НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА АГРОПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

На правах рукопису

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук,
професор
Надкернична Олена Володимирівна

Чернігів – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 4

ВСТУП 5

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 12

1.1 Рослинно-мікробні взаємодії в системі “злакова рослина – діазотрофи роду *Azospirillum*” 12

1.1.1 Вплив генотипу макросимбіонта на формування і функціонування асоціативної системи “злакова рослина – бактерії роду *Azospirillum*” 12

1.1.2 Діазотрофи роду *Azospirillum* і їх функції у рослинно-мікробній взаємодії 19

1.2 Інокуляція азоспірилами – перспективний шлях підвищення урожайності і якості одержаної продукції злакових культур 31

РОЗДІЛ 2 ОБ’ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 33

2.1 Об’єкти дослідження 33

2.2 Методи дослідження 37

2.3 Умови проведення вегетаційних та польових дослідів 41

РОЗДІЛ 3 АЗОТФІКСУВАЛЬНИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІКРОБНО-РОСЛИННИХ СИСТЕМ ЯРИХ ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ РІЗНИХ СОРТІВ 46

3.1 Азотфіксувальна активність у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале 47

3.2 Вплив абіотичних і біотичних чинників на потенційну нітрогеназну активність у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале 54

3.3 Внутрішньосортовий поліморфізм тритикале ярого за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію 66

РОЗДІЛ 4 СКРИНІНГ ДІАЗОТРОФІВ, ЩО УТВОРЮЮТЬ ЕФЕКТИВНІ АСОЦІАЦІЇ З РОСЛИНАМИ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ТА ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО 72
4.1 Склад азотфіксувального мікробного угруповання кореневої зони ярих пшениць та тритикале 72
4.2 Діазотрофи, виділені з ризосфери та ризоплани ярих пшениць та тритикале 76
4.3 Ідентифікація нових перспективних штамів *Azospirillum sp.* 77 і *Azospirillum sp.* 10/1 83
4.4 Вплив *Azospirillum brasilense* 77 і 10/1 на потенційну нітрогеназну активність та біосинтетичні процеси в рослинах пшениці ярої та тритикале ярого 89
РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 10/1 НА ВНУТРІШНЬОСОРТОВИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО ЗА ЗДАТНІСТЮ ПІДТРИМУВАТИ АСОЦІАТИВНУ АЗОТФІКСАЦІЮ 97
РОЗДІЛ 6 ІНОКУЛЯЦІЯ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО ШТАМОМ *A. BRASILENSE* 10/1 ЯК ЗАСІБ ПІДВИЩЕННЯ УРОЖАЙНОСТІ ТА ЯКОСТІ ОДЕРЖАНОЇ ПРОДУКЦІЇ 102
РОЗДІЛ 7 ЕКОНОМІЧНА ТА ЕНЕРГЕТИЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ БАКТЕРИЗАЦІЇ НАСІННЯ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 10/1 ПРИ ВИРОЩУВАННІ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО 116
РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ 126
ВИСНОВКИ 128
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 130
ДОДАТКИ 158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ІДК – індекс деформації клейковини

ПНА – потенційна нітрогеназна активність

$\bar{x}$ – середнє значення

σ – стандартне відхилення

As – коефіцієнт асиметрії

Ex – коефіцієнт ексцесу

Lim – найменше і найбільше значення за вибіркою

Me – медіана

Mo – мода (модальний інтервал)

Vp – коефіцієнт варіації

ВСТУП

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 [9, 10, 15, 96, 160]. Досліджуються фізіологічні та біохімічні особливості даного процесу, активно вивчаються мікроорганізми, що здійснюють його в асоціації з рослинами [98, 114, 135, 153, 170]. 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) [209].

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 [63, 77, 90, 188, 208]. 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 [60, 117].

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 високоефективних 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 [75].

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 сількогосподарської 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 ендофітії " (№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 міжсортову мінливість зазначених культур за nis-ознакою;
- дослідити внутрішньосортовий 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 внутрішньосортовий 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 глутамінсинтетазної 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 міжсортової 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 внутрішньосортовим 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 nis-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: глутамінсинтетазна 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 внутрішньосортової варіабельності тритикале ярого за nis-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.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Біологічна азотфіксація, що здійснюється діазотрофними мікроорганізмами, – явище планетарного масштабу, за рахунок якого був створений і підтримується азотний баланс грунтових, водних, повітряних екосистем планети Земля [9].

Після відкриття здатності азотфіксувальних мікроорганізмів вступати в асоціації з небобовими рослинами в усьому світі були розпочаті і стрімко розвиваються дослідження асоціативної (несимбіотичної) азотфіксації – саморегульованого процесу взаємодії азотфіксувальних прокаріот (бактерій і архей) з організмами-еукаріотами без утворення спеціалізованих морфологічних структур, але з позитивним впливом на ріст і розвиток зазначених організмів [42, 95].

Формування і активне функціонування асоціацій діазотрофів з небобовими рослинами рівною мірою залежить від особливостей макро- і мікропартнера рослинно-мікробної взаємодії.

1.1 Рослинно-мікробні взаємодії в системі “злакова рослина – діазотрофи роду *Azospirillum*”

1.1.1 Вплив генотипу макросимбіонта на формування і функціонування асоціативної системи “небобова рослина – діазотрофи кореневої зони” Інтродукція активних штамів асоціативних діазотрофів у кореневу зону злакових культур не може бути високоефективною без урахування здатності рослинного організму забезпечувати умови оптимального перебігу процесу фіксації молекулярного азоту. Адже саме рослина-макросимбіонт генетично детермінує якісний і кількісний склад та швидкість виділення кореневих ексудатів і кореневого опаду, що є джерелом енергії та живлення для мікроорганізмів, а також синтезує фітогормони і підвищує здатність коренів до адгезії азотфіксувальних мікроорганізмів [117]. Речовини, які входять до складу кореневих ексудатів, відіграють роль

атрактантів для ризосферних мікроорганізмів, у тому числі і асоціативних діазотрофів [171]. Відмінності за якісним складом та об’ємом кореневих ексудатів обумовлюють варіабельність активності асоціативної азотфіксації у різних видів і сортів рослин [173, 183, 232].

У 70-ті роки минулого століття з’являються роботи, присвячені вивченню генетичної детермінації здатності небобових рослин формувати азотфіксуальні асоціації з діазотрофами.

У роботах Рені та Ларсона, присвячених дослідженню впливу інокуляції сортів пшениці Кадет і Реск’ю та їх взаємозаміщених за декількома хромосомами ліній азотфіксувальними бактеріями *Bacillus sp*. і *Azospirillum sp*. на інтенсивність процесу азотфіксації в кореневій зоні рослин, було показано зв'язок хромосоми 5В з активністю фіксації молекулярного азоту. Інокуляція рослин сорту Кадет зазначеними діазотрофами приводила до зв’язування молекулярного азоту в зоні коренів, а за інокуляції сорту Реск’ю нітрогеназна активність в кореневій зоні рослин виявлена не була. Заміщення хромосоми 5В у сорті Реск’ю на аналогічну хромосому від сорту Кадет дало змогу відновити втрачену функцію. Автори вважають, що генотип рослин відіграє важливу роль у формуванні таксономічної структури ризосферного мікробного ценозу, що залежить від кількості і якості кореневих ексудатів [207].

