

ФІКСАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТУ У КОРЕНЕВІЙ ЗОНІ ПЕРСПЕКТИВНИХ ВІТЧИЗНЯНИХ СОРТІВ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО

Шаховніна О.О.

Науковий керівник – доктор біологічних наук

О.В. Надкернична

Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України

e-mail: helenshah@ukr.net

*Потенційна активність азотфіксації на відмитих коренях рослин досліджуваних сортів тритикале ярого, визначена за умов польових дослідів, зазнає значних коливань як під час однієї фенофази у різні роки досліджень, так і впродовж вегетаційного періоду, що обумовлено впливом чинників навколишнього середовища, а також існуванням внутрішньосортової мінливості. Сорт Оберіг харківський характеризується значним поліморфізмом за ознакою азотфіксувальної активності у кореневій зоні рослин. Передпосівна інокуляція насіння тритикале активним штамом *Azospirillum. sp.* 10 приводить до збільшення кількості рослин з підвищеною азотфіксувальною активністю на відмитих коренях.*

Ключові слова: тритикале яре, асоціаціативна азотфіксація, потенційна нітрогеназна активність, ризосфера, відмиті корені рослин.

Біологічна фіксація молекулярного азоту атмосфери є одним з важливих біохімічних процесів, що впливають на родючість ґрунтів. Формування азотфіксувальних рослинно-мікробних асоціацій визначається взаємодією між рослинами і мікробними популяціями, які знаходяться під постійним впливом чинників навколишнього середовища [1]. Важливу роль у даній взаємодії відіграють генетичні особливості рослин, що визначає специфічний склад і кількість кореневих ексудатів, які є джерелом живлення для ґрунтових діазотрофів. Показано залежність інтенсивності фіксації атмосферного азоту у кореневій зоні злакових культур від сортових особливостей рослин [2, 3].

Тритикале яре є відносно новою сільськогосподарською культурою, селекція якої пройшла 40-річний період розвитку і становлення. Завдяки успіхам у створенні сортів з цінними

господарськими ознаками, тритикале з кожним роком набуває все більшого використання. Господарська цінність тритикале ярого полягає у меншій вибагливості цієї культури до умов вирощування і високій біологічній цінності зерна та зеленої маси. Впровадження цієї культури дає змогу розширити асортимент продукції зернових та знизити пестицидне навантаження на навколишнє середовище, оскільки сучасні сорти характеризуються високою стійкістю до хвороб та шкідників [4]. Тритикале яре перевищує за урожайністю зерна пшеницю при розміщенні по гірших попередниках та бідніших ґрунтах, за більш пізніх строків посіву та низьких рівнях вологозабезпечення.

Активність азотфіксації у кореневій зоні тритикале ярого не вивчалася. Тому метою нашої роботи була оцінка сучасних перспективних сортів тритикале ярого за здатністю стимулювати фіксацію азоту атмосфери.

Матеріали і методи. До роботи були залучені сорти тритикале ярого, занесені до Державного реєстру сортів України: Аїст харківський, Жайворонок харківський, Соловей харківський, Коровай харківський, Оберіг харківський, Микола, Лосинівське, люб'язно надані співробітниками Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Дослідження азотфіксувальної здатності в кореневій зоні рослин вітчизняних перспективних сортів тритикале ярого проводили упродовж 2006-2009 років у польових умовах. Польові досліди проводили на чорноземі вилугуваному неглибокому легкосуглинковому на лесовидних суглинках, який характеризувався такими агрохімічними показниками: вміст гумусу в орному шарі становив 3,6 %, рухомих форм фосфору (за Кірсановим) – 210-240 мг P_2O_5 , обмінного калію (за Кірсановим) – 160-170 мг K_2O на 1 кг ґрунту, $pH_{\text{водн.}}$ – 6,5. Розмір дослідної ділянки 4 м², розмір облікової ділянки 1 м², повторність чотириразова, розміщення ділянок рендомізоване.

Потенційну азотофіксувальну активність (ПНА) ризосферного ґрунту і відмитих коренів рослин визначали ацетиленетиленовим методом [5] 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-носії – азот, витрата газів (в мл/хвилину): водню – 30, азоту – 100, повітря – 500.

Для визначення потенційної нітрогеназної активності ризосферний ґрунт і корені рослин поміщали у флакони ємністю 40 см³. Додавали 10 мл напіврідкого середовища Доберейнер, як джерело вуглецю використовували бурштинову кислоту. Інкубували упродовж 72 годин за температури 28 °С. 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.

