

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА  
АГРОПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

**ШАХОВНІНА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 631.461.5:633.11/19

**АСОЦІАТИВНА АЗОТФІКСАЦІЯ І ДІАЗОТРОФИ КОРЕНЕВОЇ ЗОНИ  
ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ТА ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО**

03.00.07 – мікробіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата сільськогосподарських наук

Чернігів – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в лабораторії рослинно-мікробних взаємодій Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Надкернична Олена Володимирівна,**  
Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, завідувач лабораторії рослинно-мікробних взаємодій

**Офіційні опоненти:** доктор сільськогосподарських наук, професор  
**Шерстобоева Олена Володимирівна,**  
Інститут агроєкології і природокористування НААН, головний науковий співробітник відділу агроєкології і біобезпеки

доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Іутинська Галина Олександрівна,**  
Інститут мікробіології і вірусології  
ім. Д. К. Заболотного НАН України  
заступник директора з наукової роботи, завідувач відділу загальної та ґрунтової мікробіології

Захист відбудеться « 09 » лютого 2017 р. о 10<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 79.377.01 в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН за адресою:  
14027, м. Чернігів, вул. Шевченка, 97

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН за адресою:  
14027, м. Чернігів, вул. Шевченка, 97

Автореферат розісланий « 05 » січня 2017 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради



В.П. Горбань

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Фіксація молекулярного азоту атмосфери є одним з найбільш важливих біохімічних процесів, який суттєво впливає на родючість ґрунтів і забезпеченість рослин біологічним азотом. Поряд з дослідженням симбіотичної азотфіксації в мікробіології бурхливого розвитку набув напрям асоціативної азотфіксації (Умаров, 1986; Пати́ка зі співавт., 2003; Elmerich, 2007; Андреюк с соавт., 2010; Коць зі співавт., 2014). Досліджуються фізіологічні та біохімічні особливості даного процесу, активно вивчаються мікроорганізми, що здійснюють його в асоціації з рослинами (Hartman, 1988; Costacurta, Vanderleyden, 1995; Белімов с соавт., 1999; Шерстобоева, 2003; Bashan et al., 2004). Показано, що усім небобовим рослинам певною мірою притаманна здатність контролювати формування азотфіксувальної асоціації і підтримувати процес фіксації атмосферного азоту у кореневій зоні, яка позначається терміном “*nis*-ознака” (nitrogen fixation supportive) (Renni, 1981).

Дослідження, проведені з пшеницею, житом, ячменем, кукурудзою, рисом і просом, свідчать про те, що в межах певного виду рослин існує міжсортова мінливість за ознакою асоціативної фіксації азоту (Renni, 1983; Manga, 1985; Родынюк, 1991; Танцова, Черемисов, 1993; Надкернична, 2007). Поряд з міжсортовою відмічають також внутрішньосортову мінливість небобових культур, яка обумовлена як генетичною неоднорідністю сортів, так і впливом навколишнього середовища на рівень азотфіксувальної активності у їх кореневій зоні (Шумний, 1991; Надкернична, 2003).

Генетико-селекційні роботи з покращення властивостей сучасних сортів сільськогосподарських культур не передбачають оцінку рослинних генотипів на ефективність взаємодії з ризосферними мікроорганізмами. З іншого боку, під час селекції активних штамів діазотрофів звичайно не враховується їх здатність успішно утворювати асоціації з усім розмаїттям сортів обраної культури. У випробуванні відселекціонованих штамів азотфіксувальних мікроорганізмів здебільшого використовується тільки один районований сорт.

Здобутки координованої селекції у створенні вискоефективних бобово-ризобіальних симбіозів, а також дані про високу специфічність взаємодії сортів пшениці ярої з асоціативними мікроорганізмами свідчать про те, що надзвичайно важливим є урахування особливостей обох партнерів рослинно-мікробної взаємодії та створення оптимальних поєднань їх генотипів (Проворов, 1996).

Отже, вивчення асоціативної взаємодії рослин різних сортів ярих пшениці та тритикале з діазотрофами є необхідним та актуальним, оскільки розширює наші уявлення про роль небобових рослин у формуванні та ефективному функціонуванні рослинно-мікробних асоціацій, дає можливість підвищити урожайність зазначених сільськогосподарських культур, поліпшити якість одержаної продукції та зберегти довкілля у благополучному стані.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано в лабораторії рослинно-мікробних взаємодій Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України у відповідності з ПНД НААН “Генетичні ресурси рослин”, завданням:

“Виявити серед генетичного різноманіття злакових культур джерела високої здатності до асоціативної азотфіксації, сформувати на їх основі спеціальні колекції” (ДР № 0106U006247, 2006-2010 рр.), ПНД НААН “Сільськогосподарська мікробіологія”, завданням “Виділити активні штами діазотрофів та вивчити особливості взаємодії азотфіксуючих мікроорганізмів з рослиною в залежності від видів мікро- і макроорганізмів з метою створення високопродуктивних симбіозів і асоціацій” (ДР № 0106U004264, 2006-2010 рр.), ПНД НААН “Сільськогосподарська мікробіологія” завданням “Розробити наукові основи створення ефективних симбіозів і асоціацій азотфіксувальних бактерій з рослинами за використання адаптивного потенціалу мікроорганізмів, здатних до ендоефітії” (№0111U000979, 2011-2015 рр.).

**Мета та завдання досліджень.** Метою роботи було дослідити азотфіксувальний потенціал асоціацій різних сортів ярих пшениці та тритикале з діазотрофами кореневої зони і показати шляхи його підвищення.

Відповідно до поставленої мети було сформульовано такі завдання:

- за умов польових дослідів вивчити азотфіксувальний потенціал асоціацій ярих пшениць і тритикале з діазотрофами та міжсортіву мінливість зазначених культур за піс-ознакою;
- дослідити внутрішньосортіву поліморфізм тритикале ярого за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію у кореневій зоні рослин;
- дослідити азотфіксувальне мікробне угруповання кореневої зони ярих пшениць та тритикале та методами аналітичної селекції одержати нові ефективні штами асоціативних діазотрофів;
- вивчити вплив нових штамів *Azospirillum brasilense* 77 і *A. brasilense* 10/1 на азотфіксувальну активність та біосинтетичні процеси в рослинах ярих пшениці та тритикале;
- дослідити вплив нового штаму *A. brasilense* 10/1 на внутрішньосортіву поліморфізм тритикале ярого за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію у кореневій зоні рослин;
- за умов польових дослідів вивчити вплив нового перспективного штаму *A. brasilense* 10/1 на урожайність тритикале ярого та якість одержаної продукції;
- за умов виробничих дослідів підтвердити ефективність нового штаму *A. brasilense* 10/1, дати економічну та енергетичну оцінку застосування зазначеного штаму як перспективного агенту мікробного препарату для тритикале ярого.

**Об’єкт дослідження:** асоціативна взаємодія діазотрофів з рослинами пшениці ярої та тритикале ярого.

**Предмет дослідження:** азотфіксувальний потенціал мікробно-рослинних систем ярих пшениці та тритикале різних сортів; азотфіксувальне мікробне угруповання кореневої зони зазначених культур.

**Методи дослідження:** мікробіологічні – для виділення діазотрофів з кореневої зони ярих пшениць та тритикале; фізіолого-біохімічні, культурально-морфологічні, електронно-мікроскопічні, молекулярно-генетичні – для ідентифікації діазотрофів; газохроматографічний – для визначення

азотфіксувальної активності мікроорганізмів та їх асоціацій з рослинами; біохімічні – для визначення глютамінсинтезна активності і вмісту розчинного білка у листках пшениці та тритикале; спектрофотометричний – визначення вмісту хлорофілів *a* і *b* в листках рослин; вегетаційних та польових дослідів – для визначення ефективності застосування нових штамів діазотрофів; математично-статистичні – для оцінки вірогідності отриманих результатів, визначення кореляційних зв'язків, побудови варіаційних рядів розподілу, визначення показників варіації азотфіксувальної активності у вибірках досліджуваних рослин.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Показано існування міжсортвої мінливості ярих пшениць і тритикале за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію. Спектр мінливості сортів пшениці ярої становить від 137 до 1707, тритикале ярого – від 249 до 2027 нмоль етилену на 1 г коренів за 1 годину. Вперше встановлено, що перспективні вітчизняні сорти тритикале ярого характеризуються значним внутрішньосортвоим поліморфізмом за активністю фіксації молекулярного азоту у кореневій зоні рослин.

Розроблено та захищено патентом України (№ 63718) спосіб оцінки азотфіксувального потенціалу асоціативних систем “діазотрофи – рослина” залежно від сорту зернової культури, який дозволяє не тільки відібрати сорти з підвищеним рівнем азотфіксувальної активності у кореневій зоні рослин, але і охарактеризувати гомогенність сорту за піс-ознакою.

Вперше охарактеризовано азотфіксувальне мікробне угруповання кореневої зони тритикале ярого, яке представлено, в основному, бактеріями родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*.

Одержано та захищено патентами України (№ 104212, № 105118) нові активні штами асоціативних діазотрофів *A. brasilense* 10/1 і *A. brasilense* 77, використання яких позитивно позначається на біосинтетичних процесах у рослинному організмі. А саме: глютамінсинтезна активність у листках підвищується на 58,0-71,9 %, вміст розчинного білка – на 9,7-16,3 %, азотфіксувальний потенціал за потенційною нітрогеназною активністю у ризосферному ґрунті – у 2-14 разів, на відмитих коренях рослин – до 2 разів, продуктивність ярих пшениць та тритикале за накопиченням надземної маси рослин – на 8,8-13,5 %.