У дослідженні генетичного контролю процесу азотфіксації важливими є дані про те, які саме гени небобової рослини безпосередньо або опосередковано впливають на функціонування асоціативних систем. З’ясування цього питання можливе з використанням ізогенних ліній, які створені у генофоні певного сорту і відрізняються лише за станом конкретних локусів зазначених генів, що дає можливість виокремити їх ефекти на процес азотфіксації [79, 82].

І. С. Родинюк досліджувала здатність до асоціативної азотфіксації ізогенних ліній ярої м’якої пшениці, що були створені на основі сорту Новосибірська 67. До роботи були залучені ізогенні лінії, які несли гени

стійкості до захворювань – імунні (*Lr-TR, Pm-4b*), гени короткостеблості (*Rht3, Rht1+Rht2*), а також лінії, які різнилися за будовою колосу, його забарвленням, а ознаками морфології рослин і типом розвитку. Автором було встановлено, що більш високою активністю асоціативної азотфіксації у кореневій зоні рослин відзначалися імунні і короткостеблові лінії. При цьому, підвищена здатність до асоціативної азотфіксації залежить від певних конкретних локусів, а не від наявності імунітету до хвороби в цілому, адже лінія, імунна до борошнистої роси з невідомим неалельним геном, не виявила підвищеної нітрогеназної активності. Щодо короткостеблових ліній, не всі генетичні типи короткостеблості сприяли підвищенню рівня асоціативної азотфіксації. На думку автора, дія введених генів на процес асоціативної азотфіксації відбувається на різних рівнях: гени імунності можуть впливати на формування асоціативної системи «діазотрофи – рослина» шляхом корекції мікробних взаємовідносин, ген короткостеблості сприяє збільшенню долі діазотрофів в екосистемах. Автором також було встановлено позитивний кореляційний зв’язок між рівнем нітрогеназної активності та вмістом білка в імунних лініях пшениці. Незважаючи на дещо суперечливий характер даних щодо генетичного зв’язку між ознакою асоціативної азотфіксації та селекційними критеріями, І. С. Родинюк доходить висновку про те, що маркерними ознаками можуть виступати короткостеблість, імунність і вміст білка в зерні.

Кореляційні зв’язки між рівнем асоціативної азотфіксації та селекційними ознаками озимого жита вивчали В. В. Скорик зі співавторами. Для дослідження був обраний сорт Струна з генами домінантної короткостебловості *HlHl* та імунітету до мучнистої роси *ErEr* [88]. Застосування кореляційно-регресійного аналізу дозволило авторам встановити істотні негативні кореляції між висотою вихідних рослин та їх сімей і nis-ознакою їх прямих нащадків (r_G=-0,5507 і -0,3844 відповідно), тобто нащадки короткостеблових рослин мають підвищену здатність до асоціативної азотфіксації порівняно з високостебловими. Істотні негативні

генетичні кореляції також були встановлені між кількістю зерен в колосі сімей озимого жита і активністю асоціативної азотфіксації (r_G=-0,2857), а також озерненістю колоса сімей озимого жита і активністю асоціативної азотфіксації (r_G=-0,5008). Істотні позитивні кореляції були встановлені між масою 100 зерен вихідних рослин і азотфіксувальною активністю у кореневій зоні їх прямих нащадків (r_G=0,5415) та масою 100 зерен сімей озимого жита з азотфіксувальною активністю у їх кореневій зоні (r_G=0,3135).

Дослідження, проведені з сортами Ясельда і Зубровка та їх сім'ями не виявили чітко спрямованих генетичних кореляцій з асоціативною азотфіксацією. Автори доходять висновку про те, що генетично різні сорти озимого жита обумовлюють неоднакову генетичну детермінацію висоти рослин і асоціативної азотфіксації їх прямих нащадків, а висота рослин (або короткостебловість) не може бути маркерною ознакою при аналізі різних сортів озимого жита на підвищену здатність до асоціативної азотфіксації.

А. М. Самойловим та В. В. Жмурко досліджено ефект генів *Vrn* на активність асоціативної азотфіксації та чисельність діазотрофів ізогенних за цими генами ліній ярої м'якої пшениці, створених у генофоні озимої пшениці Миронівська 808 [82]. Окремі локуси зазначених моногенодомінантних ліній чітко детермінують темпи розвитку рослин (тривалість фази сходи-колосіння). Згідно одержаних даних, більшість показників були нижчими у рослин лінії *Vrn-B1*, які значно пізніше переходили до фази колосіння, ніж лінії *Vrn-A1* і *Vrn-D1*. Лінія *Vrn-B1* відрізняється також підвищеним накопиченням вуглеводів у листках упродовж світлового дня, що автори пов'язують з повільнішим їх відтоком до апікальних меристем та інших акцепторних зон.

Авторами зроблено припущення, що різниця у функціонуванні азотфіксувальної асоціації пов'язана з темпами розвитку досліджуваних ліній пшениці, що детерміновані локусами генів *Vrn*. Одним з можливих механізмів цього зв'язку може бути різна інтенсивність процесів накопичення фотосинтатів у листках, їх перетворення та відтоку до

атрагуючих центрів, що зумовлено генотипами цих ліній.

Вивчення впливу кореневих виділень проростків вищезазначених ліній на динаміку росту діазотрофа *Azospirillum brasilense* 410 в умовах культивування *in vitro* на безазотистому середовищі показало, що найбільшу біомасу азоспірили накопичували при співкультивуванні з кореневими виділеннями ізогенних ліній *Vrn-D1* і *Vrn-A1* [83]. Найбільше накопичення індолил-3-оцтової кислоти у середовищі культивування було відмічено за обробки кореневими виділеннями проростків ізогенної лінії *Vrn-B1* та озимого сорту Миронівська 808, рецесивного за всіма генами *Vrn*. Таку різницю автори пояснюють підвищеним вмістом триптофану в кореневих виділення проростків ізолінії *Vrn-B1* та сорту, а також, можливо, й в цілому підвищеним вмістом амінокислот у їх екзометаболітах. Різниці за трофічним хемотаксисом азоспірил до екзометаболітів проростків ізогенних ліній у даному дослідженні виявлено не було.

Існування кореляційних зв'язків між інтенсивністю фотосинтезу, чисельністю діазотрофів, вмістом АТФ і активністю азотфіксації в кореневій зоні досліджуваних рослин встановили В. Т. Ємцев із співробітниками [34].

Степаненко І. Л. зі співавторами вивчали нітрогеназну активність 32 ліній ячменю з мутаціями за вмістом хлорофілу, будовою колоса, забарвленням насіння і проростків. Найбільша кількість низькоактивних щодо асоціативної азотфіксації генотипів була виявлена ними серед ліній, що несли мутації за вмістом хлорофілу, високоактивних – серед еректоїдних та карликових форм [89].

