні українські сорти тритикале ярого характеризуються значним поліморфізмом за ознакою азотфіксуючої активності у кореневій зоні рослин. Застосування активного штаму *Azospirillum brasilense* 10/1 сприяє зниженню варіабельності даної ознаки в межах сорту, підвищенню потенційної нітрогеназної активності в середньому у 3,2-4,7 рази, а також нормалізації розподілу у вибірках інокульованих рослин.*

*К л ю ч о в і с л о в а: асоціативна азотфіксація, діазотрофи, *Azospirillum brasilense* 10/1, потенційна нітрогеназна активність, внутрішньосортовий поліморфізм.*

Фіксація молекулярного азоту атмосфери є одним із найбільш важливих біохімічних процесів, який суттєво впливає на родючість ґрунтів і забезпеченість рослин біологічним азотом. Поряд із дослідженням симбіотичної азотфіксації, останні кілька десятиліть у мікробіології бурхливого розвитку набув напрям асоціативної азотфіксації. Досліджуються фізіологічні та біохімічні особливості даного процесу, активно вивчаються мікроорганізми, що здійснюють його в асоціації з рослинами [1,4,11,12]. Показано, що усім небобовим рослинам певною мірою притаманна здатність контролювати формування азотфіксуючої асоціації і підтримувати процес фіксації атмосферного азоту у кореневій зоні, яка позначається терміном “nis-ознака” (nitrogen fixation supportive) [14].

Асоціативна азотфіксація – лабільний процес, на який впливають численні екологічні фактори: температура, вологість, тип ґрунту, вміст вуглекислоти у фітосфері, інтенсивність фотосинтезу та швидкість виділення фотосинтантів з коренів, хімічний склад кореневих ексудатів, внесення мінеральних або органічних добрив, передпосівна обробка насіння препаратами діазотрофів тощо. Важливу роль в цьому процесі відіграють генотипові особливості рослин, метаболіти яких є джерелом живлення і енергії для діазотрофів. Втім генетико-селекційні роботи з покращення властивостей сучасних сортів сільськогосподарських культур не передбачають оцінку рослинних генотипів на ефективність взаємодії з ризосферними мікроорганізмами і nis-ознака, як правило, не враховується. З іншого боку, під час селекції активних штамів діазотрофів звичайно не враховується їх здатність успішно утворювати асоціації з усією різноманітністю сортів обраної культури. У випробуванні відселекціонованих штамів найчастіше використовується тільки один районований сорт. Проте для створення високоефективної асоціації важливими є врахування особливостей обох партнерів рослинно-мікробної взаємодії.

Дослідження, проведені з пшеницею, ячменем, кукурудзою, рисом і просом, свідчать про те, що в межах певного виду рослин існує міжсортова мінливість

за ознакою асоціативної фіксації азоту. Поряд із міжсортвою спостерігається також внутрішньо сортова мінливість культур за здатністю до асоціативної азотфіксації, яка обумовлена як генетичною неоднорідністю сортів, так і впливом навколишнього середовища на виявлення піс-ознаки [5-8, 15].

В роботі з озимим житом нами також було показано, що всі досліджені сорти цієї культури мають істотне генетичне варіювання піс-ознаки і вони не є генетично гомогенними [1, 3].

Метою нашої роботи було дослідити внутрішньосортвовий поліморфізм тритикале ярого за азотфіксуючою здатністю та вивчити вплив асоціативного діазотрофа *Azospirillum brasilense* 10/1 на показники варіювання даної ознаки.

Матеріали і методи. У дослідженнях були використані бактерії, ізольовані нами з кореневої зони гречки (*Azospirillum brasilense* 18-2), шовковиці (*A. brasilense* 54, 61), пшениці ярої (*A. brasilense* 37, 77), пшениці озимої (*A. brasilense* 10/2) і тритикале ярого (*A. brasilense* 10/1) і зберігаються в Колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Новий штам *Azospirillum brasilense* 10/1, який зберігається у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології НАН України за номером В-7317, було виділено з відмитих коренів тритикале ярого сорту Оберіг харківський. Зразки відмитих і підсушених коренів подрібнювали, вміщували у флакони ємністю 40 см³, додавали напіврідке безазотне середовище Доберейнер, інкубували упродовж трьох діб за температури 28-30 °С. Послідовні десятикратні розведення накопичувальних культур висівали на картопляний агар наступного складу (г/л): бурштинова кислота – 2,5, калію гідроксид – 2, агар-агар порошковий – 14, картопля – 200; рН=7,0; стерилізація – 1 атм, 30 хв.