Вперше виявлено, що застосування активного штаму *A. brasilense* 10/1 сприяє зниженню внутрішньосортвої варіабельності тритикале ярого за піс-ознакою у 0,8-2,8 раза.

**Практичне значення одержаних результатів.** Багаторічні польові і вегетаційні дослідження засвідчили, що селекцію нових ефективних штамів діазотрофів необхідно проводити з урахуванням особливостей генотипу рослин, використовуючи сорти з високим рівнем нітрогеназної активності в їх кореневій зоні.

Результати проведених дослідів дозволили рекомендувати сільськогосподарському виробництву новий штам азотфіксувальних бактерій *A. brasilense* 10/1, який можна використовувати як біоагент мікробного препарату для передпосівної інокуляції тритикале ярого, що дозволить підвищити

урожайність культури від 12,9 до 23,6 % та покращити якість одержаної продукції.

Основні результати досліджень використані для розробки науково-практичних рекомендацій “Мікробні препарати в сучасних аграрних технологіях” (Київ, 2015) та методичних рекомендацій “Наукові основи створення штучних симбіозів діазотрофів зі злаковими і бобовими культурами” (Чернігів, 2015).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора. Здобувачем проаналізовано відповідну наукову літературу, проведено лабораторні, вегетаційні та польові експерименти, статистичну обробку одержаних даних, їх узагальнення, інтерпретацію та порівняльний аналіз із літературними даними, а також підготовку матеріалів до публікації.

Планування роботи, аналіз отриманих результатів експериментів та формулювання окремих положень і висновків дисертації автором проведено за участі наукового керівника роботи, д. б. н., проф. О. В. Надкерничної.

Сиквенс-аналіз послідовності 16S рРНК *A. brasilense* 10/1 проводили в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

За надану допомогу у підготовці дисертаційної роботи автор щиро вдячна співробітникам лабораторії рослинно-мікробних взаємодій ІСМАВ НААН, котрі є співавторами опублікованих робіт, а також висловлює подяку В. М. Стрекалову за допомогу у проведенні електронно-мікроскопічних досліджень та к. е. н. Ю. М. Халепу за допомогу у визначенні економічної ефективності бактеризації тритикале ярого азоспірилами.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень, викладені в дисертаційній роботі, були представлені на Міжнародній конференції “Основи формування продуктивності сільськогосподарських культур за інтенсивних технологій вирощування” (Умань, 2008), VI та VII Науковій конференції молодих вчених “Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві” (Чернігів, 2009-2010), III, IV та V Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених “Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва” (Київ, 2009, Сколе, 2010, Яремче, 2011), VIII Міжнародній науковій конференції “Молодь та поступ біології” (Львів, 2012), звітних сесіях Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, звітних сесіях інституту рослинництва ім. В. Я. Юр’єва.

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 17 наукових праць, з яких 5 – статті у фахових журналах і збірниках (у тому числі 1 у періодичному виданні України, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 3 – патенти України, 2 – рекомендації виробництву, 7 – тези доповідей у збірках матеріалів міжнародних та вітчизняних конференцій та статті в інших виданнях.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається із вступу, огляду літературних джерел, основної частини, висновків, списку використаної літератури, який включає 236 першоджерел (із них 116 – латиницею). Загальний обсяг роботи становить 169 сторінок, з них 120 сторінок основного тексту. Робота ілюстрована 41 таблицею, 19 рисунками і 5 додатками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі наведено сучасні погляди вітчизняних та зарубіжних авторів щодо асоціативної взаємодії діазотрофів з небобовими культурами. Проаналізовано вплив генотипних особливостей рослин і азотфіксувальних мікроорганізмів на формування і ефективне функціонування асоціативних систем. Обґрунтовано необхідність проведення досліджень за темою дисертаційної роботи.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженнях використовували діазотрофи, виділені з кореневої зони пшениці ярої та тритикале ярого, рослини пшениці ярої (*Triticum aestivum L.*) сортів Харківська 26, Героїня, Рання 93, Скороспілка 99, Етюд, Варяг, Sunnan та тритикале ярого (*Triticale = Triticosecale Wittmack*) сортів Аіст харківський, Соловей харківський, Жаворонок харківський, Коровай харківський, Оберіг харківський, Микола, Лосинівське.

Облік чисельності азотфіксувальних бактерій та їх виділення проводили за загальноприйнятими у ґрунтовій мікробіології методами, а також з використанням прийомів, описаних в оригінальних роботах авторів (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1980; Калининская и др., 1981; Caseras, 1982).

Ідентифікацію виділених культур проводили на основі вивчення морфологічних (електронна мікроскопія), культуральних, фізіолого-біохімічних ознак за визначником Берджі (2005) та з використанням молекулярно-генетичних методів (сиквенс-аналіз послідовності 16S рРНК).

Азотфіксувальну активність мікроорганізмів у чистій культурі і в асоціації з рослинами визначали методом редукції ацетилену (Hardy, 1973) на газовому хроматографі “Chrom-4” з полум’яно-іонізаційним детектором. Колонка довжиною 370 см була заповнена  $\beta$ - $\beta'$ -оксидіпропіонітрилом. Температура термостату 50°C, газ-носіє – азот, витрата газів (в мл/хвилину): водню – 30, азоту – 100, повітря – 500.

Потенційну активність азотфіксації у ризосферному ґрунті та на відмитих коренях рослин ярих пшениці та тритикале вивчали за додавання напіврідкого живильного середовища Доберейнер (Волкогон, 1997).

Внутрішньосортову мінливість тритикале ярого за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію оцінювали за розробленим нами методом (Патент України № 63718).

Визначення вмісту хлорофілів *a* і *b* у листках ярих пшениці і тритикале проводили спектрофотометричним методом (Гродзинский, 1973).

Глутамінсинтетазну активність у тканинах листків рослин пшениці і тритикале оцінювали фосфатним методом (Евстигнеева, 1980)

Вміст водорозчинного білка у листках пшениці і тритикале визначали за методом Лоурі, використовуючи реактив Фоліна (Lowry, 1951).

Вміст азоту, фосфору і калію, білка і сирі клейковини в зерні визначали за допомогою інфрачервоного спектрофотометру ИКС-4250.

Вегетаційні досліді проводили у вегетаційному будиночку на чорноземі вилугуваному неглибокому легкосуглинковому на лесовидних суглинках ( $pH_{\text{сол.}}$  – 5,2; вміст гумусу – 3,01 %; азоту, що легко гідролізується – 109 мг, рухомих форм фосфору ( $P_2O_5$ ) – 168 мг (за Кирсановим); обмінного калію ( $K_2O$ ) – 58 мг (за Кирсановим) на 1 кг ґрунту, а також на дерново-підзолистому пилувато-супіщаному ґрунті ( $pH_{\text{сол.}}$  – 7,2; вміст гумусу – 1,02 %;  $P_2O_5$  – 330 мг/кг (за Кирсановим);  $K_2O$  – 148 мг/кг (за Кирсановим). Повторність дослідів – шестиразова. Вологість ґрунту підтримували на рівні 60 % від повної вологоємності.

Полюві досліді проводили на дослідному полі Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України. Ґрунт – чорнозем вилугуваний неглибокий легкосуглинковий на лесовидних суглинках ( $pH_{\text{сол.}}$  – 5,2; вміст гумусу – 3,01 %; азоту, що легко гідролізується – 109 мг, рухомих форм фосфору ( $P_2O_5$ ) – 168 мг (за Кирсановим); обмінного калію ( $K_2O$ ) – 58 мг (за Кирсановим) на 1 кг ґрунту. Повторність дослідів – чотириразова.

Біометричні показники рослин визначали вимірювально-ваговим методом. Збирання та облік урожаю проводили прямим методом (зважування продукції з облікової ділянки).

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали методами дисперсійного та кореляційного аналізу за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2003 – 2007. Для оцінки достовірності відмінностей між варіантами дослідів вираховували найменшу істотну різницю ( $HP_{05}$ ).

За методичну основу розрахунків економічної ефективності препаратів використовували методики ННЦ “Інститут аграрної економіки” НААН (Ціноутворення та нормативні витрати в сільському господарстві: теорія, методологія, практика, 2008). Під час моделювання витратної частини технологічні операції та витрати ресурсів прийнято за нормативами ННЦ “Інститут аграрної економіки” НААН з відповідним коригуванням операцій (згідно технології) та включенням додаткових прямих і накладних витрат, пов'язаних з бактеризацією насіння.

Визначення оцінки енергетичної ефективності проводили за відповідними методиками (Тараріко, 2001).

### **АЗОТФІКСУВАЛЬНИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІКРОБНО-РОСЛИННИХ СИСТЕМ ЯРИХ ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ РІЗНИХ СОРТІВ**

Для оцінки азотфіксувального потенціалу мікробно-рослинних систем ярих пшениць і тритикале застосовували показник потенційної нітрогеназної активності (ПНА) на відмитих коренях рослин. Відбори проводили у фазу цвітіння як найбільш фізіологічно активний період розвитку рослин. До досліджень було залучено 14 сортів: 7 – пшениці ярої і 7 – тритикале ярого.

Згідно одержаних результатів, потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин досліджуваних сортів пшениці ярої змінювалася у діапазоні від 137 до 1707 (рис. 1), сортів тритикале ярого тритикале ярого – від 249 до 2027 нмоль етилену на 1 г коренів за 1 год (рис. 2). Коефіцієнт варіації



(Vp) зазначеного показника у досліджуваних вибірках сортів пшениці ярої становив 18-56, тритикале ярого – 14-56 % у різні роки досліджень, що свідчить про наявність міжсортової мінливості ярих пшениць і тритикале за піс-ознакою.