У роботі В. Т. Ємцева та М. І. Чумакова показано залежність nis-ознаки від структури геному рослин. Результати дослідження ряду сортів, які представляють різні рівні поліплоїдного ряду пшениці, свідчать про те, що при переході з диплоїдного рівня організації *Triticum* (еволюційно найбільш давнього) на тетраплоїдний nis-активність зростає в середньому на 37 %. У групи сортів з гексаплоїдним рівнем організації активність асоціативної азотфіксації була на 59 % вищою, ніж у групи сортів з

диплоїдним набором хромосом. [33]. За даними І. С. Родинюк, перехід на двохгеномну ступінь еволюції навпаки знижує ефективність функціонування азотфіксувальних ризоценозів і, таким чином, при селекції пшениць за nis-ознакою вихідним матеріалом мають бути переважно одногеномні види роду *Triticum* [78].

Важливим аспектом генетичної детермінації асоціативної азотфіксації є здатність рослин успадковувати підвищений рівень нітрогеназної активності. Такі дослідження були проведені з просом, рисом, ячменем, житом [87, 117, 141, 181].

При схрещуванні ліній проса з високою активністю у нащадків у першому поколінні була встановлена висока здатність до азотфіксації, у нащадків малоактивних ліній – низька. В одних комбінаціях при схрещуванні контрастних ліній nis-ознака проявляла себе як домінантна, в інших спостерігалося проміжне спадкування [141].

Гібридологічний аналіз нащадків від схрещування ліній ячменю ярого з низькою та високою здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію, проведений В. К. Шумним та І. Л. Степаненко, показав, що висока здатність спадкується як рецесивна ознака і контролюється кількома генами. Два неалельні гени, позначені авторами як *nis 1* та *nis 2*, визначають високий рівень нітрогеназної активності у ризосфері ліній Т1-6d і Т3-5b відповідно. Автори відмічають адитивний ефект дії nis-генів [117].

У дослідженнях з рисом встановлено, що висока активність асоціативної азотфіксації у ризосфері даної культури контролюється переважно рецесивними алелями, nis-ознака спадкується полігенно і може аналізуватися як якісна [181].

Загалом дослідження спадкування nis-ознаки ускладнюється впливом навколишнього середовища, адже фенотипна мінливість не відображає генотипну [117].

Отже, вивчення генетичної детермінації небобовими рослинами здатності підтримувати високий рівень азотфіксувальної активності у

кореневій зоні характеризується неоднозначними результатами і дослідження nis-ознаки залишається актуальним завданням для підвищення продуктивності процесу асоціативної азотфіксації.

Існування міжсортової мінливості злакових культур за здатністю забезпечувати асоціативну азотфіксацію в кореневій зоні рослин показано у багатьох роботах [60, 78, 79, 81, 91, 101, 102, 117, 165, 188, 208].

В результаті досліджень 14 сортів пшениці ярої, було встановлено діапазон мінливості азотфіксувальної активності у ризосфері від 0,19 до 15,22 нмоль етилену на рослину за 1 год. Кореляції азотфіксації з загальною чисельністю азотфіксувальних бактерій виявлено не було [81].

Польова оцінка 112 зразків ячменю ярого, 33 зразків озимих і 67 зразків ярих тритикале, здійснена О. І. Танцовою та Б. М. Черемісовим, дала змогу виділити відповідно 13, 3 і 8 генотипів, що мали високі показники азотфіксації. Найвищою інтенсивністю азотфіксації серед зразків ячменю відзначався сорт Донецький 9, величина ацетиленредукції у якого переважала середню за дослідом у 7, а мінімальну – у 108 разів. Активність ацетиленредукції генотипів тритикале озимих з високою активністю азотфіксації перевищувала середнє значення за дослідом у 3,5-5, а мінімальне – у 45-60 разів. Серед зразків тритикале ярого найвищою інтенсивністю азотфіксації характеризувався австралійський сорт Jowan, величина ацетиленредукції у якого переважала середнє значення за дослідом у 6 разів, а мінімальне – у 95. Автори відмічають також, що переважна більшість зразків ячменю і тритикале (79 %) мали низку і дуже низьку азотфіксацію [91].

Скринінг 38 сортів ячменю ярого, проведений В. К. Шумним та І. Л. Степаненко, показав значну варіабельність нітрогеназної активності у ризосфері рослин – від 0 до 500 нмоль етилену на рослину за 1 год. За середніми показниками нітрогеназної активності сорти Mona і Новосибірський 1 відрізнялися у 40 разів і не мали трансгресуючих класів. Розподіл досліджуваних сортів за здатністю підтримувати азотфіксацію

бімодальний. [117].

О. В. Надкерничною у дослідженні 52 сортів і гібридів жита озимого щодо здатності підтримувати асоціативну азотфіксацію було встановлено спектр мінливості зазначеної культури від 0 до 65 мкг азота на посудину за год. У 75 % досліджених сортів і гібридів нітрогеназна активність становила 15-25 мкг азота на посудину за год. Між сортами виявлено 14-кратні розбіжності [60].

У роботах з пшеницею ярою, ячменем ярим, житом озимим встановлено, що поряд з міжсортовою існує також внутрішньосортова мінливість за nis-ознакою [18, 87, 117].

Б. Ф. Садиковим зі співавторами показано, що досліджувані сорти пшениці ярої представлені щонайменше двома-трьома біотипами, які відрізняються за азотфіксувальною активністю [18]. Серед сортів ячменю ярого частина була представлена одним біотипом, інша – двома-трьома біотипами. Автори доходять висновку, що висока внутрішньосортова мінливість за nis-ознакою обумовлена як впливом середовища на її прояв, так і генотипною неоднорідністю сортів щодо факторів, які визначають рівень нітрогеназної активності у ризосфері [117]. Істотне генетичне варіювання активності азотфіксації в межах сорту відмічено і для жита озимого [87]. Насиченість популяцій сорта генотипами, що характеризуються високою азотфіксувальною активністю, обумовлює високий азотфіксувальний потенціал сорту. Авторами показано, що внутрішньопопуляційний розподіл ознаки асоціативної азотфіксації у сортів жита озимого близький до нормального, що свідчить про достатню гетерогенність популяцій і можливість пошуку генотипів-донорів високої нітрогеназної активності.

1.1.2 Діазотрофи роду *Azospirillum* і їх функції у рослинно-мікробній взаємодії

Діазотрофи роду *Azospirillum* є одними з найбільш досліджених бактерій, що стимулюють ріст і розвиток рослин (Plant Growt Promotion

Rhizobacteria) [135, 202].

Завдяки широкому поширенню азоспірил, всебічному вивченню вітчизняними і зарубіжними дослідниками їх біологічних особливостей, механізмів впливу на рослину, взаємодія азоспірил з небобовими рослинами розглядається як загальна модель рослинно-мікробних взаємодій [199].

Перші згадки роду *Azospirillum* у науковій літературі належать до 1978 року, але штами, включені насьогодні до даного роду, були описані ще у 20-ті роки минулого століття. У 1922 році Бейєринк уперше описав ріст спірил на безазотистому середовищі, що містило малат або лактат. Ріст супроводжувався накопиченням азоту та зниженням концентрації малата. Бейєринк відніс даний організм до роду *Spirillum* і дав йому назву спочатку *Azotobacter spirillum*, пізніше – *Spirillum lipoferum* [137].