Виділений штам *A. brasilense* 10/1 ідентифікували за морфолого-культуральними ознаками з використанням молекулярно-генетичних методів [10,13].

Азотфіксуючу активність чистих культур азоспірил визначали ацетилен-редуктазним методом. Для цього у флакони з напіврідким середовищем Доберейнер додавали по 1 мл бактеріальної суспензії з титром 3-5 · 10⁸, культивували за температури 26-28 °С упродовж 72 годин. Флакони герметизували, вводили ацетилен (10% від об'єму флакона) і інкубували протягом доби. Після закінчення строку інкубації зразки аналізували на газовому хроматографі "Chrom-4" з полум'яноіонізаційним детектором. Колонка довжиною 370 см була заповнена хромосорбом з β-β'-оксидіпропіонітрилом. Температура термостату 50 °С, газносії – азот, витрата газів (в мл/хвилину): водню – 30, азоту – 100, повітря – 500.

Внутрішньосортвову мінливість тритикале ярого оцінювали за розробленим нами методом [9].

Для визначення потенційної нітрогеназної активності (ПНА) відмиті корені рослин тритикале ярого поміщали у флакони ємністю 40 см³. Додавали 10 мл напіврідкого середовища Доберейнер, як джерело вуглецю використовували бурштинову кислоту. Надалі у підготовці зразків дотримувалися тих самих умов, що і для визначення азотфіксуючої активності чистих культур азоспірил. Аналізували на газовому хроматографі "Chrom-4" з полум'яно-іонізаційним детектором.

Статистичний аналіз (побудова інтервального варіаційного ряду за дослідними даними та його графічне зображення, визначення абсолютних та відносних показників варіації тощо) проводили, використовуючи пакет програми "Excel". Для виявлення загального характеру розподілу емпіричних даних визначали коефіцієнти асиметрії та ексцесу.

Результати та їх обговорення. Як свідчать одержані нами дані, в ризосфері і ризоплані тритикале ярого створюються сприятливі умови для розвитку азотфіксуючих бактерій різних таксономічних і еколого-трофічних груп. Виділені діазотрофи належали до родів *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. Широко представлені у кореневій зоні рослин були також бактерії роду *Azospirillum*, які привертають до себе увагу внаслідок їх високої нітрогеназної активності і здатності формувати ефективні асоціації з багатьма сільськогосподарськими культурами. Серед виділених азоспірил для подальших досліджень був відібраний штамп *A. brasilense* 10/1 з найвищою азотфіксуючою активністю. За здатністю до фіксації молекулярного азоту в чистій культурі відібраний штамп порівнювали з іншими активними штамми азоспірил, що зберігаються в колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології і агропромислового виробництва НААН. Одержані результати представлені у табл. 1.

Таблиця 1

Азотфіксуюча активність чистих культур активних штамів азоспірил

Штам	Джерело виділення	АА, нмоль етилену / 1 мл живильного середовища за добу*
<i>Azospirillum brasilense</i> 18-2	Ризосфера гречки сорту Ідель	1372±126
<i>A. brasilense</i> 54	Бульбочкоподібні утворення на шовковиці сорту Українська 61	1680±140
<i>A. brasilense</i> 61	Відмиті корені шовковиці сорту Українська 61	1344±140
<i>A. brasilense</i> 77	Відмиті корені пшениці ярої сорту Варяг	1274±126
<i>A. brasilense</i> 37	Відмиті корені пшениці ярої сорту Етюд	1498±84
<i>A. brasilense</i> 10/1	Відмиті корені тритикале ярого сорту Оберіг харківський	1344±70
<i>A. brasilense</i> 10/2	Відмиті корені пшениці озимої сорту Донской сюрприз	308±14

* П р и м і т к а: 1 мл живильного середовища містив $3\text{-}5 \cdot 10^8$ клітин азоспірил.