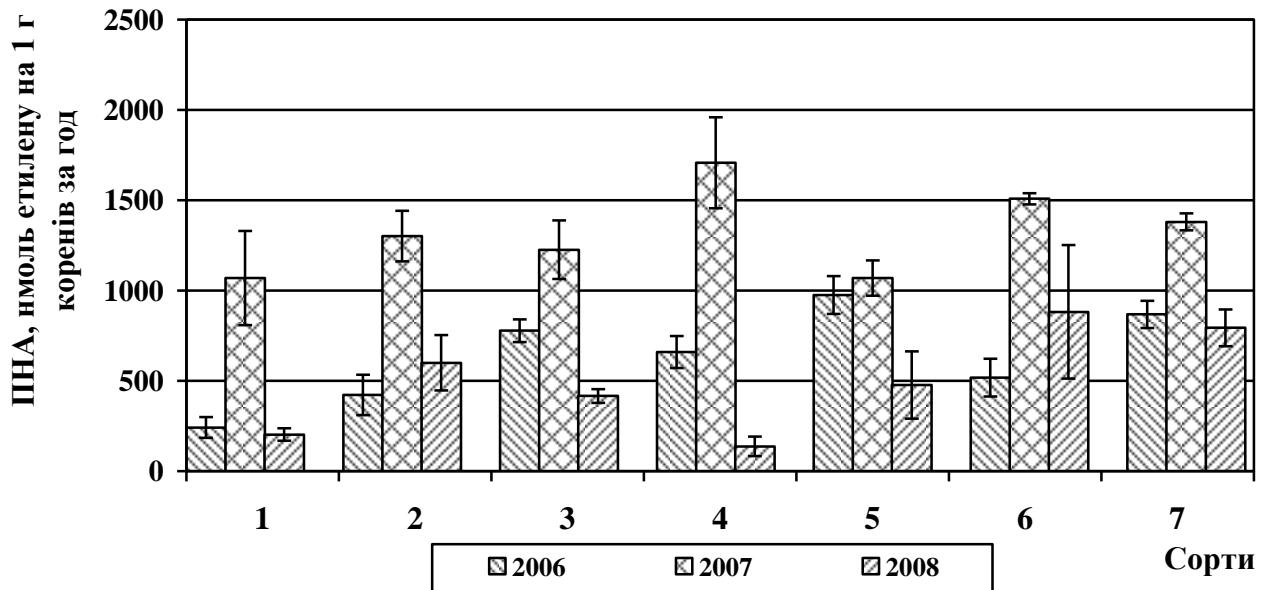


Рис. 1 Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин пшениці ярої різних сортів (фаза цвітіння, польові досліді 2006-2008 рр.):

1 – Харківська 26; 2 – Героїня; 3 – Рання 93; 4 – Sunnan;  
5 – Скороспілка 99; 6 – Етюд; 7 – Варяг.

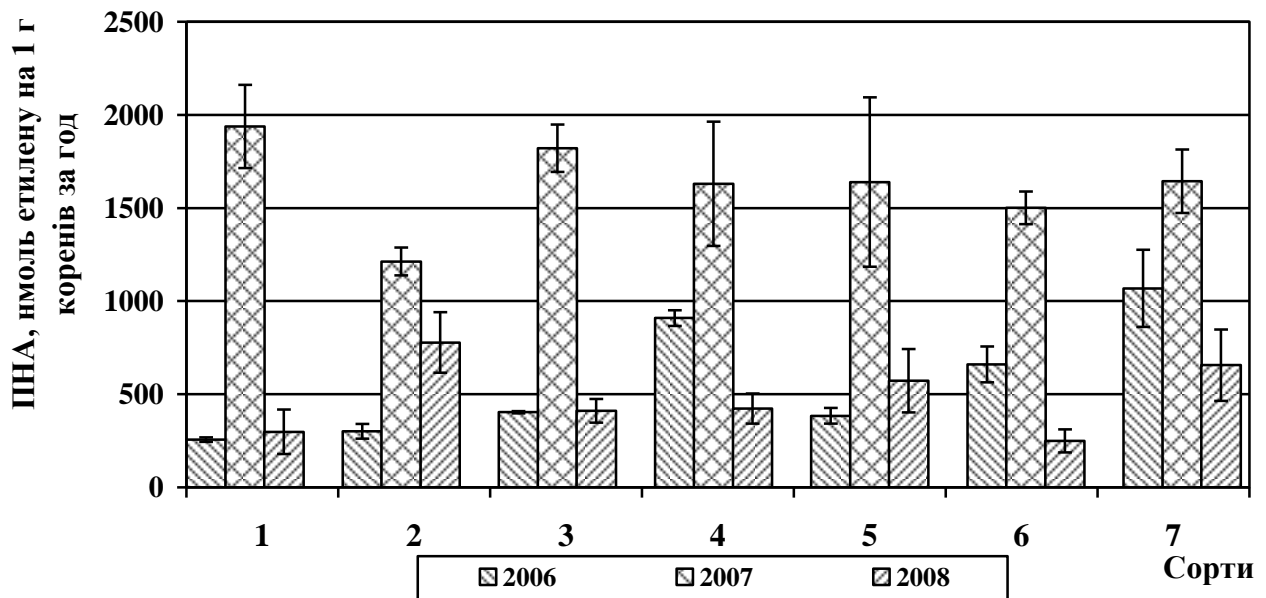


Рис. 2 Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого різних сортів (фаза цвітіння, польові досліді 2006-2008 рр.):

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

Аналіз абіотичних факторів за даними метеоспостережень (травень-червень 2006-2008 років) показав, що найбільш сприятливим для формування

азотфіксувального мікробного угруповання був 2007 рік. Середньомісячна температура повітря у травні на 4,1-4,2, у червні – на 1,7-1,9 °С переважала відповідний показник у 2006 і 2008 роках.

На кінець травня – початок червня 2007 року випало 204-217 % від норми опадів, і забезпечення ґрунту вологою було достатнім. Сприятливий гідротермічний режим ґрунту 2007 року позначився на азотфіксувальній активності у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале, фаза цвітіння яких припадала на кінець травня – початок червня (рис. 1, 2).

Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях ярих пшениць і тритикале корелювала з температурою повітря на рівні 0,83 і 0,91, з температурою у верхньому шарі ґрунту – 0,77 і 0,87, що свідчить про наявність між даними показниками тісного зв'язку. Слід зазначити, що вказана залежність справедлива за підвищення температури ґрунту до 25-30 °С, наступне її підвищення призводить до зниження активності азотфіксації, що пов'язано з температурним оптимумом нітрогеназного ферментного комплексу (Клевенская, 1991). Коефіцієнт кореляції ПНА і середньої кількості опадів становив 0,62, зв'язок характеризувався як помітний.

При більш детальному розгляді багаторічних даних нашу увагу привернули значні флуктуації потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях рослин ярих пшениць (табл. 1) та тритикале (табл. 2) в межах сорту як упродовж вегетаційного періоду (31-83 %), так і під час фази цвітіння у різні роки досліджень (31-97 %), що свідчить про наявність внутрішньосортової мінливості.

Таблиця 1

**Внутрішньосортова мінливість потенційної нітрогеназної активності (ПНА)  
на відмитих коренях рослин ярих пшениць  
(фаза цвітіння, польові дослідження 2006-2008 рр.)**

Сорти	ПНА (середнє за роки досліджень), нмоль етилену на 1 г коренів за год	Vp (коефіцієнт варіації), %	Lim (найбільше і найменше значення), нмоль етилену на 1 г коренів за год
Харківська 26	504±245	97	203...1069
Героїня (Харьковская 34)	775±233	60	422...1302
Рання 93	806±203	50	416...1226
Sunnan	835±232	90	137...1707
Скороспілка 99	840±159	38	477...1069
Етюд	969±250	52	518...1508
Варяг	1014±160	31	794...1380

**Внутрішньосортова мінливість потенційної нітрогеназної активності (ПНА)  
на відмитих коренях рослин ярих тритикале  
(фаза цвітіння, польові досліді 2006-2009 рр.)**

Сорти	ПНА (середнє за роки досліджень), нмоль етилену на 1 г коренів за год	Vp (коефіцієнт варіації), %	Lim (найбільше і найменше значення), нмоль етилену на 1 г коренів за год
Соловей харківський	723±273	76	249...1501
Микола	872±333	76	404...1821
Аїст харківський	900±398	88	256...1938
Коровай харківський	907±235	52	301...1337
Оберіг харківський	1046±217	41	656...1644
Жайворонок харківський	1156±401	69	384...2027
Лосинівське	1214±336	55	423...1894

Детальний аналіз внутрішньосортового поліморфізму тритикале ярого за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію у кореневій зоні рослин проводили за умов вегетаційних дослідів на прикладі двох перспективних сортів тритикале ярого – Коровай харківський та Оберіг харківський (табл. 3).

