

**Е.П. Копылов**

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,  
ул. Шевченко, 97, Чернигов, Украина, 14027

## **СЕЛЕКЦИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ ДИАЗОТРОФОВ ДЛЯ ИНОКУЛЯЦИИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ**

*Методами аналитической селекции получен эффективный штамм бактерий рода *Azospirillum*, который способен приживаться и активизировать процесс ассоциативной азотфиксации в корневой зоне яровой пшеницы, положительно влиять на фотосинтетический аппарат растений. При этом улучшается рост и развитие растений, повышается их стойкость к возбудителям корневых гнилей, увеличивается урожайность яровой пшеницы.*

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** *Azospirillum*, яровая пшеница, селекция, ассоциативная азотфиксация, корневые гнили, хлорофиллы *a* и *b*.

Для ризосферы и ризопланы сельскохозяйственных культур характерно большое разнообразие diazotрофов, которые участвуют в образовании микробно-растительных ассоциаций. Функции ассоциативных азотфиксирующих бактерий при их взаимодействии с растениями разнообразны, это фиксация атмосферного азота, синтез биологически активных соединений, которые стимулируют рост и развитие растений, повышение устойчивости растений к действию фитопатогенных организмов.

Из литературы известно, что в мире методами аналитической селекции получено большое количество diazotрофов, штаммы которых более чем в 50 раз отличаются между собой по эффективности и активности азотфиксации [1]. Это свидетельствует о перспективности поиска природных азотфиксирующих бактерий, которые можно использовать для повышения урожайности сельскохозяйственных культур, улучшения качества получаемой продукции, при сохранении окружающей среды от загрязнения химическими соединениями.

Целью данной работы было получить с помощью методов аналитической селекции эффективные штаммы diazotрофов, которые бы характеризовались высокой активностью фиксации азота в чистой культуре, приживались и активизировали процесс ассоциативной азотфиксации в корневой зоне яровой пшеницы, продуцировали биологически активные вещества, повышали устойчивость растений к возбудителям болезней и способствовали увеличению урожайности яровой пшеницы.

### **Материалы и методы**

Учет численности diazotрофов осуществляли методом предельных разведений с использованием ацетиленового теста в ризосферной почве, на



отмытых корнях яровой пшеницы и в корнях после их стерилизации. Выделение активных diaзотрофов осуществляли из накопительных культур после определения их нитрогеназной активности [2]. С этой целью использовали слабоагаризованные среды Доберейнер, Эшби, Федорова-Калининской, полужидкая консистенция которых дает возможность микроорганизмам развиваться в оптимальном для них режиме парциального давления кислорода. Аэробы при этом образуют пленку на поверхности среды, микроаэрофилы — погруженную в среду пленку, анаэробы могут развиваться на дне. Накопительные культуры рассевали на твердые питательные среды: картофельный агар с сахарозой, среду Кассероса, агаризованную среду с глицерином.

Эффективным оказалось использование пластин с  $\text{SiO}_2$ , пропитанных средой Виноградского без глюкозы [3]. На пластины с  $\text{SiO}_2$  раскладывали корни растений или ризосферную почву. Использование в этом случае безазотной среды Виноградского обеспечивает условия для развития группы бактерий, которые способны покрывать свои потребности в азоте за счет фиксации атмосферного азота. В дальнейшем проводили выделение микроорганизмов из колоний, которые образовались на корнях или комочках почвы.

Азотфиксирующую активность микроорганизмов в чистой культуре и в ассоциации с растениями определяли ацетилен-этиленовым методом на газовом хроматографе «Chrom-4» с пламенноионизационным детектором. Колонка длиной 370 см была заполнена хромосорбом з в-в'-оксидипропионитрилом. Температура термостата 50 °С, газ-носитель — азот, расход газов (в мл/мин): водорода — 30, азота — 100, воздуха — 500.

Приживаемость азоспирилл в корневой зоне растений яровой пшеницы изучали в условиях вегетационного опыта резистентным методом с использованием мутантов, устойчивых к высоким дозам стрептомицина (1000 мкг/мл) [4].