Групу штамів *S. lipoferum* досліджували за допомогою таксономічних і молекулярно-біологічних методів, на основі яких було виділено новий рід *Azospirillum*, а проаналізовані штами віднесено до двох видів – *A. lipoferum* и *A. brasilense* [225]. Насьогодні вони є найбільш вивченими представниками роду.

Більшість видів роду *Azospirillum* було описано лише у другій половині XX-го і на початку XXI століття. Відновлення інтересу до представників роду *Azospirillum* в кінці 70-х років минулого століття було викликано передусім практичними міркуваннями [135, 220]. Азоспірил виявляють на коренях пшениць, а також інших харчових і кормових злаків, вони характеризуються високою азотфіксувальною активністю як в асоціації з коренями рослин, так і в чистій культурі [156, 220]. З вивченням азоспірил в кінці XX-го століття пов’язували прогрес в області біологічної азотфіксації – заміни у мінеральному живленні рослин азоту мінеральних добрив на фіксований бактеріями азот атмосфери.

Рід *Azospirillum* поповнюється новими видами як за рахунок уточнення класифікації вже відомих бактерій, так і внаслідок опису та систематизації виділених з природного середовища ізолятів. Насьогодні описано 20 видів

роду *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zeae*, *A. rugosum*, *A. picis*, *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. fermentarium*, *A. humicireducens*, *A. himalayense*, *A. soli*, *A. agricola* (http://www.bacterio.net/azospirillum.html). Важливо відмітити, що для двох видів – *A. irakense* и *A. amazonense*, що були описані у 80-ті роки XX століття, запропонована рекласифікація: *Niveispirillum irakense* і *Nitrospirillum amazonense*, відповідно [155].

Азоспірили – грамнегативні бактерії, що належать до родини *Rhodospirillaceae*, α-підкласу протеобактерій [219]. Вегетативні клітини бактерій роду *Azospirillum* звичайно мають форму дещо зігнутих або прямих паличок діаметром 0,8–1,0 мкм і довжиною 2–5 мкм [135, 235]. Залежно від умов існування клітини азоспірил можуть набувати іншої форми і бути округлими, віброїдними або паличковидними.

Бактерії роду *Azospirillum* мають великий розмір генома – від 4800 т. п. н. у *A. irakense* до 9700 т.п.н. у *A. lipoferum* [166], що визначає їх високу адаптаційну здатність. У зв'язку з цим азоспірили займають різноманітні екологічні ніші і можуть існувати практично в усіх кліматичних зонах – виявлені у 90 % тропічних грунтів і приблизно у 60 % грунтів помірної зони [224]. Температурні межі розвитку бактерій роду *Azospirillum* варіюють від 5 до 42 ^{0}C з оптимумом 30-32 ^{0}C. Азоспірили належать до нейтрофілів, але значення pH, за яких можливий їх ріст, коливаються у досить широкому діапазоні – від 4,0 до 8,8 [167].

Представники роду *Azospirillum* відрізняються наявністю різних типів вуглецевого та азотного обміну, що дозволяє їм успішно адаптуватися за високої конкуренції у ризосфері. Як джерело азоту вони можуть використовувати солі амонію, нітрити, нітрати, амінокислоти і молекулярний азот, як джерело вуглецю – солі молочної, бурштинової, яблучної, піровиноградної та інших органічних кислот. За несприятливих умов (дефіцит поживних речовин, висихання, зниження температури)

азоспірили утворюють цисти [213], що супроводжується формуванням зовнішнього полісахаридного шару і внутрішньоклітинною акумуляцією гранул полі-β-гідроксибутирата, який є джерелом вуглецю та енергії [220].

Для бактерій роду *Azospirillum* описано явище фенотипової дисоціації. Дисоціацію *Azospirillum* спостерігали після тривалого зберігання, дії низьких та високих температур, в результаті сольового і трофічного стресу (зберігання у фізіологічному розчині, у середовищі зі зниженою кількістю поживних речовин), а також після повторного виділення штама з коренів рослин після інокуляції. Встановлено, що фенотипові варіанти у азоспірил утворюються в результаті спонтанних змін, що відбуваються у плазмідному профілі бактерій [126, 200, 228].

Фенотипова дисоціація у *A. brasilense* вперше була описана для штаму Sp7 [67], при чому більшість робіт стосувалася характеристики R- і S-дисоціантів, значно пізніше був описаний ще один морфо тип даного штаму – Sm [97].

У дослідженнях ізраїльських вчених для *A. brasilense* Sp7 запропонована інша класифікація дисоціантів [200]. У окремих фенотипових варіантів *A. brasilense* Sp7 виявлені відмінності за властивостями клітинної поверхні, структурі ліпополісахариду, азотфіксувальній активності, здатності зв’язувати лектин конканавалін А (ConA), а також ступенем гідрофобності і агрегації клітин [36, 67, 121, 126, 200]. Показано, що дисоціант *A. brasilense* Sp7, який відзначався високою продукцією екзополісахарида ЕПС і формуванням бактеріями слизистих колоній, був більш стійким до різних видів стресу, а також характеризувався більш високою здатністю до утворення біоплівки, ніж домінуючий морфотип [200].

Фенотипова дисоціація важлива для реалізації адаптивного потенціалу бактерій, а також відіграє важливу роль у колонізації коренів рослини [3, 121, 200].

Бактерії роду *Azospirillum* колонізують як зовнішні, так і внутрішні тканини кореня багатьох вищих рослин [122, 135, 162, 178]. Поряд з

терміном «асоціації», що історично використовується для позначення взаємодій азоспірил з макропартнером, на початку XXI століття було запропоновано ще два терміна, які підкреслюють тісний характер даних взаємодій: «ассоціативний симбіоз» та «ендофітний симбіоз» [5, 182]. Про ендофітний симбіоз прийнято говорити, якщо відбувається колонізація бактеріями міжклітинників, кореневих волосків і провідних тканин рослини, про асоціативний – у випадку колонізації зовнішньої частини кореня. Модельним об'єктом вивчення ендофітного симбіоза є штам *A. brasilense* Sp245, уперше виділений в Бразилії з коренів пшениці [134]. За порівняльного вивчення локалізації штамів *A. brasilense* Sp245 і Sp7 в кореневій системі пшениці за польових умов показано, що клітини *A. brasilense* Sp7 всередині кореня не виявляються, а наявні тільки на поверхні кореневої системи, в той час як для штама *A. brasilense* Sp245 більшою мірою характерна внутрішньокоренева локалізація [135, 214]. Також встановлено, що після проведення поверхневої стерилізації коренів клітини *A. brasilense* Sp7 не виявлялися [178].

Першою стадією колонізації азоспірилами коренів рослин є хемотаксис у напрямку кореневих ексудатів певного складу [145]. Хемотаксис – поширена функція рухливих ґрунтових бактерій, яка полягає у здатності регулювати напрямок та інші характеристики руху згідно хімічного складу речовин у навколишньому середовищі, забезпечує оптимальну екологічну нішу для розвитку мікроорганізмів і є важливою умовою утворення рослинно-мікробної асоціації [125, 146]. Бактерії роду *Azospirillum* здатні до хемотаксису щодо багатьох кореневих ексудатів – органічних кислот, амінокислот, цукрів, ароматичних сполук [124, 212]. Сукцинат, глюканат і фруктоза є сильними атрактантами, амінокислоти – слабкими. Показано, що азоспірили характеризуються високою чутливістю до ароматичних кислот – бензоату і гідроксибензоату [217]. В ґрунті азоспірили здатні подолати відстань до 30 см від точки інокуляції до кореневої системи рослин. Поряд з позитивним хемотаксисом щодо джерел

вуглецю та енергії бактеріям роду *Azospirillum* властивий позитивний цитокінез – тобто підвищення швидкості руху у напрямку атрактантів і негативний аеротаксис – рух у напрямку пониженого парціального тиску кисню [217].