**Внутрішньосортовий поліморфізм тритикале ярого за здатністю  
підтримувати асоціативну азотфіксацію (вегетаційний дослід)**

Інтервал потенційної нітрогеназної активності, нмоль етилену на рослину за год	Кількість рослин, %	
	сорт Коровай харківський	сорт Оберіг харківський
0-20,0	84	72
20,1-40,0	10	8
40,1-60,0	6	10
60,1-80,0	0	2
80,1-100,0	0	6
100,1-120,0	0	0
120,1-140,0	0	2

Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях переважної більшості зразків в обох випадках знаходилася в інтервалі 0-20,0 нмоль етилену на рослину за годину. При цьому, серед рослин обох досліджуваних сортів були виявлені джерела підвищеної здатності підтримувати асоціативну азотфіксацію. Так, максимальна потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин сорту Коровай харківський сягала діапазону 40,1-60,0, а сорту Оберіг харківський – 120,1-140,0 нмоль етилену на рослину за годину. Отже, сорт Оберіг харківський був більшою мірою насичений генотипами з підвищеною здатністю забезпечувати асоціативну азотфіксацію, ніж сорт Коровай харківський. На основі одержаних даних нами розроблено спосіб оцінки азотфіксувального потенціалу асоціативних систем “діазотрофи – рослина” залежно від сорту зернової культури.

Поряд з вивченням впливу абіотичних чинників на рівень нітрогеназної активності у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале ми проводили пошук ознак, які могли б бути використані як маркерні при оцінці азотфіксувального потенціалу мікробно-рослинних систем сортів досліджуваних культур. Одержані нами результати засвідчили, що між потенційною нітрогеназною активністю на відмитих коренях рослин і такими селекційними ознаками як висота рослини, довжина колосу, маса і кількість зерен в колосі, маса 1000 зерен не спостерігалось кореляцій, тобто вони не можуть бути використані як маркерні. Тенденція до позитивного зв'язку відмічена між рівнем нітрогеназної активності і вмістом загального азоту ( $r=0,35\div 0,37$ ) та білка ( $r=0,38\div 0,42$ ) у зерні тритикале ярого різних сортів. Тенденція до підвищеного вмісту хлорофілів у прапорцевих листках пшениці ярої з високим проявом піс-ознаки ( $r=0,41\div 0,72$ ) свідчить про взаємозалежність процесів азотфіксації і фотосинтезу і узгоджується з літературними даними (Ємцев зі співавт., 1989; Степаненко зі співавт., 1989).

### **СКРИНІНГ ДІАЗОТРОФІВ, ЩО УТВОРЮЮТЬ ЕФЕКТИВНІ АСОЦІАЦІЇ З РОСЛИНАМИ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ТА ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО**

Дослідження складу азотфіксувальних мікробних угруповань кореневої зони пшениці ярої сорту Варяг і тритикале ярого сорту Оберіг харківський, що характеризувалися підвищеною нітрогеназною активністю, було проведене у 2008-2009 рр. за польових умов. Асоціативні діазотрофи кореневої зони культур були представлені бактеріями родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*. Одержані нами результати узгоджуються з літературними даними щодо складу азотфіксувальних мікробних угруповань під такими сільськогосподарськими культурами як жито озиме (Мальцева с соавт., 1992) і пшениця яра (Копилов, 2008).

Наступним етапом нашої роботи була селекція ефективних штамів асоціативних азотфіксаторів з кореневої зони ярих пшениць та тритикале. За умов вегетаційних і польових дослідів з ризосфери та відмитих коренів рослин було виділено чисті культури азотфіксувальних бактерій. Їх здатність засвоювати молекулярний азот, визначена газовохроматографічним методом, коливалася від 0,5 до 172,2 нмоль етилену на 1 мл середовища за добу. Найвищою нітрогеназною активністю в чистій культурі характеризувалися представники роду *Azospirillum* (61,1-172,2 нмоль етилену на 1 мл середовища за добу).

Для дослідження здатності утворювати активні асоціації з рослинами тритикале ярого було відібрано нові штами, що характеризувалися найвищою нітрогеназною активністю у чистій культурі: *Azospirillum sp.* 10/1 (виділений з відмитих коренів тритикале ярого), *Azospirillum sp.* 37, *Azospirillum sp.* 77 (виділені з відмитих коренів пшениці ярої). Відібрані ізоляти порівнювали з активними штамми азоспірил, що зберігаються у Колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів ІСМАВ НААН: *A. brasilense* 18-2 (виділений з ризосфери гречки), *A. brasilense* 54 і *A. brasilense* 61 (виділеними з бульбочкоподібних утворень на коренях шовковиці) (рис. 3).

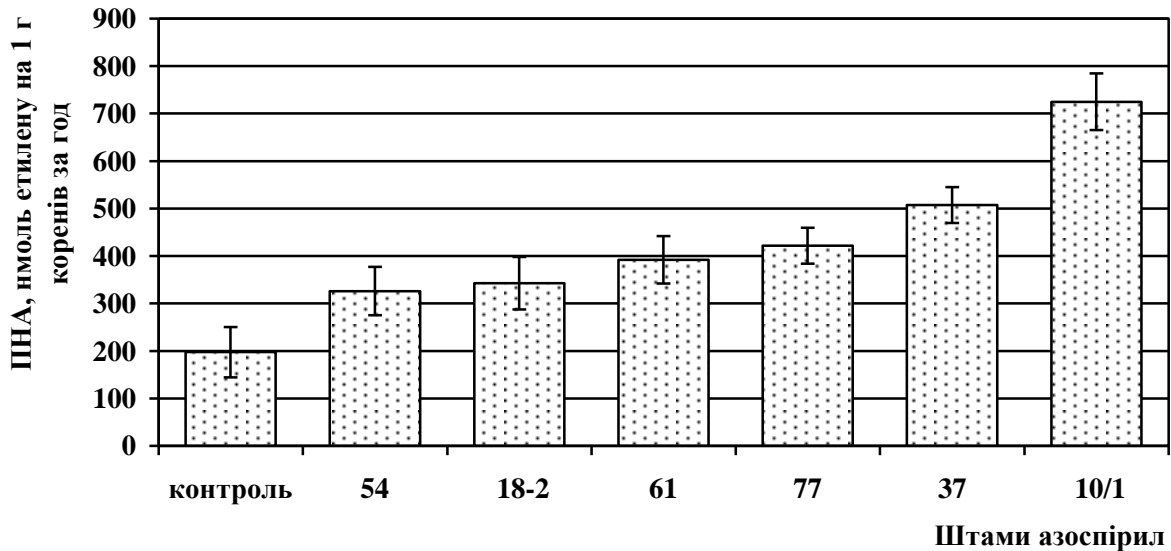


Рис. 3. Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції активними штамми азоспірил (вегетаційний дослід)

Як свідчать одержані дані, всі досліджувані штами азоспірил сприяли підвищенню потенційної нітрогеназної активності на 65-366 % порівняно з варіантом без інокуляції. За використання *Azospirillum sp.* 10/1 вдалося сформуванати найбільш активну асоціативну систему “діазотроф-тритикале яре”.

Крім фіксації молекулярного азоту, відібрані штами перевіряли за допомогою біотестів на здатність до біосинтезу біологічно активних речовин фітогормональної природи. Як показали біотести, штами *Azospirillum sp.* 10/1 та *Azospirillum sp.* 77 відзначалися найбільш активною стимулювальною дією щодо рослин ярих пшениць і тритикале. Ці штами і були відібрані для подальших досліджень.

Відібрані штами характеризуються наступними морфолого-культуральними особливостями. Клітини представляють собою дещо зігнуті палички розміром 1,0-1,2 × 1,8-2,5 мкм (рис. 4). Не утворюють спор. Рухливі, під час руху форма клітин S-подібна. Грамнегативні. Добре ростуть на картопляному агарі з 2,5 % бурштинової кислоти, де за три доби утворюються круглі колонії діаметром 3-5 мм. При старінні колонії набувають перламутрового блиску і накопичують рожевий пігмент, який не дифундує у середовище. За таких умов культивування *Azospirillum sp.* 77 і *Azospirillum sp.* 10/1 не дисоціюють на R і S-форми.

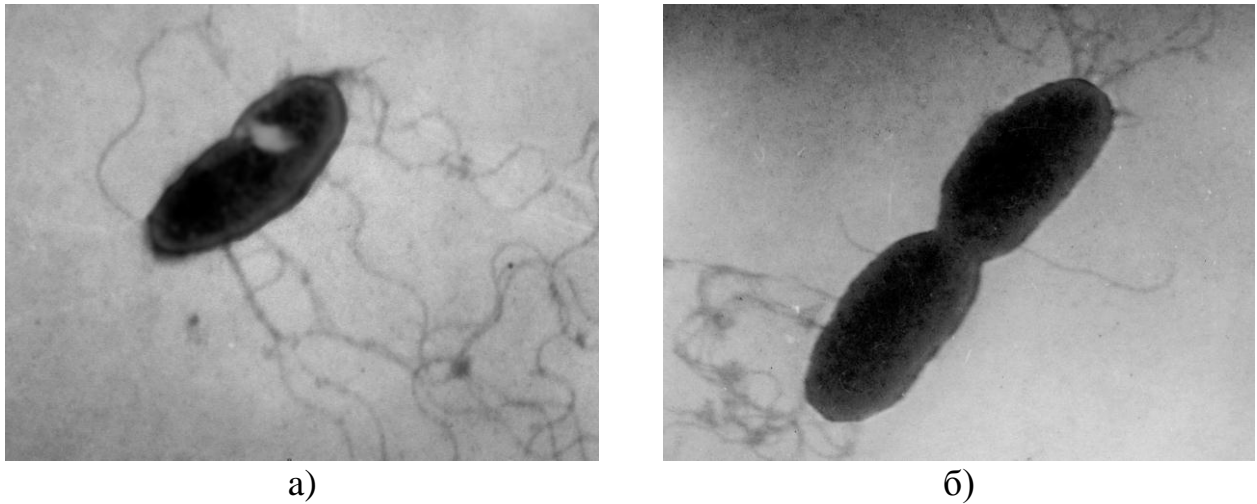


Рис. 4. Електронна мікрофотографія *Azospirillum sp.* 10/1,  $\times 15000$ ;  
забарвлення уранілацетатом

а) клітина *Azospirillum sp.* 10/1 (картопляний агар, 3 доби)

б) поділ клітини *Azospirillum sp.* 10/1

Розвиваються за використання глюкози як єдиного джерела вуглецевого живлення. На агаризованому середовищі Доберейнер утворюють дрібні, складчасті колонії, на середовищі Касераса – дрібні колонії червоного кольору. На безазотному напіврідкому середовищі Доберейнер ростуть у вигляді плівки під поверхнею і активно фіксують азот. Досліджувані штами є аеробами, але краще ростуть за мікроаерофільних умов. Оптимум росту спостерігається при рН 6,8-7,6; температурі  $28^{\circ}$ - $30^{\circ}$ С. Не потребують біотину.