Эффективность полученных штаммов diaзотрофов проверялась в полевых опытах с яровой пшеницей сорта Ранняя 93 в течение 2002 - 2004 гг. на черноземе выщелоченном легкосуглинистом, который характеризовался следующими агрохимическими показателями: содержание гумуса в пахотном горизонте — 3,6 %, подвижных форм фосфора (по Кирсанову) — 210 - 240 мг  $\text{P}_2\text{O}_5$ , обменного калия (по Кирсанову) — 160 - 170 мг  $\text{K}_2\text{O}$  на 1 кг почвы, pH 6,5. Площадь учетной делянки — 10 м<sup>2</sup>, повторность опытов — 4-х кратная. Норма высева семян составляла 5 млн. зерен на 1 га. Схема опытов: 1 — без инокуляции (контроль), 2 — инокуляция семян *Agrobacterium radiobacter* 204 (положительный контроль), 3 — инокуляция семян испытуемым штаммом. Яровую пшеницу выращивали без внесения удобрений.

Содержание хлорофиллов в листьях растений определяли спектрофотометрическим методом [5].

Распространение и развитие корневых гнилей яровой пшеницы определяли, используя балловую оценку по шкале и соответствующую формулу [6,7]. Количество пораженных растений, выраженное в процентах, характеризовало распространение болезни, а интенсивность поражения — её развитие.

### Результаты и их обсуждение

Всего из корневой зоны яровой пшеницы было выделено 288 чистых культур diaзотрофов, из них 60 культур (20,8 %) обладали активностью азотфиксации, которая превышала 0,3 мкг азота на 1 мл питательной сре-



ды. Выделенные активные культуры diaзотрофов относились к родам *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* и представляли интерес как потенциальные инокулянты яровой пшеницы. Наиболее высокой способностью фиксировать атмосферный азот характеризовались бактерии рода *Azospirillum*. Их нитрогеназная активность составляла от 3,5 до 12,6 мкг азота на 1 мл питательной среды. Все выделенные штаммы азоспирилл проверялись в серии вегетационных опытов с яровой пшеницей, где изучалась их приживаемость и способность вступать в ассоциации с растениями, повышая активность процесса фиксации атмосферного азота в корневой зоне. В результате проведенной работы был отобран наиболее эффективный штамм *Azospirillum sp.*

Для изучения способности отобранного штамма приживаться в ризосферной почве, ризоплане и гистосфере яровой пшеницы был получен стрептомицинустойчивый мутант, который не отличался от исходного штамма по культурально-морфологическим и физиологическим признакам. Не изменилась также нитрогеназная активность мутанта и способность положительно влиять на рост и развитие растений.

Динамику численности мутанта, интродуцированного в корневую зону яровой пшеницы, изучали в ризосферной почве, на отмытых корнях и в гистосфере растений в условиях вегетационного опыта (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что интродуцированные азоспириллы способны приживаться не только в ризосферной почве и на корнях, а и проникают во внутренние ткани растений яровой пшеницы. В ризосферной почве наблюдалось незначительное снижение и дальнейшая стабилизация численности внесенного мутанта. Более активно азоспириллы приживались на корнях яровой пшеницы. Численность мутанта во внутренних тканях корней культуры была значительно меньше, и составляла  $10^2$  бактериальных клеток в 1 г корней. Тем не менее такая локализация азоспирилл дает им определенные преимущества по сравнению с ризосферными микроорганизмами в плане доступа к питательным веществам и отсутствия конкуренции с аборигенной микрофлорой. Кроме того, локализация азоспирилл внутри растительных тканей позволяет им сохраняться и постоянно пополнять ризосферную популяцию.