Внутрішньосортову мінливість сорту тритикале Оберіг харківський оцінювали за результатами вегетаційного дослідю. Ґрунт – чорнозем вилугуваний неглибокий легкосуглинковий на лесовидних суглинках. Посудини ємністю 200 мл наповнювали заздалегідь просіяним і звільненим від рослинних решток ґрунтом. Визначали вологість і повну вологоємність ґрунту. Надалі підтримували вологість ґрунту на рівні 60 % від повної вологоємності. У кожен посудину висівали по 3 насінини досліджуваного сорту. За 3-5 діб після появи сходів на кожен посудину залишали по одній рослині. Експонували в умовах люміностату (інтенсивність освітлення 2000-2500 люкс, фотоперіод 16 годин, температура 26±2 °С) протягом трьох тижнів. По закінченні терміну експозиції визначали потенційну нітрогеназну активність на коренях кожної рослини ацетилен-етиленим методом [5]. Досліджували щонайменше 50 рослин кожного сорту.

Результати та їх обговорення. Як відомо з літературних джерел, азотфіксувальний потенціал рослинно-мікробної асоціації обумовлений активністю процесу фіксації молекулярного азоту в трьох топологічно розділених зонах, які перебувають у постійній взаємодії: у ризосферному ґрунті, на поверхні коренів та безпосередньо у кореневих тканинах рослин [6].

Вивчення потенційної нітрогеназної активності у ризосфері тритикале ярого протягом 2006-2008 років показало, що діапазон мінливості даної ознаки під час найбільш фізіологічно активної фази розвитку рослин – цвітіння складає від 83 до 453 нмоль етилену/г ґрунту/годину (табл. 1). Коефіцієнт варіації азотфіксувальної активності за роками досліджень (V_p) у ризосферному ґрунті для окремих сортів становить 40-71 %.

Як свідчать результати багаторічних досліджень, середньорічні значення потенційної активності нітрогенази у фазу цвітіння на відмитих коренях рослин варіюють для різних сортів у межах

872-1214 нмоль етилену/г коренів/годину, в той час як у ризосфері – у межах 161-296 нмоль етилену/г ґрунту/годину (табл. 1, 2). Наведені дані свідчать про те, що активні діазотрофи колонізують переважно корені рослин тритикале ярого.

Таблиця 1. Діапазон мінливості азотфіксувальної активності у ризосферному ґрунті рослин вітчизняних сортів тритикале ярого (фаза цвітіння, 2006-2008 рр.)

Сорт	$X \pm S_x$	$V_p, \%$	lim
Оберіг харківський	279±161	64	99...453
Коровай харківський	296±171	59	105...443
Лосинівське	176±101	40	95...228
Жайворонок харківський	227±131	71	83...400
Соловей харківський	231±133	57	84...339
Микола	161±93	65	95...281
Аїст харківський	250±145	54	95...340

У зв'язку з цим, основну увагу було приділено дослідженню азотфіксувального потенціалу на корінні рослин різних сортів тритикале ярого.

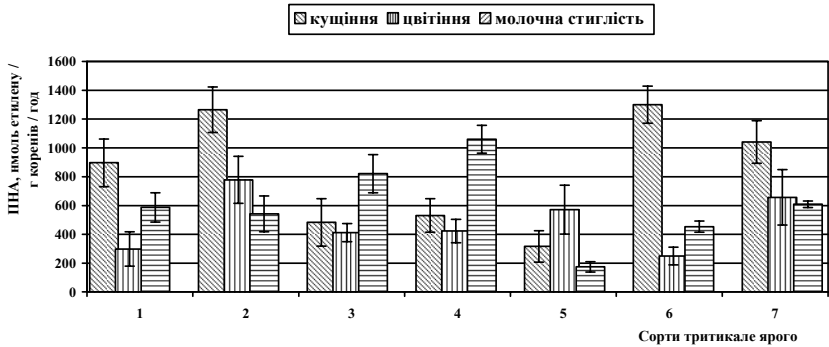
Таблиця 2. Діапазон мінливості азотфіксувальної активності на корінні рослин перспективних сортів тритикале ярого (фаза цвітіння, 2006-2009 рр.)