Каталазо-оксидазопозитивні. Не розріджують желатину. Молоко з лакмусом не підлюговують і не підкисляють. Пептонізації молока не спостерігається.

За морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними характеристиками досліджувані штами азоспірил можна віднести до виду *Azospirillum brasilense* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005).

З метою уточнення таксономічного положення *Azospirillum sp.* 10/1 було проведено сиквенс-аналіз гену 16S рРНК зазначеного штаму.

За використання універсальних бактеріальних праймерів одержано продукт ампліфікації розміром  $\sim 1500$  п.н. За порівняльного аналізу нуклеотидної послідовності даного фрагменту з аналогічними послідовностями бактерій *A. brasilense* та *A. lipoferum* із бази даних Gen Bank, виявлено, що досліджуваний штам генетично близький до виду *A. brasilense* (табл. 4). Так, ідентичність послідовності 16S рРНК *Azospirillum sp.* 10/1 з референт-штамами *A. brasilense* була досить високою і становила 99,5-99,6%, в той час як ідентичність з референт-штамами, що належать до виду *A. lipoferum* не перевищувала 96,7%.

**Ідентичність сиквенованого фрагменту 16S рРНК *Azospirillum sp.* 10/1 з сиквенсами референс-штамів *Azospirillum*, що зберігаються в Gen Bank**

Назва виду і номер референс-штаму у нуклеотидній базі GenBank	Довжина фрагменту 16S рРНК, що порівнюється	Ідентичність послідовностей, %
<i>Azospirillum brasilense</i> Gr 66	1362	99,5
<i>A. brasilense</i> Gr 22	1362	99,6
<i>A. brasilense</i> Gr 27	1362	99,6
<i>A. brasilense</i> ISSDS-858	1362	99,6
<i>A. brasilense</i> ISSDS-855	1362	99,6
<i>Azospirillum sp.</i> 7C	1362	98,9
<i>A. lipoferum</i> B22	1251	96,7
<i>A. lipoferum</i> B21	1251	96,7
<i>A. lipoferum</i> 64	1229	96,0
<i>A. lipoferum</i> A5	1229	95,9
<i>A. lipoferum</i> 59B	1206	95,8

Отже, результати морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних та молекулярно-генетичних досліджень дають нам змогу віднести нові досліджувані штами до виду *Azospirillum brasilense*.

Вплив штамів *A. brasilense* 77 і *A. brasilense* 10/1 на потенційну нітрогеназну активність і біосинтетичні процеси в рослинах ярих пшениці і тритикале перевіряли за умов вегетаційних дослідів.

Вивчення потенційної нітрогеназної активності в кореневій зоні рослин пшениці ярої сорту Варяг і тритикале ярого сорту Оберіг харківський показало, що інокуляція насіння новими штамми сприяла її підвищенню як у ризосфері (у 2,3-14,1 раза), так і на відмитих коренях (у 0,4-2,2 раза) досліджуваних культур.

Для пояснення позитивного ефекту від інокуляції зернових культур азоспірилами досліджували глютамінсинтеазну активність і вміст білка у листках рослин за дії діазотрофа. В роботах Окона і Готьє зі співавторами показано чітку кореляцію між активностями нітрогенази і глютамінсинтеази азоспірил (Okon et al., 1976; Gauthier et al., 1977). Рослинна глютамінсинтеаза відіграє провідну роль в асиміляції амонійного азоту за оптимальних умов живлення і розвитку рослин (Дубицький зі співавт., 2006). Вплив бактеризації діазотрофами на активність рослинної глютамінсинтеази залишається мало дослідженим, літературні дані щодо цього питання здебільшого стосуються симбіотичної азотфіксації (Давидова, 2005; Комок, 2012).

Як свідчать одержані нами результати, інокуляція рослин пшениці та тритикале активним штамом *A. brasilense* 77 привела до вірогідного підвищення

глутамінсинтетазної активності тканин листків пшениці ярої на 58,0 %, тритикале ярого – на 71,9 %. Збільшення активності зазначеного ферменту, в свою чергу, вплинуло на синтез білка у листках рослин. Так, за інокуляції азоспірилами вміст білка у листках рослин пшениці та тритикале підвищився відповідно на 9,7 і 16,3 % (табл. 5).

Таблиця 5

**Вплив інокуляції *A. brasilense* 77 на глутамінсинтетазну активність та вміст розчинного білка у листках рослин пшениці ярої та тритикале ярого (вегетаційний дослід)**

Варіанти дослідів		Глутамінсинтетазна активність, мкмоль Р <sub>i</sub> / мг білка / год	Вміст розчинного білка, мг / г
Пшениця яра	Без інокуляції (контроль)	2,42	22,88
	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 77	3,80	25,09
Тритикале яре	Без інокуляції (контроль)	3,49	19,56
	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 77	6,00	22,75
НІР <sub>0,5</sub>		0,57	0,24

За накопиченням рослинами сухої речовини досліджувані штами виявили певну специфічність щодо культур, з кореневої зони яких вони були виділені. Так, штам *A. brasilense* 77 сприяв накопиченню біомаси рослинами пшениці: прибавка надземної маси після висушування становила 8,8 %, маси коренів – 21,0 %. При цьому інокуляція пшениці ярої штамом *A. brasilense* 10/1 не вплинула істотно на зазначені показники. Бактеризація насіння тритикале ярого сприяла збільшенню маси рослин тільки у варіанті з *A. brasilense* 10/1: суха надземна маса підвищувалася на 13,5 %, маса повітряно висушених коренів – на 13,3 %.

**ВПЛИВ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 10/1 НА ВНУТРІШНЬОСОРТОВИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО ЗА ЗДАТНІСТЮ ПІДТРИМУВАТИ АСОЦІАТИВНУ АЗОТФІКСАЦІЮ**

Зважаючи на виявлений нами внутрішньосортівий поліморфізм тритикале ярого за здатністю підтримувати процес фіксації молекулярного азоту, наступним завданням було дослідити вплив активного нового штаму *Azospirillum brasilense* 10/1 на показники варіювання даної ознаки у рослин перспективних сортів Коровай харківський та Оберіг харківський.

Для характеристики варіаційних рядів потенційної нітрогеназної активності на коренях контрольних та інокульованих рослин застосовували такі статистичні показники як середнє ( $\bar{x} \pm S_x$ ), медіана (Me), модальний інтервал (Mo), стандартне відхилення ( $\sigma$ ), коефіцієнт варіації (Vp), найменше і найбільше значення (Lim), коефіцієнти асиметрії (As) та ексцесу (Ex) (табл. 6).



**Показники варіювання потенційної нітрогеназної активності на коренях  
рослин тритикале сортів Коровай харківський і Оберіг харківський за  
інокуляції *Azospirillum brasilense* 10/1**

Статистичні показники	Сорти			
	Коровай харківський		Оберіг харківський	
	Контроль	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 10/1	Контроль	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 10/1
$\bar{x} \pm S_x$ (середнє значення), нмоль етилену на рослину за добу	8,75±2,22	41,55±6,02	19,37±4,39	62,58±5,25
$\sigma$ (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
$V_p \pm m_v$ (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 ексцесу)	4,85	-1,07	3,48	-0,77

На рис. 5 представлено графіки розподілу значень потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале ярого сорту Коровай харківський. Асоціація рослин даного сорту з ґрунтовими діазотрофами характеризується низьким азотфіксувальним потенціалом, адже потенційна нітрогеназна активність на коренях переважної більшості зразків не перевищувала 10 нмоль етилену на одну рослину за добу, розподілу властива лівобічна асиметрія ( $As > 0$ ). При цьому даному сорту притаманна і значна варіабельність за потенційною нітрогеназною активністю на відмитих коренях

рослин (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.

Високі коефіцієнти асиметрії та ексцесу, встановлені для контрольної вибірки, свідчать про різке відхилення розподілу рослин тритикале ярого за піз-ознакою від нормального (табл. 6).

Інокуляція тритикале сорту Коровай харківський штамом *A. brasilense* 10/1 сприяла підвищенню потенційної азотфіксувальної активності в середньому у 4,7 раза. В той же час, коефіцієнт варіації ( $V_p$ ) знизився до 98 %, що характеризує вибірку інокульованих рослин як дещо більш однорідну за потенційною нітрогеназною активністю, ніж у контрольному варіанті (табл. 6).