Хемотаксис не тільки потребує наявності хемоатрактантів, але і напряму залежить від рухливості бактерій. За використання мутантів *A. brasilense*, які відрізнялися за рухливістю, було показано, що переміщення є необхідною умовою для ініціації бактеріальної колонізації [230]. Відомо, що рухливість азоспірил забезпечується двома типами джгутиків – одним довгим полярним та багатьма короткими перитрихіальними [149, 162]. Бактеріальні флагели дають змогу клітинам переміщуватися у більш вигідні для життєдіяльності умови, а також відіграють важливу роль у прикріпленні мікроорганізмів до коренів рослин [192].

Прикріплення азоспірил до коренів рослини-господаря є основою для утворення активної асоціації і складається з двох послідовних фаз – адсорбції та "заякорювання" [162, 174]. На першому етапі одиничні бактеріальні клітини адсорбуються на поверхні коренів, при чому даний процес відбувається швидко, характеризується слабким зв'язуванням і носить оборотний характер. Існують дані про те, що фаза адсорбції здійснюється за допомогою полярного джгутика [191, 212].

Філамент полярного джгутика складається з багаточисельних ідентичних молекул флагеліна – білка з С- і N-кінцевими ділянками, які в полімерній формі спрямовані всередину циліндричної порожнини і є консервативними структурами, та середньої ділянки, пов'язаної з антигенними та адгезивними властивостями бактерій [174]. Глікозилювання флагеліна є хімічним процесом, що забезпечує симбіотичні взаємовідносини бактерій з еукаріотами [190, 204].

Показано, що в рослинно-мікробних взаємодіях "азоспірили-рослина" на початкових стадіях формування асоціацій важливу роль відіграють вуглеводвмісні глікополімери поверхні зазначених бактерій [157, 218]. Так,

поряд з флагеліном у фазі адсорбції азоспірил на поверхні коренів рослин важливе значення мають капсулярні полісахариди (КПС) [199]. З КПС *A. brasilense* Sp7 було виділено і ідентифіковано лектин з молекулярною масою 36 кDa, який проявляє специфічність до L-фукози і D-галактози [223].

Лектини бактерій – глікопротеїни, що специфічно і оборотно зв'язуються з вуглеводами на поверхні коренів рослин в процесі рослинно-мікробної взаємодії. За даними С. А. Аленькіної зі співавторами, азоспірили продукують різні типи лектинів, які беруть участь в адгезії бактеріальних клітин до поверхні коренів рослин [216]. Різноманіття і складність лектинів азоспірил, імовірно завдяки високій плейотропності зазначених сполук, забезпечує адаптацію бактерій до різних видів рослин [130].

В процесі впізнавання на початкових етапах розвитку рослинно-бактеріальної асоціації лектини, які продукуються *A. brasilense*, індукують кілька сигнальних систем у коренях пшениці: NO-синтазну, НАДФН-оксидазну, Са-фосфоінозитольну, ліпоксигеназну [2]. Специфічні рецептори на поверхні клітин азоспірил також зв'язуються з лектинами поверхні коренів рослин [145]. Так, лектин АЗП (аглютинін зародків пшениці), зв'язуючись з клітинними рецепторами *A. brasilense* Sp245, змінює метаболізм бактеріальної клітини і діє як сигнальна молекула в асоціації азоспірили-рослина [151].

Друга фаза прикріплення азоспірил пов'язана з екстраклітинними полісахаридами (ЕПС) – полісахаридами, які слабко асоційовані з зовнішньою клітинною мембраною або повністю вивільняються у позаклітинне середовище. Під час "заякорювання" азоспірили необоротно і міцно прикріплюються до поверхні коренів, формуючи кластери з багатьох бактеріальних клітин на сайті прикріплення [234]. Склад ЕПС представляється вирішальним фактором агрегаційної здатності різних штамів азоспірил [162].

Поряд з КПС та ЕПС, важливим біохімічним компонентом, що значною мірою визначає можливість утворення рослинно-мікробної

асоціації є ліпополісахариди (ЛПС), відповідальні за імуноспецифічність бактеріальних клітин [177, 223, 227]. ЛПС формують зовнішній шар мембрани і надходять у бактеріальне мікрооточення у складі ліпополісахарид-білкових і полісахарид-білкових комплексів [180]. Молекула ЛПС є гліколіпідом, який включає гідрофобний домен ліпід *A*, занурений в мембрану залишками жирних кислот, і гідрофільний домен, експонований в навколишнє середовище [215, 223]. Гідрофільний домен складається з гетероолігосахарида (кора) і *O*-специфічного полісахарида (*O*-антигена або ОПС). Структура *O*-антигена бактерій роду *Azospirillum* є основою для класифікації мікроорганізма до певної серогрупи [223]. Штами азоспірил розподіляються на 3 серогрупи [215]. Азоспірили серогрупи I мають лінійний гомополімерний *O*-полісахарид, що складається з залишків D-рамнану [221]. Гетерополісахаридний *O*-антиген, що преципітує з антитілами до ЛПС *A. brasilense* Sp7 відповідає серогрупі II [147, 148]. У серогрупі III ОПС складається з головного ланцюга, сформованого трьома залишками L-рамнози та бічного ланцюга, представленого гомополісахаридом із залишків D-глюкози [222]. Різниця в структурі ОПС азоспірил пов’язана з розпізнаванням рослини-макропартнера [177]. Так, штами *Azospirillum* серогрупи I звичайно трапляються в асоціації з рослинами пшениці, в той час як штами серогруп II і III – в асоціаціях з іншими злаковими рослинами [147].

Після прикріплення клітин азоспірил відбувається “роїння” бактерій – процес, за допомогою якого групи бактерій просуваються поверхнею кореня до специфічних сайтів і колонізують їх [184]. “Роїння” як один з типів колективної рухливості азоспірил дає змогу бактеріям швидко колонізувати тканини макропартнера шляхом утворення мікроколоній, які опосередковують формування біоплівки на поверхні коренів рослин [226]. На ефективність “роїння” азоспірил впливають природа джерела азоту у середовищі, концентрація кисню та кореневі ексудати проростків пшениці [113]. Перехід частини популяції клітин *A. brasilense* Sp245 від “роїння” до

поширення з утворенням мікроколоній стимулюють знижена концентрація кисню, аспарагінова кислота, серин, треонін, рослинні лектини, специфічні до залишків *N*-ацетил-β-D-глюкозаміна [113].

Бактерії роду *Azospirillum* характеризуються рядом позитивних ефектів впливу на рослини, серед яких визначальні – здатність до фіксації молекулярного азоту атмосфери, синтез фітогормонів, вітамінів, речовин антибіотичної та антифунгальної природи [128].