Сорт	$X \pm S_x$	$V_p, \%$	lim
Оберіг харківський	1046±217	41	656...1644
Коровай харківський	907±235	52	301...1337
Лосинівське	1214±336	55	423...1894
Жайворонок харківський	1156±401	69	384...2027
Соловей харківський	723±273	76	249...1501
Микола	872±333	76	404...1821
Аїст харківський	900±398	88	256...1938

Дослідження потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях рослин тритикале ярого за умов польових дослідів показали, що азотфіксувальна активність зазнає значних коливань як під час однієї фенофази у різні роки досліджень, так і упродовж вегетаційного періоду. Згідно одержаних результатів, коефіцієнт варіації (V_p) азотфіксувальної активності на відмитих коренях рослин різних сортів тритикале ярого за роками досліджень

складає 41-88 % (табл. 2).

На рис. 1 наведено значення потенційної азотфіксувальної активності на корінні рослин досліджуваних сортів тритикале ярого упродовж вегетаційного періоду 2008 року.



- 1 – Аїст харківський; 2 – Коровай харківський; 3 – Микола;
4 – Лосинівське; 5 – Жайворонок харківський;
6 – Соловей харківський; 7 – Оберіг харківський.

Рис. 1. Потенційна азотфіксувальна активність на відмитих коренях рослин досліджуваних сортів тритикале ярого у різні фази розвитку (польовий дослід, 2008 рік)

Значний діапазон коливання азотфіксувальної активності може бути обумовлений як впливом чинників навколишнього середовища, що спричиняють варіювання складу кореневих виділень рослин, так і існуванням внутрішньосортової мінливості тритикале за здатністю до асоціативної азотфіксації.

Серед абіотичних чинників найбільш істотно на величину азотфіксувальної активності впливають температурний режим, за якого розвиваються рослини, і вологість ґрунту, що визначається кількістю опадів упродовж певного проміжку часу.

Як відомо, процес фіксації молекулярного азоту здійснюється діазотрофами, які колонізують кореневу зону рослин, завдяки наявності в них ферментного комплексу нітрогенази. Азотфіксувальні мікроорганізми ґрунту є переважно мезофілами (температурний оптимум росту 20-42 °С), максимальна активність нітрогеназного ферментного комплексу спостерігається за температури 28-30 °С. Тому підвищення температури повітря позитивно відбивається на азотфіксувальній активності у кореневій зоні тритикале ярого.

Насичення ґрунту вологою впливає на його мікробіологічну

активність, адже вода є важливим регуляторним фактором у різних біологічних процесах, зокрема в процесах ферментативного каталізу. Так, існує певний критичний рівень зволоження, який визначає рухомість активних центрів ферментів. Імовірно, при висушуванні ґрунту поряд з гальмуванням розвитку і розмноження бактерій відбувається зниження активності нітрогеназного комплексу діазотрофів, що в результаті викликає зниження азотфіксувальної активності ґрунту при зниженні його вологості [7]. Експериментально було доведено, що ефективність зволоження ґрунту для процесу азотфіксації стрімко зростає за високих температур і знижується за низьких [8]. Зважаючи на те, що в природних умовах існують значно складніші поєднання багатьох чинників, відокремити вплив температури або вологості на азотфіксувальну активність зазвичай складно.

Аналіз даних метеоспостережень за травень-червень 2006-2008 років показав, що найбільш сприятливим для формування азотфіксувального мікробного угруповання був 2007 рік (табл. 3).

Таблиця 3. Дані метеоспостережень за травень-червень 2006-2008 рр.