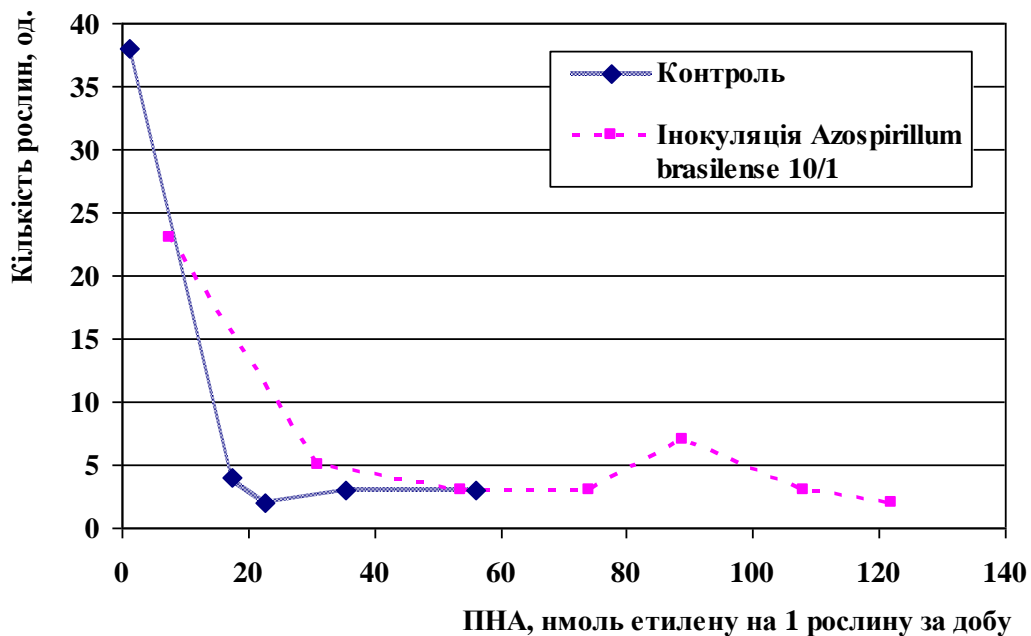


Рис. 5. Розподіл значень потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале ярого сорту Коровай харківський

Вивчення внутрішньосортової мінливості сорту Оберіг харківський за потенційною нітрогеназною активністю на коренях рослин, як і у попередньому випадку, показало, що у вибірці 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 азотфіксувальною активністю на коренях, яка в окремих випадках становила 128 нмоль етилену на одну рослину за добу (рис. 6).

Інокуляція тритикале сорту Оберіг харківський штамом *A. brasilense* 10/1 привела до підвищення потенційної нітрогеназної активності в середньому у 3,2 раза, і, що особливо важливо, сприяла нормалізації розподілу значень азотфіксувальної активності у кореневій зоні рослин (рис. 6). Так, модальний інтервал ( $M_o$ ) змістився від 0-20 до 40-60 нмоль етилену на одну рослину за добу, асиметрія ( $A_s$ ) змінилася від край високої – 1,96 до слабкої – 0,13, від'ємний

коефіцієнт ексцесу ( $E_x$ ) вказує на плосковершинний, більш рівномірний характер розподілу, коефіцієнт варіації ( $V_p$ ) знизився за інокуляції у 2,8 раза (табл. 6).

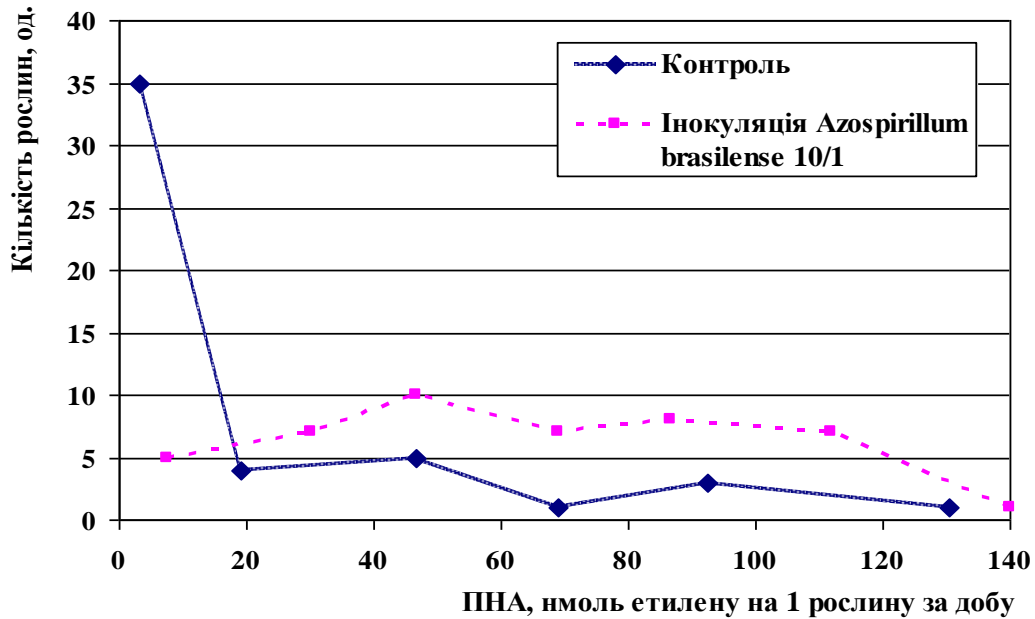


Рис. 6. Розподіл значень потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале ярого сорту Оберіг харківський

Отже, застосування нового штаму *A. brasilense* 10/1 сприяло зниженню варіабельності потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале в межах сорту, підвищенню потенційної нітрогеназної активності в середньому у 3,2-4,7 раза, а також нормалізації розподілу за цією ознакою у вибірках інокульованих рослин.

### **ІНОКУЛЯЦІЯ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО ШТАМОМ *A. BRASILENSE* 10/1 ЯК ЗАСІБ ПІДВИЩЕННЯ УРОЖАЙНОСТІ ТА ЯКОСТІ ОДЕРЖАНОЇ ПРОДУКЦІЇ**

Виробництво зерна в Україні завжди було і залишається важливою і актуальною проблемою. Зернова галузь вимагає таких технологій вирощування зернових культур, які передбачали б енергозбереження матеріальних ресурсів, зниження впливу засобів хімізації на навколишнє середовище, підвищення частки використання природних джерел поживних речовин і, разом з цим, виробництво якісної продукції (Костромітін, Музафаров, 2008). В цьому сенсі заслуговує на увагу порівняно нова в рослинництві культура – тритикале яре (Рябчун зі співавт., 2007).

Для отримання високих врожаїв тритикале визначальне значення має азотне живлення (Городній, 2006).

Інтродукція асоціативних азотфіксаторів у зону коренів дозволяє не тільки покращити азотне живлення рослин за рахунок фіксації атмосферного азоту і підвищення коефіцієнту використання мінерального азоту ґрунту, але і забезпечує різнобічну позитивну дію мікроорганізмів на рослину, а саме – стимуляцію росту і розвитку кореневої системи, бічних коренів та корневих волосків, що

забезпечує покращення поглинання рослинами з ґрунту макро- та мікроелементів, синтез біологічно активних речовин, зокрема, фітогормонів, які на сьогодні розглядаються як посередники у рослинно-мікробних комунікаціях (Коць зі співавт., 2014). Зважаючи на вищезазначене, наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу нового перспективного штаму *A. brasilense* 10/1 на продуктивність тритикале ярого і якість одержаної продукції.

Дослідження потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях рослин тритикале за польових умов показало, що відібраний нами перспективний штам *A. brasilense* 10/1 сприяв підвищенню ПНА від 31 % у 2010 до 260 % у 2012 році. Крім того, за допомогою біотестів було встановлено здатність *A. brasilense* 10/1 продукувати біологічно активні речовини фітогормональної природи. Отже, новий штам *A. brasilense* 10/1 впливав на розвиток рослин тритикале ярого і як діазотроф, і як продуцент рістстимулювальних речовин.

Аналіз результатів багаторічних польових дослідів показав стабільний вірогідний приріст урожайності від передпосівної інокуляції насіння новим перспективним штамом *A. brasilense* 10/1, що в середньому становив 0,5 т/га або 16,4 % до контролю (табл. 7).

Таблиця 7

**Урожайність зерна тритикале ярого за інокуляції насіння активним штамом *A. brasilense* 10/1 (польові дослід, 2009, 2010, 2012 рр.)**

Варіанти дослідів	Урожайність, т/га				Приріст до контролю, %
	2009 р.	2010 р.	2012 р.	Середнє	
Без інокуляції (контроль)	3,85	2,59	2,77	3,07	-
Інокуляція <i>A. brasilense</i> 10/1	4,35	3,20	3,17	3,57	16,4
НІР <sub>05</sub>	0,28	0,17	0,16	-	-

Одночасно з підвищенням урожайності тритикале передпосівна бактеризація насіння *A. brasilense* 10/1 позитивно вплинула на якість одержаного урожаю (табл. 8).

Таблиця 8

**Якість зерна тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції насіння активним штамом *A. brasilense* 10/1 (польовий дослід, 2009 р.)**

Варіанти дослідів	Вміст білка, %	Вміст сирової клейковини, %	Індекс деформації клейковини (ІДК)	Натурна маса зерна, г/л
Без інокуляції (контроль)	12,35±0,37	29,00±0,87	61,48±0,50	678,16±20,34
Інокуляція <i>A. brasilense</i> 10/1	14,06±0,42	35,17±1,05	80,09±0,52	735,54±22,05

Оскільки сорти тритикале ярого, внесені до Державного реєстру України, є придатними для хлібопекарських цілей, технологічне забезпечення їх вирощування має бути спрямованим на отримання зерна з високим вмістом білка та клейковини. За інокуляції тритикале ярого сорту Оберіг харківський новим перспективним штамом *A. brasilense* 10/1 вміст білка у зерні зростав від 12,35 до 14,06 %, сирій клейковини – від 29,00 до 35,17 %, якість клейковини покращилася на 19 одиниць ІДК (за шкалою вимірювання деформації клейковини), натурна маса зерна збільшилася на 7,3 %.