Наступним етапом нашої роботи було оцінити здатність активних штамів азоспірил формувати ефективні асоціації з рослинами пшениці ярої. З досвіду нашої попередньої роботи відомо, що для віднесення діазотрофа до асоціативних мікроорганізмів недостатньо ґрунтуватися тільки на його азотфіксуючій активності в чистій культурі на живильному середовищі. Необхідно впевнитися в його спроможності підсилювати процес асоціативної азотфіксації при інтродукції в кореневу зону рослин. Адже не існує прямої залежності між нітрогеназною активністю в чистій культурі і в асоціації з рослиною. Ті штами, що активно фіксували азот в чистій культурі, часто були неспроможними формувати ефективні азотфіксуючі асоціації з рослинами і навпаки [2].

На рис. 1 представлено здатність діазотрофів роду *Azospirillum* утворювати асоціації з рослинами тритикале ярого і сприяти підвищенню нітрогеназної активності в кореневій зоні культури.

Як свідчать одержані дані, всі досліджені штами азоспірил сприяли збільшенню потенційної нітрогеназної активності (ПНА) на 65-366 % у порівнянні з варіантом без інокуляції. За використання *A. brasilense* 10/1 вдалося сформувати найбільш ефективну асоціативну систему: діазотроф-тритикале яре.

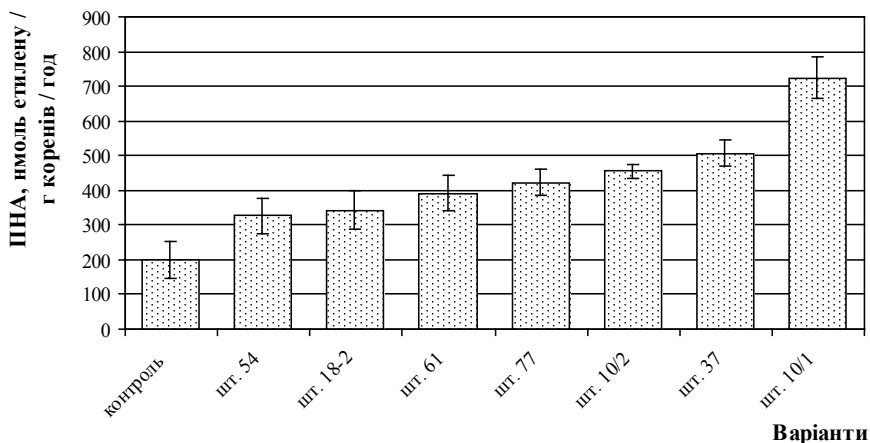


Рис. 1. Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції активними штамми азоспірил

Визначення потенційної азотфіксуючої активності на коренях достатньої кількості рослин кожного сорту (45-55 рослин) дає змогу оцінити внутрішньо-сортовий поліморфізм тритикале ярого і вплив інокуляції азоспірилами на характер варіювання даної ознаки.

За результатами досліджень побудовані графіки розподілу значень ПНА на коренях рослин тритикале ярого (рис. 2,3), показники варіювання наведені у табл. 2.

Таблиця 2
Показники варіювання потенційної нітрогеназної активності діазотрофів кореневої зони в популяціях тритикале сортів Коровай харківський і Оберіг харківський за інокуляції *A. brasilense* 10/1

Статистичний показник	Сорт			
	Коровай харківський		Оберіг харківський	
	Контроль	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 10/1	Контроль	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 10/1
$\bar{x} \pm m_x$ (середнє), нмоль етилену на рослину за добу	8,75±2,22	41,55±6,02	19,37±4,39	62,58±5,25
σ (стандартне відхилення), нмоль етилену на рослину за добу	15,07	40,83	30,70	35,19
Me (медіана), нмоль етилену на рослину за добу	0,75	18,50	2,7	62,5
Mo (модальний інтервал), нмоль етилену на рослину за добу	0-10	0-20	0-20	40-60
$V_p \pm m_p$, % (коефіцієнт варіації)	178±18	98±4	158±16	56±6
Lim (найменше і найбільше значення), нмоль етилену на рослину за добу	0,12...59,34	2,67...128,22	0,18...130,34	2,14...139,88
As (коефіцієнт асиметрії)	2,32	0,69	1,96	0,13
Ex (коефіцієнт ексесу)	4,85	-1,07	3,48	-0,77