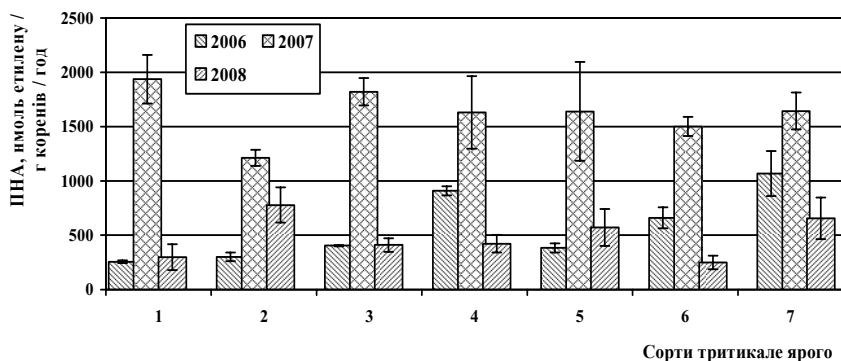
Місяць	Декада	Температура повітря, °С			Температура ґрунту на глибині 10 см, °С			Опади, мм		
		2006 рік	2007 рік	2008 рік	2006 рік	2007 рік	2008 рік	2006 рік	2007 рік	2008 рік
Травень	I декада	12,8	8,5	10,5	12,0	10,0	12,0	18,0	30,0	10,5
	II декада	13,8	21,4	14,8	14,0	17,0	15,0	21,0	25,0	14,8
	III декада	14,4	23,4	15,4	16,0	23,0	17,0	43,0	35,0	15,4
	середні за місяць	13,7	17,8	13,6	14,0	16,7	14,7	27,3	30,0	13,6
Червень	I декада	14,8	19,8	16,3	16,0	22,0	18,0	35,0	13,0	16,3
	II декада	16,9	21,4	18,5	18,0	23,0	21,0	18,0	25,0	18,5
	III декада	22,3	18,0	18,5	24,0	20,0	21,0	20,0	12,0	18,5
	середні за місяць	18,0	19,7	17,8	19,3	21,7	20,0	24,3	16,7	17,8

Як свідчать дані табл. 3, II-III декади травня та I-II декади червня 2007 року характеризувалися підвищеними температурами повітря порівняно з умовами 2006 та 2008 років. Так, середньомісячна температура повітря у травні на 4,1-4,2, у червні – на 186

1,7-1,9 °С переважала таку у 2006 і 2008 роках. Підвищення температури повітря сприяло істотному підвищенню температури ґрунту на глибині 10 см, що є зоною розвитку кореневої системи рослин та асоційованих з нею ґрунтових діазотрофів. На кінець травня – початок червня 2007 року випало 204-217 % від норми опадів, і забезпечення ґрунту вологою також було оптимальним.

Сприятливий температурний режим 2007 року позначився на азотфіксувальній активності в кореневій зоні рослин тритикале ярого, фаза цвітіння якого припадала на кінець травня – початок червня (рис. 2). Так, у 2007 році потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин у фазу цвітіння істотно переважала активність фіксації молекулярного азоту, що спостерігали у 2006 та 2008 роках.

Звертають на себе увагу сорти тритикале ярого – Аїст харківський і Микола, азотфіксувальна активність на корінні яких у 2007 році була підвищеною у 3-10 разів порівняно з 2006 і 2008 роками.



- 1 – Аїст харківський; 2 – Коровай харківський; 3 – Микола;
 4 – Лосинівське; 5 – Жайворонок харківський;
 6 – Соловей харківський; 7 – Оберіг харківський.

Рис. 2. Потенційна нітрогеназна активність (ПНА) на відмитих коренях рослин сортів тритикале ярого (фаза цвітіння, польові досліді 2006-2008 рр.)

Обчислено коефіцієнти кореляції між середньомісячною температурою повітря, а також середньомісячною температурою у верхньому шарі ґрунту у травні 2006-2008 років та показником потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях рослин досліджуваних сортів тритикале ярого у фазу цвітіння (табл. 4). Як

видно з таблиці 4, потенційна азотфіксувальна активність корелює з температурою повітря на рівні 84,13-99,97 % з температурою у верхньому шарі ґрунту – 84,70-100 % для різних сортів, що свідчить про наявність тісного зв'язку між зазначеними показниками.

Таблиця 4. Кореляційний зв'язок між середньомісячними температурами травня і потенційною нітрогеназною активністю (ПНА) на відмитих коренях рослин тритикале ярого

Сорт	Коефіцієнт кореляції, %	
	температури повітря і ПНА	температури ґрунту на глибині 10 см і ПНА
Аїст харківський	99,91	99,39
Коровай харківський	84,13	91,40
Микола	99,97	99,18
Лосинівське	92,46	85,56
Жайворонок харківський	98,72	100,00
Соловей харківський	95,32	89,59
Оберіг харківський	91,82	84,70

Отже, вплив чинників навколишнього середовища на потенційну нітрогеназну активність є значним, що не дає змогу оцінити сорти тритикале ярого за азотфіксувальним потенціалом у кореневій зоні рослин за умов польових дослідів. Поряд з цим, з літературних джерел відомо про існування значної внутрішньосортової мінливості, що була показана у роботах з ячменем ярим та житом озимим [2, 3].