### **ЕКОНОМІЧНА ТА ЕНЕРГЕТИЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ БАКТЕРИЗАЦІЇ НАСІННЯ *A. BRASILENSE* 10/1 ПРИ ВИРОЩУВАННІ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО**

Як свідчать одержані результати, урожайність тритикале за інокуляції *A. brasilense* 10/1 підвищилася на 16,4 %, у той час як витрати із розрахунку на 1 га збільшилися на 4,8 %. Завдяки цьому помітно зменшилася собівартість 1 т зерна – на 160,38 грн. або 9,8 %. У поєднанні з відповідним до підвищення урожайності зростанням виручки від реалізації продукції із розрахунку на 1 га наведені фактори забезпечили збільшення прибутку на 37,7 %. Розмір додаткового прибутку склав 1008 грн./га. При цьому рівень рентабельності виробництва збільшився на 16,8 в. п. В цілому отримано 4,16 грн. додаткового прибутку на кожен гривню додаткових витрат технології з бактеризацією насіння.

Бактеризація забезпечила істотне зростання енерговмісту урожаю тритикале ярого завдяки підвищенню виходу продукції (за зерном і за соломом – на 16,3 %) при незначному підвищенні енергоємності виробництва (на 3,9 %). У результаті коефіцієнт енергетичної ефективності за господарсько-цінною частиною урожаю (зерном) підвищився з 6,8 до 7,4 МДж/га, а за сукупним енерговмістом усієї продукції – із 16,6 до 18,5 МДж/га. При цьому коефіцієнт енергетичної ефективності додаткових витрат енергії, пов'язаних з бактеризацією (відношення енерговмісту додаткової продукції до додаткової енергоємності виробництва), становив 67,9. Енергетична ефективність за інокуляції тритикале ярого *A. brasilense* 10/1 підвищилася на 22873 МДж / га (17,1 %).

### **ВИСНОВКИ**

Багаторічні дослідження асоціативної азотфіксації у кореневій зоні різних сортів ярих пшениці та тритикале засвідчили існування як міжсорткової, так і внутрішньосорткової мінливості зазначених культур щодо здатності утворювати з діазотрофами ефективні асоціації. Показано, що селекцію нових перспективних штамів азотфіксувальних бактерій необхідно проводити з урахуванням особливостей генотипу рослин, використовуючи сорти з високим рівнем нітрогеназної активності в їх кореневій зоні. Інокуляція насіння такими штамми дає змогу знизити внутрішньосорткову варіабельність піс-ознаки і є одним з шляхів підвищення азотфіксувального потенціалу мікробно-рослинних систем “діазотроф–зернова культура”.

1. Досліджено міжсорткову мінливість ярих пшениць та тритикале за піс-ознакою. Показано, що спектр мінливості сортів пшениці ярої становив від 137 до 1707, тритикале ярого – від 249 до 1938 нмоль етилену на 1 г коренів за 1 годину.

2. Перспективні вітчизняні сорти тритикале ярого характеризуються значним внутрішньосортним поліморфізмом за здатністю підтримувати процес асоціативної азотфіксації. Насиченість сорту генотипами з високим рівнем нітрогеназної активності у кореневій зоні рослин, обумовлює високий азотфіксувальний потенціал мікробно-рослинних асоціацій. Розроблено спосіб його оцінки.

3. Показано, що у кореневій зоні ярих пшениці та тритикале створюються сприятливі умови для розвитку азотфіксувальних бактерій родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*. Виділено 83 чисті культури діазотрофів, найбільш активними серед яких є представники роду *Azospirillum*.

4. Методами аналітичної селекції одержано нові ефективні штами азоспірил (*A. brasilense* 77 – для інокуляції пшениці ярої, *A. brasilense* 10/1 – тритикале ярого). Бактеризація активними штамми позитивно позначалася на біосинтетичних процесах рослин: глутамінсинтезна активність у листках підвищувалася на 58,0-71,9 %, вміст розчинного білка – на 9,7-16,3 %, надземна маса рослин пшениці та тритикале збільшувалася на 8,8-13,5 %.

5. Показано, що застосування активного штаму *A. brasilense* 10/1 сприяло зниженню внутрішньосортової варіабельності азотфіксувальної активності на коренях тритикале ярого та нормалізації розподілу за піс-ознакою у вибірках інокульованих рослин.

6. За результатами трирічних польових дослідів показано, що бактеризація тритикале новим штамом *A. brasilense* 10/1 сприяла підвищенню урожайності культури на 12,9-23,6 %, поліпшенню якості одержаної продукції (натурна маса зерна підвищувалася на 7,3 %, вміст білка – на 1,3 в. п., сирої клейковини – на 6,2 в. п.).

7. Інокуляція насіння азотфіксувальними бактеріями *A. brasilense* 10/1 є економічно та енергетично доцільним заходом при вирощуванні тритикале ярого, що дає змогу отримати додатковий прибуток у розмірі 1008 грн./га, підвищити рівень рентабельності на 16,8 в. п., сукупний енерговміст урожаю – на 16,4 %, енергетичну ефективність – на 22873 МДж / га.

### РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

На основі результатів багаторічних польових і виробничих дослідів сільськогосподарському виробництву рекомендується використовувати новий ефективний штам *Azospirillum brasilense* 10/1 (Патент України № 104212) як біоагент мікробного препарату для передпосівної інокуляції тритикале ярого. Бактеризація новим штамом активізує процес фіксації біологічного азоту в кореневій зоні рослин, забезпечує прибавку урожайності культури від 12,9 до 23,6 % залежно від року досліджень, сприяє поліпшенню якості зернової продукції (збільшення вмісту білка у зерні на 1,3 в. п., сирої клейковини – на 6,2 в. п.).

## СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України і у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз даних:

1. Міжсортова мінливість ярої пшениці за здатністю до асоціативної азотфіксації / Ю. О. Гончар, О. В. Надкернична, **О. О. Шаховніна** та ін. // Основи формування продуктивності сільськогосподарських культур за інтенсивних технологій вирощування: Зб. наук. праць УДАУ. – Київ, 2008 – С. 181–186. (*Визначення потенційної нітрогеназної активності у кореневій зоні ярих пшениць, вмісту хлорофілів у листках, узагальнення результатів, написання статті*).
2. Створення ефективних асоціацій “пшениця яра – діазотрофи роду *Azospirillum*” / О. В. Надкернична, Ю. О. Воробей, **О. О. Шаховніна** та ін. // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2009. – Вип. 8. – С. 71–80. (*Визначення потенційної нітрогеназної активності у кореневій зоні ярих пшениць, нітрогеназної активності чистих культур діазотрофів, вмісту хлорофілів у листках, написання статті*).
3. Вплив бактерій роду *Azospirillum* на потенційну нітрогеназну активність і біосинтетичні процеси в рослинах пшениці ярої та тритикале ярого / **О. О. Шаховніна**, О. В. Надкернична, Ю. О. Воробей, В. В. Кривопиша // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2009. – Вип. 9. – С. 138–146. (*Визначення потенційної нітрогеназної активності у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале, глутамінсинтезної активності і вмісту білка у листках рослин, узагальнення результатів, написання статті*).
4. Шаховніна О. О. Фіксація молекулярного азоту у кореневій зоні перспективних вітчизняних сортів тритикале ярого / О. О. Шаховніна // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2010. – Вип. 12. – С. 181–192.
5. Патица В. П. Вплив *Azospirillum brasilense* 10/1 на асоціативну азотфіксацію і внутрішньосортний поліморфізм тритикале ярого / В. П. Патица, О. В. Надкернична, **О. О. Шаховніна** // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т. 77. – № 5. – С. 29–36. (*Обчислення показників варіації потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале, побудова полігонів розподілу значень потенційної нітрогеназної активності, оцінка внутрішньосортного поліморфізму тритикале ярого, узагальнення результатів, написання статті*).

### Патенти:

6. Пат. № 63718 Україна МПК (2011.01)C01В 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 азотфіксувального потенціалу сортів зернових культур / Надкернична О. В., Рябчун В. К., **Шаховніна О. О.**, Богуславський Р. Л., Міненок С. М., Леонов О. Ю.; заявник і патентовласник Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва УААН. – № у 2010 13996; заявл. 24.11.2010; опубл. 25.10.2011,

Бюл. № 20. (Аналіз літературних джерел, одержання експериментальних даних, написання патенту).

7. Пат. № 104212 С2 Україна МПК С12N 1/20 (2006.01) С12R (2006.01) С05F11/08 (2006.01). Штам бактерій *Azospirillum brasilense* для інокуляції насіння тритикале ярого / Надкернична О. В., **Шаховніна О. О.**, Ушакова М. А.; заявник і патентовласник Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України. – № а 2012 03817; заявл. 29.03.2012; опубл. 10.01.2014, Бюл. № 1. (Аналіз літературних джерел, одержання експериментальних даних, написання патенту)

8. Пат. № 105118 Україна МПК С12N 1/20 (2006.01). Штам активних азотфіксувальних бактерій *Azospirillum brasilense* для інокуляції насіння пшениці ярої / Надкернична О. В., Воробей Ю. О., **Шаховніна О. О.**, Ушакова М. А.; заявник і патентовласник Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України. – № u 2015 07326; заявл. 21.07.2015; опубл. 10.03.2016, Бюл. № 5. (Одержання експериментальних даних, використаних при написанні патенту).