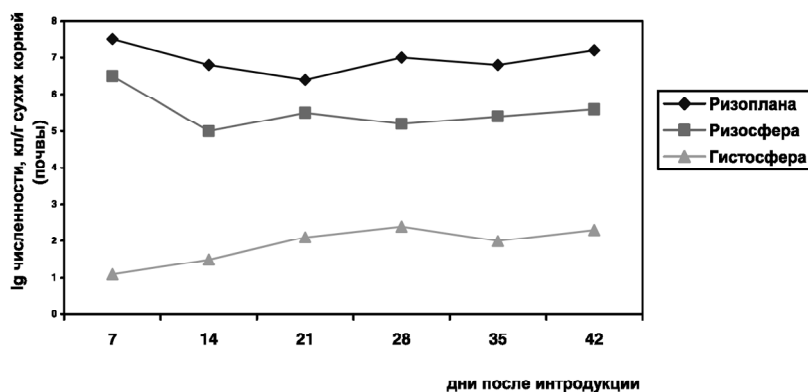


Рис. 1. Колонизация корневой сферы яровой пшеницы *Azospirillum sp.*<sup>str</sup>

Аналогичные результаты были получены и в полевом опыте. Количество бактериальных клеток стрептомицинустойчивого мутанта в ризоплане яровой пшеницы в фазу цветения на порядок превосходило аналогич-

ный показатель в ризосфере и составляло  $36 \times 10^6$ . В гистосфере насчитывалось  $10^2$  клеток азоспирилл в 1 г корней (табл. 1).

Таблица 1

**Колонизация различных корневых сфер яровой пшеницы штаммом *Azospirillum sp.*<sup>str</sup> (полевой опыт, фаза развития растений - цветение)**

Варианты опыта	Количество бактериальных клеток, тыс/г сухих корней (почвы)
Ризосферная почва	$3,4 \times 10^3 \pm 0,37 \times 10^3$
Отмытые корни	$36,0 \times 10^3 \pm 3,4 \times 10^3$
Гистосфера	$0,12 \pm 0,011$

Характер действия отобранного штамма на растения яровой пшеницы сорта Ранняя 93 проверялся в условиях полевого опыта на черноземе выщелоченном. В качестве позитивного контроля использовали *Agrobacterium radiobacter* 204 — биоагент препарата диазофита, рекомендованного для инокуляции яровой и озимой пшеницы, который был получен нами из коллекции полезных почвенных микроорганизмов Института сельскохозяйственной микробиологии. Результаты проведенных исследований показали, что инокуляция семян яровой пшеницы азоспириллами способствует активизации процесса азотфиксации в корневой зоне культуры и увеличению содержания хлорофиллов *a* и *b* в листьях растений. Известно, что между интенсивностью процесса фотосинтеза и активностью азотфиксации в корневой зоне растений имеют место корреляционные связи [8]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что интродукция азоспирилл в корневую зону яровой пшеницы обеспечила увеличение концентрации хлорофиллов *a* и *b* в листках на 86,5 %, нитрогеназная активность в корневой зоне растений увеличилась в 2,2 раза по сравнению с вариантом без инокуляции. Сравнивая варианты с использованием азоспирилл и агробактерий приходим к выводу, что изменения в концентрации хлорофиллов были незначительными, в то время как нитрогеназная активность в корневой зоне растений при интродукции азоспирилл значительно превышала аналогичный показатель в варианте с агробактериями (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние инокуляции активными штаммами diaзотрофов на содержание хлорофиллов *a* и *b* в листках растений яровой пшеницы сорта Ранняя 93 и активность азотфиксации в корневой зоне культуры**

Вариант опыта	Концентрация хлорофиллов, мг/100 г листов			Нитрогеназная активность, нмоль этилена/растение за час
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>	
Без инокуляции (контроль)	82,4	49,6	132,0	112,8
Инокуляция семян <i>Agrobacterium radiobacter</i> 204	140,2	98,2	238,4	186,5
Инокуляция семян <i>Azospirillum sp.</i>	143,8	102,4	246,2	248,4
НСР <sub>05</sub>	4,96	8,86		43,2



Следующим показателем, который мы определяли в вариантах опыта была поражаемость растений яровой пшеницы по фазам развития корневыми гнилями. Результаты изучения видового состава микромицетов, выделенных из пораженных корневыми гнилями растений яровой пшеницы, свидетельствуют о том, что доминирующими в патогенном комплексе были представители рода *Fusarium*, а именно: *Fusarium culmorum* (Sm.) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. oxysporum* Schlecht. Snyd et Hans, *F. oxysporum* var. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilai, *F. solani* (Mart.) App. et Wr., *F. heterosporum* Nees, *F. sambucinum* var. *minus* Wr. Встречались также *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (Syn. *Drechslera sorokiniana* Subram., *Helminthosporium sativum* P.K. et B.), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) Deighton.