Для того щоб уникнути впливу чинників навколишнього середовища і оцінити як міжсортову, так і внутрішньосортову мінливість за здатністю до асоціативної азотфіксації, досліджували сорти тритикале ярого за контрольованих умов лабораторних дослідів. На рис. 3 показано внутрішньосортовий поліморфізм тритикале ярого за здатністю до стимулювання асоціативної азотфіксації на прикладі сорту Оберіг харківський. Діапазон коливання азотфіксувальної активності на відмитих коренях рослин зазначеного сорту становить 0,2-130 нмоль етилену/рослину/год: виділяється два модальні класи: від 0,2 до 0,9 нмоль етилену/рослина/годину (з максимумом 0,3-0,6) та від 10 до 130 (з максимумом 30-50 нмоль етилену/рослину/год). Кількість рослин

з азотфіксувальною активністю на відмитих коренях, вищою від середньої за вибіркою, становить не більше 28 %.

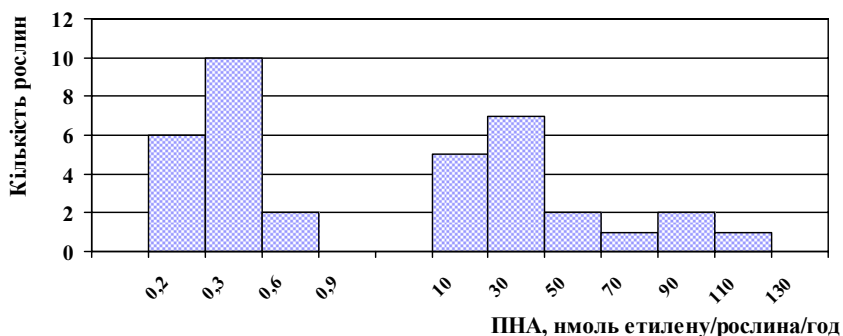


Рис. 3. Внутріньосортова мінливість тритикале ярого за здатністю до стимулювання асоціативної азотфіксації (сорт *Оберіг харківський*, вегетаційний дослід)

З відмитих коренів рослин тритикале перспективного відчизняного сорту *Оберіг харківський* був виділений штам азотфіксувальних бактерій *Azospirillum sp. 10*, який характеризується високою активністю нітрогенази в чистій культурі (8,62-10,92 мкг азоту/1 мл середовища за 1 добу). Досліджували вплив даного штаму на внутріньосортівий поліморфізм сорту *Оберіг харківський* за азотфіксувальною здатністю (рис. 4).

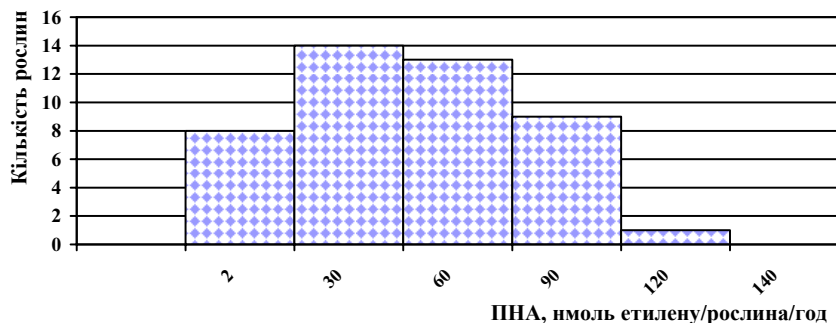


Рис. 4. Внутріньосортівий поліморфізм тритикале ярого за здатністю до стимулювання асоціативної азотфіксації під впливом інокуляції штамом *Azospirillum sp. 10* (сорт *Оберіг харківський*, вегетаційний дослід)

Передпосівна інокуляція насіння зазначеного сорту азотфіксувальними бактеріями *Azospirillum sp. 10* практично

не вплинула на діапазон мінливості, але привела до зникнення розщеплення за ознакою азотфіксувальної активності. У даному випадку ми спостерігали один модальний клас у діапазоні 2-140 нмоль етилену/рослину/год. Кількість рослин з підвищеною азотфіксувальною активністю на відмитих коренях зросла і становила понад 50 % від об'єму вибірки.