Азоспірили активно фіксують молекулярний азот у чистих культурах на живильному середовищі. У своїх перших повідомленнях Доберейнер і Дей показали, що активність азотфіксації у чистих культурах *Azospirillum* сягала 100 мг азоту на 1 г субстрата [154]. Однак у подальших дослідженнях ці дані не підтвердилися. За даними Окона зі співавторами, кількість азоту, фіксованого азоспірилами, становила 10-25 мг на 1 г використаного субстрата [196]. Типові штами нових видів *A. soli* і *A. agricola*, виділені з окультурених ґрунтів Тайвані, фіксують азот атмосфери на рівні 6,5 та 8,4 нмоль етилена за годину відповідно [127, 132].

Представники роду *Azospirillum* здатні продукувати і виділяти фітогормони, переважно ауксини, гібереліни, цитокініни, котрі стимулюють ріст і розвиток рослин [136, 152, 159].

Дослідники повідомляють про наявність ауксинів в супернатанті культур *Azospirillum* [144]. Серед ауксинів, що синтезуються азоспірилами, кількісно найбільш представлена індолил-3-оцтова кислота (ІОК). В окремих роботах показано також здатність азоспірил продукувати значну кількість індолил-3-бутанової кислоти [152]. На думку Duca зі співавторами, індолил-3-бутанова кислота імовірно є важливим джерелом та резервом ІОК для різних штамів азоспірил [179]. Штами *Azospirillum* продукують ІОК упродовж усіх стадій розвитку [187].

У роботах багатьох дослідників висловлено припущення, що ІОК відіграє важливу роль в процесі коеволюції азоспірил і рослини-макросимбіонта як зворотна сигнальна молекула, яка підтримує симбіотичні

взаємовідносини між ними [138, 172, 187, 231, 233]. Індолил-3-оцтова кислота регулює клітинний цикл рослин, тропізм, апікальне домінування, процес старіння. Рівень ІОК істотно підвищується у відповідь на зміну умов навколишнього середовища і дефіцит поживних речовин у грунті, особливо, азоту, вуглецю і фосфору [187]. ІОК, що продукується *A. brasilense*, змінює морфологію коренів і проліферацію клітин проростків пшениці [210]. Також ІОК впливає на перебіг процесу фотосинтезу і біосинтез інших фітогормонів, а саме, цитокінів та гіберелінів [176].

В рослинному організмі цитокініни регулюють клітинний поділ, відповідальні за морфогенез коренів та пагонів [219]. У більшості онтогенетичних процесів цитокініни є антагоністами ауксинів та гіберелінів [22]. Як відомо з літературних джерел, *A. brasilense* і *A. lipoferum* здатні продукувати зеатин – фітогормон-цитокінін аденінового типу [131, 193].

Ще одним класом фітогормонів, до біосинтезу яких здатні азоспірили є гібереліни – за хімічною природою дитерпенові поліциклічні кислоти, що належать до карбонових кислот [236]. Насьогодні відомо понад 100 гіберелінів, хоча лише деякі з них ($ГК_1$, $ГК_3$, $ГК_4$, $ГК_7$ і деякі інші) характеризуються власною біологічною активністю і відтак регулюють різні аспекти розвитку рослин [144]. Відомо, що *A. brasilense* і *A. lipoferum* продукують $ГК_1$ і $ГК_3$, при чому $ГК_3$ є головним ідентифікованим типом гіберелінів [176, 185, 201]. Маніваннан і Толкаппіан у дослідженні 20 штамів азоспірил, виділених з ризосфери томата, зареєстрували кількість гіббереліновів до 3,3 мкг на 25 мл середовища [189].

Гібереліни проявляють різноманітну фізіологічну дію: активують поділ клітин меристематичних зон та їх розтягнення, за рахунок чого відбувається подовження головних коренів і лінійний ріст стебел, індукують утворення квітконосів і цвітіння у багатьох розеткових довгоденних рослин, активують проростання насіння, бульб та цибулин, відіграють важливу роль при формуванні плодів та насіння, затримують старіння листків ряду рослин [58].

В рослинах рису, інокульованих *A. lipoferum*, гібереліни покращували поглинання азоту, підвищували масу сухої речовини, висоту і урожайність культури [140]. В рослинах кукурудзи гібереліни сприяли елонгації стебел, а також росту і збільшенню кількості кореневих волосків [163].

Результати досліджень рослин з карликовим фенотипом, які характеризувалися дефіцитом гіберелінів, показали, що екзогенні гібереліни *A. brasilense* і *A. lipoferum* сприяли реверсії карликовості рису [133]. Ще однією з важливих функцій гіберелінів є переривання періоду спокою насіння за рахунок індукції гідролітичних ферментів α-амілази і протеази і мобілізації ендосперма під час проростання насіння. Басіліо зі співавторами та Кассан зі співавторами повідомляють про значне підвищення схожості насіння сої та пшениці за інокуляції *A. brasilense*, дослідники повязують цей факт з високим вмістом гіберелінів у культуральній рідині азоспірил [129, 186].

Гібереліни та абсцизова кислота, синтезовані азоспірилами, беруть участь у адаптації рослин до несприятливих умов навколишнього середовища (дефіцит води, сольовий стрес) та активізації захисних механізмів [128, 150, 203]. Інокуляція кукурудзи *A. lipoferum* сприяла підвищенню рівня абсцизової кислоти і посухостійкості рослин [198]. Штами азоспірил, виділені в умовах водного дефіциту характеризувалися підвищеним продукуванням абсцизової кислоти [176]. Інтесивність біосинтезу абсцизової кислоти підвищувалася у різних видів азоспірил при додаванні у живильне середовище хлориду натрію [128, 150, 211].

Показано, що *A. brasilense* Sp7 и Sp245 здатні продукувати фермент АЦК-дезаміназу, який відіграє важливу роль в антистресовій дії даних штамів на рослину-макропартнера [7]. Відомо, що АЦК (1-аміноциклопропанкарбонова кислота) є безпосереднім попередником у біосинтезі етилену у рослин, який залучений до багатьох ланок процесу росту і розвитку рослин, а саме: проростання насіння, цвітіння, дозрівання плодів, старіння тканин та реакції на стресові чинники. Активація біосинтезу

етилена є неспецифічною реакцією рослин на такі стреси як дефіцит вологи, токсичні концентрації важких металів та інфекція фітопатогенними мікроорганізмами.