Из данных, приведенных на рис. 2, 3, 4 видно, что при использовании азоспирилл повысилась устойчивость растений яровой пшеницы к корневым гнилям. Так, распространение болезни снизилось в 1,7 - 1,8 раза, развитие болезни — в 2,3 - 3,7 по сравнению с вариантом без инокуляции. В данном случае использование азоспирилл было значительно эффективнее, чем агробактерий.

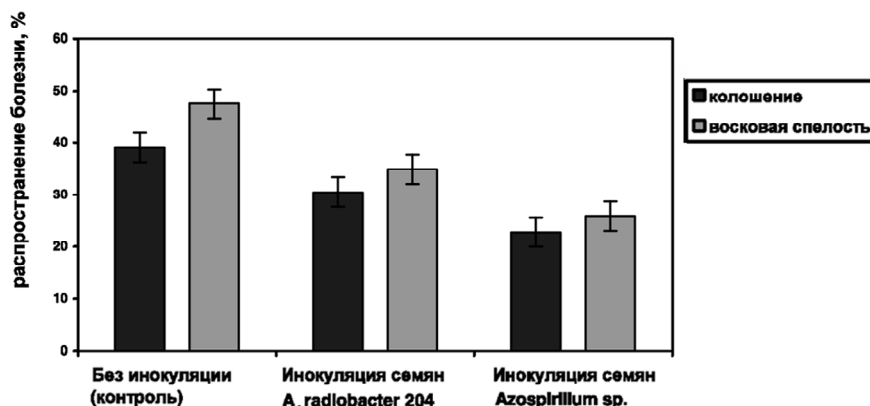


Рис. 2. Поражаемость растений яровой пшеницы корневыми гнилями при использовании активных штаммов diazotrophs (распространение болезни)

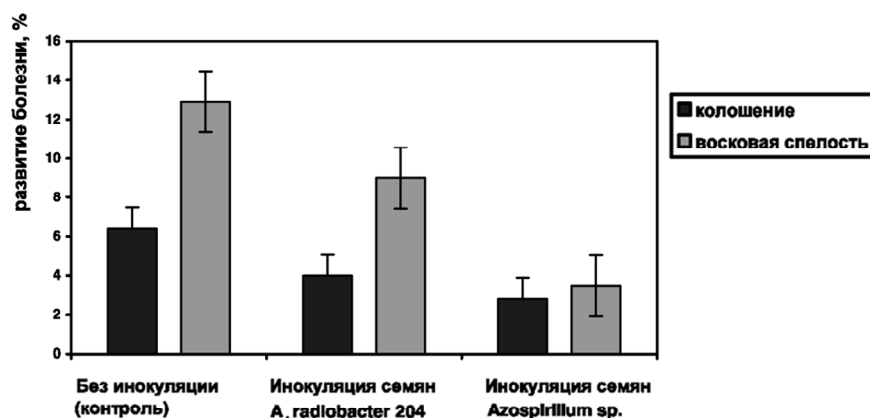


Рис. 3. Поражаемость растений яровой пшеницы корневыми гнилями при использовании активных штаммов diazotrophs (развитие болезни)