#### **Статті в інших виданнях, матеріали наукових конференцій:**

9. **Шаховніна О. О.** Азотфіксувальний потенціал різних сортів ярих пшениць та тритикале / **О. О. Шаховніна**, Ю. О. Воробей // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: Матеріали VI наукової конференції молодих вчених (м. Чернігів, 29–30 вересня 2009 р.). – 2009. – С. 80–83. (Визначення потенційної нітрогеназної активності у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале, вмісту хлорофілів, вмісту білка, глутамінсинтезної активності у листках рослин, узагальнення результатів, написання тез).

10. Шаховніна О. О. Міжсортובה мінливість ярих пшениць та тритикале за здатністю до асоціативної азотфіксації / О. О. Шаховніна // Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва: Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених (м. Київ, 22–25 вересня 2009 р.). – 2009. – С. 67–68.

11. Шаховніна О. О. Міжсортובה мінливість ярих тритикале за здатністю до асоціативної азотфіксації / О. О. Шаховніна // Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва: Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених (м. Сколе, 1–4 червня 2010 р.). – 2010. – С. 78–79.

12. Шаховніна О. О. Особливості формування асоціативної системи діазотрофи – рослини тритикале ярого / О. О. Шаховніна // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: Матеріали VII наукової конференції молодих вчених (м. Чернігів, 21–24 вересня 2010 р.). – 2010. – С. 51–54.

13. Шаховніна О. О. Бактерії роду *Azospirillum* як чинник підвищення урожайності тритикале ярого / О. О. Шаховніна // Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва: Матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених (м. Яремче, 21–24 червня 2011 р.). – 2011. – С. 38–39.



14. Шаховніна О. О. Асоціативна азотфіксація у кореневій зоні перспективних вітчизняних сортів тритикале ярого / О. О. Шаховніна // Молодь і поступ біології : збірник тез VIII Міжнародної конференції студентів та аспірантів (м. Львів, 3–6 квітня 2012 р.). – 2012. – Т. 1. – С. 181–183.

15. Надкернична О. В. Новий штам азотфіксувальних бактерій, здатних сприяти підвищенню урожайності та якості зерна тритикале ярого / О. В. Надкернична, **О. О. Шаховніна** // Аграрна наука виробництву. – 2014. – № 1. – С. 9. (Одержання експериментальних даних, використаних при написанні статті).

### Методичні рекомендації

16. Мікробні препарати в сучасних аграрних технологіях (науково-практичні рекомендації) / [Волкогон В. В., Заришняк А. С., Пилипенко Л. А. та ін.]. – Київ, 2015. – 248 с.

17. Наукові основи створення штучних симбіозів діазотрофів зі злаковими і бобовими культурами: методичні рекомендації / [В. В. Волкогон, О. В. Надкернична, Д. В. Крутило та ін.] – Чернігів: ІСМАВ НААН, 2015. – 58 с.

### АНОТАЦІЯ

**Шаховніна О. О. Асоціативна азотфіксація і діазотрофи кореневої зони пшениці ярої та тритикале ярого. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, Чернігів, 2017.

Дисертація присвячена дослідженню азотфіксувального потенціалу асоціацій різних сортів ярих пшениці та тритикале з діазотрофами кореневої зони і шляхів його підвищення.

Встановлено, що перспективні вітчизняні сорти тритикале ярого характеризуються значним внутрішньосортним поліморфізмом за здатністю підтримувати процес асоціативної азотфіксації. Насиченість сорту генотипами з високим рівнем нітрогеназної активності у кореневій зоні рослин, обумовлює високий азотфіксувальний потенціал мікробно-рослинних асоціацій. Розроблено спосіб його оцінки.

Методами аналітичної селекції одержано нові ефективні штами асоціативних діазотрофів: *A. brasilense* 77 – для інокуляції пшениці ярої, *A. brasilense* 10/1 – тритикале ярого, використання яких сприяло активізації процесу фіксації молекулярного азоту в кореневій зоні та позитивно позначалося на біосинтетичних процесах рослин, підвищуючи продуктивність культур.

Показано, що застосування активного штаму *A. brasilense* 10/1 сприяло зниженню варіабельності потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале в межах сорту та нормалізації розподілу за цією ознакою у вибірках інокульованих рослин.

**Ключові слова:** асоціативна азотфіксація, діазотрофи, *Azospirillum brasilense*, азотфіксувальний потенціал рослинно-мікробних асоціацій, тритикале яре.

## АННОТАЦИЯ

**Шаховнина Е. А. Ассоциативная азотфиксация и diaзотрофы корневой зоны пшеницы яровой и тритикале ярового. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание учёной степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, Чернигов, 2017.

Диссертация посвящена исследованию азотфиксирующего потенциала ассоциаций различных сортов яровых пшеницы и тритикале с diaзотрофами корневой зоны и путей его повышения.

Показано существование межсортовой изменчивости яровых пшеницы и тритикале по способности поддерживать ассоциативную азотфиксацию. Спектр изменчивости сортов пшеницы яровой составляет от 137 до 1707, тритикале ярового – от 249 до 2027 нмоль этилена на 1 г корней за 1 час.

Установлено, что перспективные отечественные сорта тритикале ярового характеризуются значительным внутрисортовым полиморфизмом по способности поддерживать процесс ассоциативной азотфиксации.

Разработан способ оценки азотфиксирующего потенциала ассоциативных систем “diaзотрофы – растение” в зависимости от сорта зерновой культуры, который позволяет не только отобрать сорта с повышенным уровнем азотфиксирующей активности в корневой зоне растений, но и охарактеризовать гомогенность сорта по *nis*-признаку.

Показано, что в корневой зоне яровых пшеницы и тритикале создаются благоприятные условия для развития азотфиксирующих бактерий родов *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*. Наиболее активными среди них являются представители рода *Azospirillum*.

Методами аналитической селекции получены новые активные штаммы ассоциативных diaзотрофов: *A. brasilense* 77 – для инокуляции пшеницы яровой, *A. brasilense* 10/1 – тритикале ярового. Бактеризация новыми штаммами способствовала активизации процесса фиксации молекулярного азота в корневой зоне, а также положительно влияла на биосинтетические процессы растений: глутаминсинтетазная активность в листьях повышалась на 58,0-71,9 %, содержание растворимого белка – на 9,7-16,3 %, надземная масса растений пшеницы и тритикале увеличивалась на 8,8-13,5 %.

Результаты полевых и вегетационных опытов свидетельствуют о том, что селекцию новых эффективных штаммов diaзотрофов необходимо проводить с учётом особенностей генотипа растений, используя сорта с высоким уровнем нитрогеназной активности в их корневой зоне.

Показано, что применение активного штамма *A. brasilense* 10/1 способствовало снижению вариабельности потенциальной нитрогеназной активности на корнях растений тритикале ярового в пределах сорта в 0,8-2,8 раза и нормализации распределения по данному признаку в выборках инокулированных растений.

Штамм *A. brasilense* 10/1 рекомендован сельскохозяйственному производству как биоагент микробного препарата для предпосевной инокуляции

тритикале ярового. Бактеризация тритикале новым штаммом способствовала увеличению урожайности зерна на 12,9-23,6 %, улучшению качества полученной продукции (натурная масса зерна повысилась на 7,3 %, содержание белка – на 1,3 п. п., сырой клейковины – на 6,2 п. п.).

Оценена экономическая и энергетическая эффективность использования нового штамма *A. brasilense* 10/1 при выращивании тритикале ярового. Прибыль от инокуляции составила 1008 грн. / га, уровень рентабельности повысился на 16,8 п. п., энергетическая эффективность – на 22873 МДж / га.

**Ключевые слова:** ассоциативная азотфиксация, diazotрофы, *Azospirillum brasilense*, азотфиксирующий потенциал растительно-микробных ассоциаций, пшеница яровая, тритикале яровое.

## SUMMARY

**Shakhovkina O. O. Associative nitrogen fixation and diazotrophs of root zone of spring wheat and spring triticale. – Manuscript.**

Thesis submitted for the degree of Candidate of Agricultural Sciences by specialty 03.00.07 – microbiology. – Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture NAAS, Chernihiv, Ukraine, 2017.

The thesis is devoted to research the nitrogen-fixing potential of links between different spring wheat and spring triticale cultivars with root zone diazotrophs and approaches of their improvement.

It was established that perspective domestic spring triticale cultivars are branded by considerable intracultivar polymorphism to support associative nitrogen fixation process. The cultivar saturation by genotypes with large level of nitrogen-fixing activity causes high nitrogen-fixing plant-microbe association potential. The method for its estimation was designed.

The effective strains were obtained by analytical selection methods: *A. brasilense* 77 – for spring wheat inoculation, *A. brasilense* 10/1 – for spring triticale inoculation. Presowing treatment with the new strains promoted the activation of molecular nitrogen fixing process in root zone and positively affected on plants' biosynthetic processes, getting high crops productivity.

It was shown that the application of the active strain *A. brasilense* 10/1 promoted for declining the variability of potential nitrogenase activity on plants' roots within the cultivar and normalization the dispersal by this sign among inoculated plants selections.

**Key words:** associative nitrogen fixation, diazotrophs, *Azospirillum brasilense*, nitrogen-fixing potential of plant-microbe associations, spring wheat, spring triticale.