кількість рослин

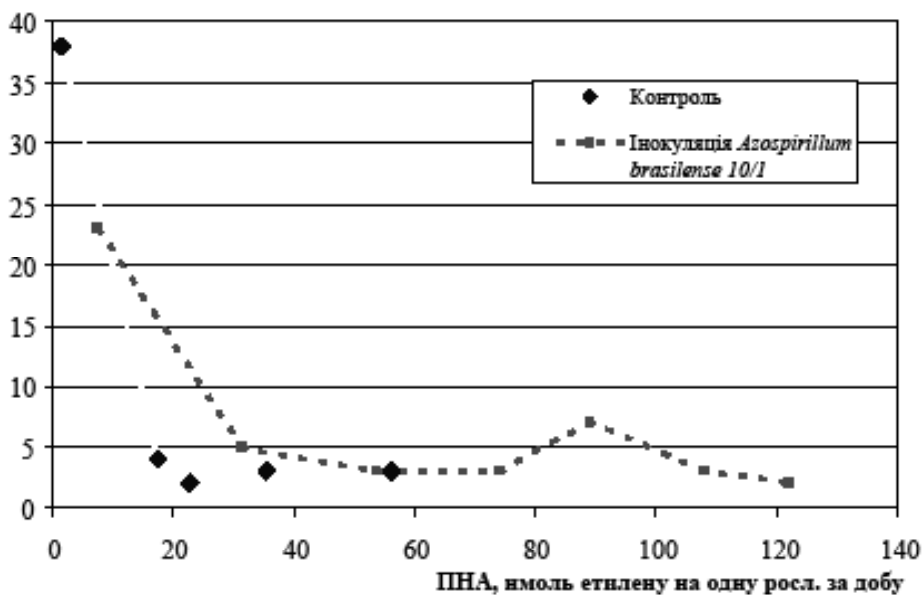


Рис. 2. Розподіл значень потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале ярого сорту Коровай харківський

Як видно з рис. 2, сорт Коровай харківський характеризується низьким азотфіксуючим потенціалом, адже ПНА на коренях переважної більшості рослин не перевищувала 10 нмоль етилену на одну рослину за добу, розподілу властива лівобічна асиметрія ($As > 0$). При цьому, даний сорт характеризується значною варіабельністю за азотфіксуючою активністю (показник коливався в діапазоні від 0,12 до 59,34 нмоль етилену на одну рослину за добу, коефіцієнт варіації (V_p) становив 178 %). Відомо, що для нормального розподілу коефіцієнти асиметрії та ексцесу дорівнюють нулю. Про різке відхилення розподілу тритикале ярого за здатністю до асоціативної азотфіксації від нормального свідчить і високий коефіцієнт ексцесу – 4,85 (табл. 2).

Інокуляція тритикале сорту Коровай харківський штамом *A. brasilense* 10/1 сприяла підвищенню потенційної азотфіксуючої активності в середньому у 4,7 рази. Розмах варіації (Lim) збільшувався у півтора і більше раз порівняно з контролем. В той же час, коефіцієнт варіації (V_p) знижувався до 98 %, що характеризує вибірку інокульованих рослин як дещо більш однорідну за ПНА, ніж рослин варіанту без інокуляції.

Вивчення внутрішньосортової мінливості сорту Оберіг харківський за потенційною нітрогеназною активністю на коренях рослин, як і у попередньому випадку, показало, що в популяціях переважали рослини з низьким проявом даної ознаки (модальний інтервал – від 0 до 20 нмоль етилену на одну рослину за добу). Але слід зазначити, що для даного сорту характерна більша кількість рослин з підвищеною азотфіксуючою активністю на коренях, яка в окремих випадках становила 128 нмоль етилену на одну рослину за добу (рис. 3).

Інокуляція тритикале сорту Оберіг харківський *A. brasilense* 10/1 приводила до підвищення ПНА в середньому у 3,2 рази, і, що особливо важливо, сприяла нормалізації розподілу значень азотфіксуючої активності у кореневій зоні рослин. Так, модальний інтервал зміщувався від 0-20 до 40-60 нмоль етилену на одну рослину