Стійкість рослин до несприятливих умов середовища може забезпечуватися також шляхом синтезу проліну, поліамінів та трегалози [123, 128]. Відомо, що азоспірили виділяють поліаміни і амінокислоти у живильне середовище під час культивування [136, 142]. Поліаміни спермін, спермідін, путресцин і кадаверин впливають на ріст коренів і пом'якшують вплив стресових умов середовища на рослини [168]. Так, за даними Касан зі співавторами, інокуляція проростків рису *A. brasilense* сприяла розвитку кореневої системи і принаймні частково пом'якшувала осмотичний стрес для рослин за рахунок синтезу азоспірилами кадаверину [142]. Рослини кукурудзи, що були оброблені модифікованим штамом *A. brasilense* з підвищеним рівнем продукції трегалози, були більш стійкі до посухи і формували більш високу біомасу, ніж рослини, інокульовані диким типом *A. brasilense* [229]. Разом з тим, *Azospirillum* sp. індукують біосинтез вторинних метаболітів з антимікробною активністю (фенілоцтової кислоти, бактеріоцинів та сидерофорів) в рослинному організмі [172, 203]. Інокуляція азоспірилами змінює склад вторинних метаболітів рослини і, згідно даних Вокера зі співавторами, ці зміни є значно більш істотними, ніж у первинному метаболізмі [172]. Зміни профілю вторинних метаболітів рослин рису, бактеризованих азоспірилами, стосувалися головним чином, вмісту флавоноїдів та похідних гідроксикоричної кислоти [203]. Інокульовані азоспірилами та контрольні рослини кукурудзи відрізнялися за продукцією бензоксазиноїдів – речовин, пов'язаних зі стійкістю до патогенів [231].

Отже, зважаючи на багатовекторну дію азоспірил на рослини, яка полягає у підвищенні азотфіксувальної активності у кореневій зоні, синтезі фітогормонів, вітамінів, речовин з антимікробною та антифунгальною активністю, зазначені мікроорганізми представляють інтерес як інокулянти багатьох агрономічно важливих рослин, зокрема, зернових культур, хлібних

і кормових.

1.2 Інокуляція азоспірилами – перспективний шлях підвищення урожайності і якості одержаної продукції злакових культур

Позитивний ефект бактеризації насіння залежить від ряду факторів: активності штаму мікроорганізма, концентрації суспензії клітин, кількості біологічно активних речовин у суспензії, тривалості обробки насіння, виду рослин, стану аборигенної мікрофлори у момент посіву, особливостей грунту, умов агротехнічного комплексу [73]. Відомо, що набагато більш успішно відбувається інтродукція штамів, що були ізольовані з ризоплани або ризосфери того ж самого виду рослин [98].

Комплекс позитивних ефектів впливу бактерій роду *Azospirillum* широко застосовується у практиці рослинництва для інокуляції насіння багатьох господарсько цінних культур, переважно злакових.

Аналіз інокуляції різних видів рослин азоспірилами у багатьох регіонах показав, що позитивний ефект передпосівної обробки спостерігався не завжди, а лише у 60-70 % випадків; при цьому підвищення урожайності відбувалося в цілому від 5 до 30 % [196]. Виключно високі прибавки урожаю – понад 50 % було одержано за інокуляції пшениці ендофітним штамом *A. brasilense* Sp 245 у 80-ті роки минулого століття [135, 158]. Проте польові досліди, проведені упродовж 2009-2012 років з 8 сортами пшениці ярої м’якої саратовської селекції і тим же самим штамом показали відсутність позитивного ефекта інокуляції на урожайність. При цьому, автори відмічають позитивний ефект за якістю зерна – підвищення показника SDS-седиментації у насінні нового урожаю у відповідь на передпосівну обробку бактеріями *A. brasilense* Sp 245 [17].

Серед біотехнологічних продуктів для рослинництва важливе місце посідають біопрепарати на основі азоспірил, які не тільки сприяють підвищенню зернової продуктивності сільськогосподарських культур, але і сприяють поліпшенню якості одержаної продукції.

Мікробний препарат Діазобактерин, створений на основі

A. brasilense 18-2 в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, забезпечує істотний приріст урожайності зерна жита озимого, який сягає в середньому 10,2-37,4 % [61]. Інокуляція сприяє значному підвищенню активності процесу асоціативної азотфіксації та вмісту загального азоту в зерні жита озимого. За впливу Діазобактерину відмічено і значне збільшення вмісту амінокислот в зерні зазначеної культури. Так, сумарна кількість амінокислот у варіантах із застосуванням препарату підвищилася на 38,9-40 % порівняно з контролем. Вміст глютамінової кислоти, яка є ключовим субстратом азотного обміну, збільшився на 35,8-83,8 % залежно від років досліджень. Істотно збільшився також вміст незамінних амінокислот – ізолейцину, лізину, треоніну, фенілаланіну [50, 59].

Бактеризація насіння ячменю ярого біопрепаратом Мікрогуміном (біоагент *A. brasilense* 410) на дерново-підзолистому грунті сприяє збільшенню урожайності культури на 11,0–16,4 %. Вміст білка в зерні ячменю становив 8,55 % порівняно з 8,28 % у контрольному варіанті [20]. При вирощуванні ячменю ярого за використання оптимального агрофону $N_{60}K_{25}$ в поєднанні з Мікрогуміном урожайність підвищувалася на 17,9–28,7 %, вміст білка в зерні становив 10,88 % порівняно з 10,55 % у контролі [20].

Застосування мікробного препарату Азоризину-6 (біоагент *A. lipoferum* 137) для покращення азотного живлення проса при вирощуванні на чорноземі південному сприяло підвищенню урожайності культури в середньому на 12,7 % [74].

Зважаючи на вищезазначене, дослідження здатності сучасних перспективних сортів пшениці ярої та тритикале ярого забезпечувати процес асоціативної азотфіксації у кореневій зоні рослин і водночас селекція активних штамів діазотрофів, інокуляція якими дасть змогу підвищити урожайність зазначених культур і поліпшити якість одержаної продукції, представляється необхідним та актуальним.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Представлений у дисертації матеріал одержано в результаті досліджень, проведених у 2006–2012 рр. у лабораторії рослинно-мікробних взаємодій Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

2.1 Об'єкти досліджень

У дослідженнях використовували діазотрофи, виділені з відмитих коренів пшениці ярої сорту Варяг (*Azospirillum brasilense* 77) та тритикале ярого сорту Оберіг харківський (*A. brasilense* 10/1), рослини пшениці ярої м'якої (*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.

Насіння всіх сортів пшениці ярої та тритикале ярого, що були залучені до досліджень, надано співробітниками колекції Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Досліджувані сорти пшениці ярої м'якої характеризуються наступними особливостями.

Сорт Харківська 26 створено в лабораторії селекції ярої пшениці Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН, внесено до Державного реєстру сортів придатних до поширення в Україні у 2000 році та рекомендовано для вирощування у зонах Степу та Лісотепу. Сорт інтенсивного типу. Основними хворобами уражується слабко. Використовується у сортовипробуванні як національний стандарт і еталон високої урожайності. Середньостиглий – вегетаційний період становить 105-106 діб. Різновид – лютесценс.

Сорт Героїня внесений до Держаного реєстру сортів з 2005 року для вирощування в зоні Степу України, оригінатором є Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. Сорт інтенсивного типу. Характеризується стійкістю до вилягання і високою посухостійкістю, колос легко вимолочується. Перевищує стандарт за стійкістю до твердої сажки. Середньостиглий – вегетаційний період становить 110 діб. Різновид – лютесценс.

Сорт Рання 93 створено у Національному науковому центрі «Інститут землеробства НААН» методом двократного індивідуального добору з сорту пшениці ярої м'якої Дніпрянка, внесено до Держаного реєстру сортів у 1998 році для вирощування у зонах Лісостепу та Полісся України і визнано національним стандартом. Сорт інтенсивного типу. Ранньостиглий, тривалість вегетаційного періоду становить 86 діб. Різновид – еритроспермум. Характеризується стійкістю до осипання зерна і проростання його в колосі.