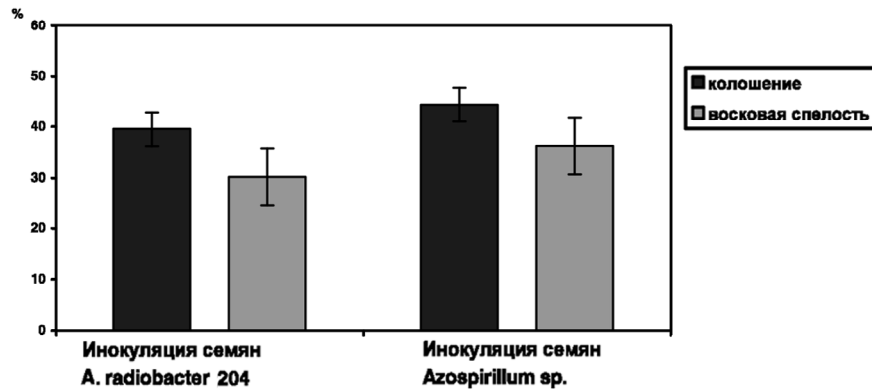


Рис. 4. Биологическая эффективность при использовании активных штаммов diazotрофов

Эффект защиты яровой пшеницы от возбудителей корневых гнилей под влиянием diazотрофов можно объяснить как тем, что азотфиксирующие бактерии способны проявлять антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам - возбудителям корневых гнилей, так и тем, что под влиянием diazотрофов повышается неспецифическая устойчивость растений к фитопатогенам.

Исследования показали, что интродукция diazотрофов в корневую зону растений яровой пшеницы не ограничивала развитие аборигенной микрофлоры почвы (табл.3).

Таблица 3

**Численность микромицетов в ризосфере яровой пшеницы (полевой опыт, фаза развития растений- цветение)**

Варианты опыта	Кол - во КОЕ грибов тыс / г почвы	<i>Acetomonium</i>	<i>Bipolaris</i>	Семейство Dematiaceae	<i>Glodiadium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Trichoderma</i>	Другие грибы
Без инокуляции (контроль)	366,0 ± 42,2	22,4 ± 4,0	16,8 ± 2,4	28,0 ± 5,6	25,2 ± 2,7	14,0 ± 1,5	11,2 ± 1,4	39,2 ± 6,9	109,2 ± 21,8	42,0 ± 5,3	14,0 ± 1,8	44,8 ± 5,8
Инокуляция семян <i>Agrobacterium radiobacter</i> 204	329,0 ± 21,13	22,4 ± 3,86	14,0 ± 1,8	25,2 ± 3,4	19,6 ± 2,0	19,6 ± 2,9	12,6 ± 2,0	32,2 ± 6,4	67,2 ± 7,0	42,0 ± 6,1	12,6 ± 2,1	61,6 ± 12,2
Инокуляция семян <i>Azospirillum</i> sp.	358,4 ± 24,1	19,6 ± 3,1	19,6 ± 2,8	33,6 ± 5,8	25,2 ± 3,0	19,6 ± 4,0	14,0 ± 2,8	33,6 ± 5,9	81,2 ± 8,3	44,8 ± 6,8	14,0 ± 2,4	53,2 ± 8,4

Таким образом, использованные штаммы азоспирилл и агробактерий не выявляли антагонистического действия в отношении фитопатогенных грибов — возбудителей корневых гнилей. Поэтому снижение пораженности яровой пшеницы корневыми гнилями при использовании изучаемых diazотрофов можно объяснить повышением устойчивости растений к фитопатогенам. Важную роль в этом процессе, на наш взгляд, играет способность азоспирилл к эндодитии. Как известно, бактерии-эндодиты стиму-



лируют рост растений и их устойчивость к фитопатогенам. Это может быть обусловлено как метаболической деятельностью эндوفита, так и возможностью занимать экологическую нишу, временно недоступную патогенам.

Значительное уменьшение пораженности растений яровой пшеницы корневыми гнилями, улучшение азотного питания растений, активизация процесса фотосинтеза, наблюдаемое при интродукции diazotрофов, привело к увеличению урожайности культуры (табл.4).