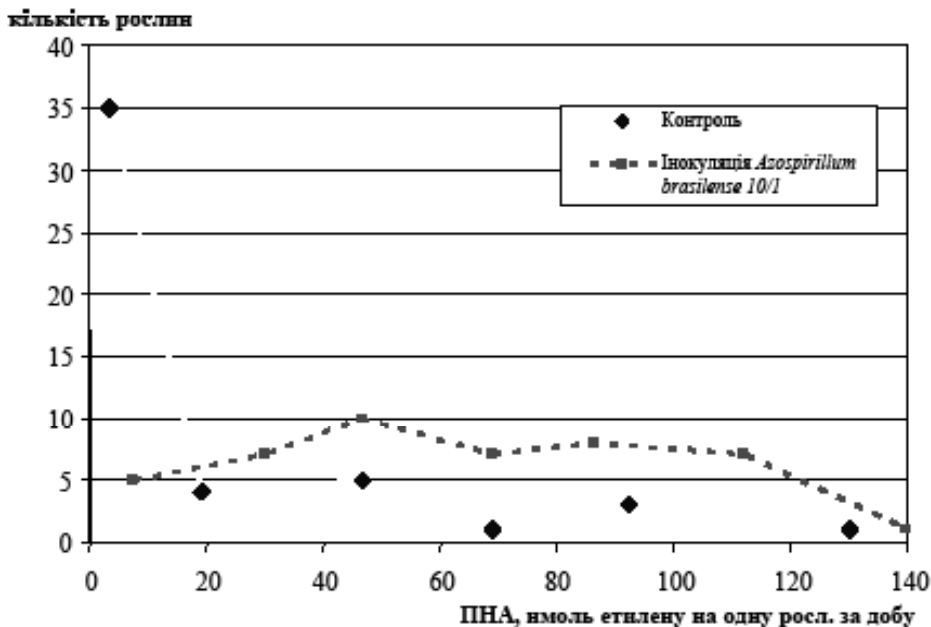


Рис. 3. Розподіл значень потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале ярого сорту Оберіг харківський

за добу, асиметрія змінювалася від край високої – 1,96 до слабкої – 0,13, від’ємний коефіцієнт ексцесу (E_x) вказує на плосковершинний, більш рівномірний характер розподілу, коефіцієнт варіації (V_p) знижувався за інокуляції у 2,8 рази (табл. 2).

Таким чином, перспективні вітчизняні сорти тритикале ярого характеризуються значним поліморфізмом за рівнем азотфіксуючої активності у кореневій зоні рослин. Застосування активного штаму *A. brasilense* 10/1 сприяло зниженню варіабельності даної ознаки в межах сорту, підвищенню потенційної нітрогеназної активності в середньому у 3,2-4,7 рази, а також нормалізації розподілу за цією ознакою у вибірках інокульованих рослин. Отже, інокуляція азоспірилами може бути ефективним засобом підвищення рівня фіксації молекулярного азоту в кореневій зоні рослин тритикале ярого і дозволяє підвищити азотфіксуючий потенціал сортів зазначеної культури, що дає змогу більш повно реалізувати комплекс господарсько-цінних ознак рослин, не порушуючи екологічне благополуччя довкілля.

Патыка В.Ф.¹, Надкерничная Е.В.², Шаховнина Е.А.²

¹ Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

² Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, Чернігов

ВЛИЯНИЕ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 10/1 НА АССОЦИАТИВНУЮ АЗОТФИКСАЦИЮ И ВНУТРИСОРТОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ ТРИТИКАЛЕ ЯРОВОГО

Резюме

Показано, что перспективные украинские сорта тритикале ярогового характеризуются значительным полиморфизмом по признаку азотфиксирующей активности

в корневой зоне растений. Применение активного штамма *Azospirillum brasilense* 10/1 способствует снижению variability данного признака в пределах сорта, повышению потенциальной нитрогеназной активности в среднем в 3,2-4,7 раза, а также нормализации распределения в выборках инокулированных растений.

К л ю ч е в ы е с л о в а: ассоциативная азотфиксация, diazotrophs, *Azospirillum brasilense* 10/1, потенциальная нитрогеназная активность, внутрисортной полиморфизм.

Patika V.P.¹, Nadkernichna O.V.², Shahovnina O.O.²

¹*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

²*Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Production, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Chernihiv*

INFLUENCE OF AZOSPIRILLUM BRASILENSE 10/1 ON ASSOCIATIVE NITROGEN FIXATION AND INTRAVARIETAL POLYMORPHISM OF SPRING TRITICALE

S u m m a r y

It is shown, that the perspective Ukrainian sorts of spring triticale characterizes by considerable polymorphism by associative N₂-fixing ability in root zone of plants. Application of active strain *Azospirillum brasilense* 10/1 promotes the decline of variability of this sign within the limits of sort, increase potential nitrogen activity is on the average in 3,2-4,7 times and also distributing normalizations in the selections of the inoculated plants.