Отже, засобом підвищення азотфіксувальної активності у кореневій зоні зернових злаків і, зокрема, тритикале ярого, може бути як добір сортів з високою здатністю до стимулювання процесу азотфіксації, так і використання ефективних штамів асоціативних діазотрофів. Найбільш вагомий результат можна одержати, якщо об'єктом селекційної роботи виступатиме асоціативна система діазотрофи – рослина як єдине ціле.

Потенційна активність азотфіксації на відмитих коренях рослин досліджуваних сортів зазнає значних коливань як під час однієї фенофази у різні роки досліджень, так і упродовж вегетаційного періоду, що обумовлено впливом чинників навколишнього середовища, а також існуванням значної внутрішньосортової мінливості тритикале ярого. Дослідження сорту Оберіг харківський за умов вегетаційного дослідження показало, що зазначений сорт характеризується значним поліморфізмом за ознакою азотфіксувальної активності на відмитих коренях рослин. Передпосівна інокуляція насіння тритикале активним штамом *Azospirillum sp.* 10 приводить до збільшення кількості рослин з підвищеною азотфіксувальною активністю у кореневій зоні.

1. Родынюк И.С. Ассоциативная азотфиксация в ризоценозе иммунных и короткостебельных линий яровой мягкой пшеницы /И.С. Родынюк, И.Л. Степаненко, С.Ф. Коваль //С.-х. биология. – 1991. – № 5. – С. 88-93.

2. Надкернична О.В. Функціонування асоціативної системи діазотрофи-озиме жито залежно від сортових особливостей рослин /О.В. Надкернична //С.-г. мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. – Чернівці: ЦНТЕІ, 2007. – Вип. 6. – С. 7-17.

3. Шумный В.К. Полиморфизм по ассоциативной азотфиксации у ячменя /В.К. Шумный, И.Ю. Степаненко //Биологическая фиксация азота. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. – С. 163-185.

4. Вирощування ярого тритикале для стабілізації виробництва зерна /[В.К. Рябчун, В.І. Шатохін, В.С. Мельник та ін.] //Посібник українського хлібороба. Науково-виробничий щорічник. – К., 2010. – С. 199-203.

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

6. Родынюк И.С. Генетические и экологические факторы ассоциативной азотфиксации //И.С. Родынюк //Биологическая фиксация азота. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. – С. 142-162.

7. Умаров М.М. Ассоциативная азот фиксация //М.М. Умаров. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – 136 с.

8. Клевенская И.Л. Влияние экологических факторов на активность азотфиксации //И.Л. Клевенская //Биологическая фиксация азота – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. – С. 213-240.

ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА В КОРНЕВОЙ ЗОНЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ ЯРОВОГО

Шаховнина Е.А.

Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины,
г. Чернигов

*Потенциальная активность азотфиксации на отмытых корнях растений исследуемых сортов тритикале ярового, определяемая в условиях полевых опытов, характеризовалась значительными колебаниями как во время одной фенофазы в разные года исследований, так и на протяжении вегетационного периода, что обусловлено влиянием факторов окружающей среды, а также существованием внутрисортной изменчивости. Сорт Обериг харьковский характеризуется значительным полиморфизмом по признаку азотфиксирующей активности в корневой зоне растений. Предпосевная инокуляция семян тритикале активным штаммом *Azospirillum. sp. 10* приводит к увеличению количества растений с повышенной азотфиксирующей активностью на отмытых корнях.*

Ключевые слова: *тритикале яровое, ассоциативная азотфиксация, потенциальная нитрогеназная активность, ризосфера, отмытые корни растений.*

NITROGEN FIXATION ABILITY IN ROOT ZONE OF PERSPECTIVE NATIONAL VARIETIES OF SPRING TRITICALE

Shahovnina O.O.

Institute of Agricultural Microbiology NAAS of Ukraine, Chernihiv

Potential activity of nitrogen fixation on washed roots of investigated varieties of spring triticale determined in field experiments has characterized by considerable fluctuations both during single phenophase in different years of research and throughout the vegetative period, that was caused by the influence of environment factors as well as by the existence of variability within the cultivar. The cultivar Oberig kharkovsky possesses the considerable polymorphism by the nitrogen fixation activity index in root zone of plants. Presowing inoculation of triticale seeds with active strain Azospirillum sp. 10 results in the increase of number of plants with higher nitrogen fixation activity on the washed roots.

Key words: spring triticale, associative nitrogen fixation, potential nitrogenase activity, rhizosphere, washed roots of plants.