Таблица 4

**Влияние активных штаммов diazотрофов на урожай зерна яровой пшеницы и его структуру (среднее за 2002-2004 гг.)**

Вариант опыта	Длина колоса, см	Количество зерен в колосе, шт	Масса зерна в 1 колосе, г	Урожай, ц/га
Без инокуляции (контроль)	7,4 ± 0,55	26,2 ± 2,13	0,936 ± 0,10	21,6
Инокуляция семян <i>Agrobacterium radiobacter</i> 204	7,9 ± 0,68	24,7 ± 2,22	1,08 ± 0,10	26,1
Инокуляция семян <i>Azospirillum sp.</i>	8,0 ± 0,74	29,2 ± 1,71	1,11 ± 0,09	27,3
НСР <sub>05</sub>				2,07

Таким образом, с использованием методов аналитической селекции были получены новые штаммы азоспирилл, которые характеризовались высокой нитрогеназной активностью в чистой культуре: от 3,5 до 12,6 мкг азота на 1 мл питательной среды. Проведение серии вегетационных опытов дало возможность отобрать наиболее эффективный штамм, который способен не только приживаться в ризосферной почве, но и проникать во внутренние ткани растений яровой пшеницы. Использование отобранного штамма азоспирилл для инокуляции яровой пшеницы способствует активизации процесса ассоциативной азотфиксации в корневой зоне культуры, положительно влияет на фотосинтетический аппарат, улучшает рост и развитие растений, повышает их стойкость к возбудителям корневых гнилей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Okon Y. Recent progress in research on biological nitrogen fixation with nonleguminous crops //Phosphorus in Agricult. - 1982. - V.82. - P.3-10.
2. Калининская Т.А., Редькина Т.В., Белов Ю.М. Применение ацетиленового метода для количественного учёта разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений //Микробиология. - 1981. - Т.50, №5. - С. 924-927.
3. Берестецкий О.А., Шерстобоев Н.К., Шерстобоева Е.В., Патыка В.Ф. Модифицированный метод накопительных культур для выделения симбиотрофных азотфиксирующих микроорганизмов //Микробиологический журнал. - 1986. - Т.48, №2. - С. 85-89.
4. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. проф. Д.Г. Звягинцева. Изд-во Московского ун-та. - 1980. - 224 с.
5. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физио-



логии растений. - Киев: Наук. думка, 1973. - 567 с.

6. Коршунова А.Ф., Чумаков А.С., Щекочихина Р.И. Защита пшеницы от корневых гнилей. - Л.: Колос, 1976. - 184 с.

7. Методи випробовування і застосування пестицидів / За ред. С.О. Трибеля. - К.: Світ, 2001. - 448 с.

8. Емцев В.Т., Нице Л.К., Ахмедов Ф.Т. Фиксация азота атмосферы в корневой зоне у различных зерновых культур //Изв. ТСХА. - 1989. - №1. - С.89-99.

### **Є.П. Копилов**

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

### **СЕЛЕКЦІЯ ЕФЕКТИВНИХ ШТАМІВ ДІАЗОТРОФІВ ДЛЯ ІНОКУЛЯЦІЇ ЯРОЇ ПШЕНИЦІ**

#### **Реферат**

Методами аналітичної селекції одержано ефективні штами бактерій роду *Azospirillum*, які здатні приживатися і активізувати процес асоціативної азотфіксації в кореневій зоні ярої пшениці, позитивно впливати на фотосинтетичний апарат рослин. При цьому поліпшується ріст і розвиток рослин, підвищується їх стійкість до збудників корневих гнилей, збільшується урожай ярої пшениці.

**К л ю ч о в і с л о в а:** *Azospirillum*, яра пшениця, селекція, асоціативна азотфіксація, кореневі гнилі, хлорофіли *a* і *b*.

### **Е.Р. Копылов**

Institute of agricultural microbiology, Shevchenko str., 97, Chernigiv, Ukraine, 14027

### **SELECTION OF EFFECTIVE STRAINS OF NITROGEN-FIXING BACTERIA FOR INOCULATION OF SPRING WHEAT**

#### **Summary**

The effective bacteria strains of *Azospirillum* genus which are able to settle down and activate the process of associative nitrogen fixation in root zone of spring wheat and have positive influence on photosynthetic system of plants have been obtained with help of analytical selection. For all this it is going to improve the growth and development of plants, advances their resistance to agents of root rots, extends the harvest of the spring wheat.

**Key words:** *Azospirillum*, spring wheat, selection, associative nitrogen fixation, root rots, chlorophylls *a* and *b*.