К е у w o r d s: associative N₂-fixation, diasotrophs, *Azospirillum brasilense* 10/1, potential nitrogen activity, intravarietal polymorphism.

1. *Биологическая фиксация азота. Т.4: Ассоциативная азотфиксация /С.Я. Коць, В.В. Моргун, В.Ф. Патыка, В.Ф. Петриченко, Е.В. Надкерничная, Е.В. Кириченко. – Киев: Логос, 2014. – 412 с.*
2. *Надкернична О.В. Здатність діазотрофів до формування асоціативних систем з рослинами озимого жита // Агроекологічний журнал. – 2003. – № 3. – С. 17-20.*
3. *Надкернична О.В. Генетичний поліморфізм озимого жита за здатністю до асоціативної азотфіксації // Агроекологічний журнал. – 2003. – № 4. – С. 62-65.*
4. *Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В., Шерстобоева О.В., Мельничук Т.М., Калініченко А.В., Гриник І.В. Біологічний азот. – Київ: Світ, 2003. – 488 с.*
5. *Родынюк И.С., Степаненко И.Л., Коваль С.Ф. Ассоциативная азотфиксация в ризоценозе иммунных и короткостебельных линий яровой мягкой пшеницы // С.-х. биология. – 1991. – №5. – С.88-93.*
6. *Родынюк И.С. Генетические и экологические факторы ассоциативной азотфиксации // Биологическая фиксация азота. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. – С. 142-163.*
7. *Танцова О.И., Черемисов Б.М. Оценка коллекций ячменя и тритикале по активности азотфиксации // Докл. ВАСХНИЛ. – 1992. – №1. – С.9-12.*
8. *Шумный В.К., Сидорова К.К., Клевенская И.Я. Полиморфизм по ассоциативной азотфиксации у ячменя // Биологическая фиксация азота. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. – С. 163-183.*

9. Пат. 63718 Україна, МПК С 01 В 21/00. Застосування методу визначення потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин різних генотипів сортів зернових культур, вирощених за умов лабораторних та вегетаційних дослідів, як способу оцінки азотфіксуючого потенціалу сортів зернових культур / Надкернична О.В., Рябчун В.К., Шаховніна О.О., Богуславський Р.Л., Міненко С.М., Леонов О.Ю. – Опубл. 25.10.2011, Бюл. № 20. – 6 с.
10. Пат. 104212 Україна, МПК С 12 N 1/20, С12R1/01; С05F11/08. Штам бактерій *Azospirillum brasilense* для інокуляції насіння тритикале ярого / Надкернична О.В., Шаховніна О.О., Ушакова М.А. заявник та патентовласник Ін-т с-г мікробіології та агропромислового виробництва НААН. – № а 2012 03817; заявл. 29.03.12; опубл. 10.01.14, Бюл. № 1. – 3 с.
11. *Pasichnik, L.A., Patyka, V.F., Khodos, S.F., Vinnichuk, T.S.* Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread // *Mikrobiolohichnyi zhurnal*. – 2012. –74 (4). – P. 37-44.
12. *Krutylo D.V., Nadkernychna O.V., Kovalevs'ka T.M., Patyka V.P.* Biological diversity of soybean nodule bacteria in soils of Ukraine (2008) *Mikrobiolohichnyi zhurnal* (Kiev, Ukraine). – 2008. – 70 (6), P. 27-34.
13. *Patyka T.I., Patyka N.V., Patyka V.F.* Phylogenetic interrelations between serological variants of *Bacillus thuringiensis* // *Biopolymers and Cell*, 2009. –25 (3). – P. 240-244.
14. *Rennie R.J.* Potential use of induced mutation to improve symbioses of crop plants with N₂-fixing bacteria // *Induced mutation – a tool in plant breeding*. – Vienna: IAEA, 1981. – P. 293-321.
15. *Rennie R.J.* N₂-fixation in cereals // *Can. Agriculture*. – 1983. – **29**, №3-4. – P.4-9.

Отримано 14.03.2014