Сорт Скороспілка 99 внесено до Державного реєстру сортів України у 2003 році, рекомендовано для вирощування у зонах Лісостепу та Полісся України, оригінатором є Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН». Сорт напівінтенсивного типу. Ранньостиглий, дозріває на 8-9 діб раніше національного стандарту Рання 93. Різновид – еритроспермум. Характеризується стійкістю до осипання зерна і проростання його в колосі.

Сорт Етюд внесений до Державного реєстру сортів України з 2006 року для поширення в Лісостепу та Поліссі з метою отримання зерна на хлібопекарські цілі. Сорт створено шляхом групового та наступних негативних доборів з гібридної популяції ТАМ 200 (США) × Turaco (Мексика) у Миронівському інституті пшениці ім. В. М. Ремесла НААН. Сорт напівінтенсивного типу. Сортотип напівкарликовий, ранньостиглий (виколошується і дозріває раніше національних стандартів – на 5-8 днів середньостиглого сорту Харківська 26 та на 4 дні раніше ранньостиглого –

Рання 93). Різновид – еритроспермум. Стійкий до вилягання, посухи та обсипання.

Сорт Варяг виведений шляхом індивідуального добору з гібридної популяції Саратовская 46 (Росія) × NP876 (Індія). Оригінаторами сорту є Оренбурзький науково-дослідний інститут сільського господарства та Самарський науково-дослідний інститут сільського господарства ім. Н. М. Тулайкова. Сорт інтенсивного типу. З 1997 року сорт Варяг включено у Державний реєстр сортів сільськогосподарських культур РФ по Уральському регіону, а також у список сортів сильної пшениці. Середньостиглий. Різновид – грекум. Чутливий до ураження твердою та пильною сажкою, бурою іржею.

Сорт Sunnan виведений у Швеції (Weibullsholm Breeding Station). Використовується у селекційних установах багатьох країн світу як еталон високої стійкості до борошнистої роси та бурої іржі, високої щільності колоса та пізньостиглості. Різновид – лютесценс.

Досліджувані сорти тритикале ярого мають наступні особливості.

Сорт Аіст харківський – національний стандарт, перший сорт тритикале ярого, який було створено на території України в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. Внесений до Державного реєстру сортів придатних до поширення в Україні у 1995 році. Рекомендована зона вирощування: Північний Степ, Полісся, Лісостеп. Створений методом складної міжродової гібридизації ярої м'якої пшениці, ярого жита з Аргентини та гексаплоїдного тритикале: Харківська 8/Insave//MC1. Середньостиглий, вегетаційний період 95-100 діб. Різновид – еритроспермум.

Сорт Соловей харківський занесений до Державного реєстру сортів з 2006 року, рекомендується для виробництва продовольчого, технічного і фуражного зерна в Лісостепу та Поліссі України. Оригінатор – Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. Сорт створений методом індивідуального добору із популяції складних міжлінійних схрещувань

гексаплоїдних форм Х10ГАС8/ЖЗРА11. Характеризується підвищеною крупністю та скловидністю зерна. Середньостиглий, вегетаційний період 95-100 діб. Різновид – еритроспермум.

Сорт Коровай харківський створений в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН методом складної міжлінійної гібридизації гексаплоїдних ліній Х10ГАС14//С46ВСПХ8РМ/Х8РМ18/15, рекомендується для виробництва продовольчого, технічного і фуражного зерна в Лісостепу та Північному Степу України, в Державному реєстрі сортів з 2007 року. Середньостиглий, вегетаційний період 90-100 діб. Різновид – еритроспермум.

Сорт Жайворонок харківський створений методом індивідуального добору із міжлінійної гібридної популяції НадХ1/Х8ІСЛ16-25 в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. Занесений до Державного реєстру сортів з 2002 року, рекомендований для вирощування у зонах Лісостепу та Північного Степу. Середньостиглий, вегетаційний період 98-100 діб. Різновид – еритроспермум.

Сорт Оберіг харківський створений методом індивідуального добору із популяції складних міжлінійних схрещувань гексаплоїдних форм, оригінатор – Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. Сорт рекомендований для вирощування у Лісостепу та Поліссі України, в Державному реєстрі сортів з 2009 року. Середньостиглий, вегетаційний період 95-102 доби. Різновид – еритроспермум.

Сорт Микола створений методом індивідуального добору із складної комбінації Р 2 (Бапсіога×АД 206)×Весна у науково-виробничому товаристві з обмеженою відповідальністю «Агроінтер», внесений до Державного реєстру сортів у 2006 році. Рекомендований до вирощування в Степу України. Середньостиглий, вегетаційний період 100 діб. Різновид – еритроспермум.

Сорт Лосинівське занесений до Державного реєстру сортів з 2007 року, рекомендується для виробництва продовольчого, технічного і

фуражного зерна в Лісостепу та Поліссі України. Оригінатор – Національний аграрний університет. Середньостиглий, достигає за 93 доби. Різновид – еритроспермум.

2.2 Методи дослідження

Вивчення складу азотфіксувальних мікробних угруповань пшениці ярої та тритикале ярого, виділення діазотрофів. Визначення чисельності діазотрофів проводили у ризосферному ґрунті і ризоплані рослин. Ризосферою вважали шар ґрунту, що безпосередньо оточує корінь. Ризосферні мікроорганізми виділяли з ґрунту, який залишається на коренях після струшування. Ризопланою вважали зону розміщення мікроорганізмів, які розвиваються на поверхні коренів за рахунок кореневих виділень. Для ізоляції мікроорганізмів з ризоплани корені рослин пшениці та тритикале ретельно промивали водогінною водою протягом 15 хвилин і ополіскували стерильною водою.

Облік чисельності азотфіксувальних бактерій проводили за загальноприйнятими у ґрунтовій мікробіології методами, а також з використанням прийомів, описаних в оригінальних роботах авторів [38, 54, 143, 161, 175].

Бактерії роду *Azospirillum* виділяли на картопляне агаризоване середовище з цукрозою і бурштиновою кислотою (2,5 %) і на агаризоване середовище з конго червоним [143], флуоресціюючі псевдомонади – на середовище з гліцерином (0,1 %), лактатом амонію (0,025%) і глутаматом натрію (0,05%) [175], азотобактер – на діагностичне середовище [161].

Додатково виділяли діазотрофи із накопичувальних культур після визначення їхньої нітрогеназної активності [39], використовуючи вищезазначені живильні середовища.

Вивчення морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей діазотрофів кореневої зони пшениці ярої та тритикале ярого проводили загальноприйнятими у ґрунтовій мікробіології методами [53, 54].

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

Електронна мікроскопія. Електронномікроскопічні дослідження клітин *A. brasilense* 10/1 проводили методом негативного контрастування уранілацетатом. Використовували 3-добові культури, які вирощували на скосах картопляного агару. Бактеріальну масу на кінчику мікробіологічної петлі розтирали у краплі стерильної води. На мідні опорні решітки з формваровою плівкою-підкладкою наносили суспензію клітин і витримували їх протягом 3 хвилин. Контрастування проводили також протягом 3 хвилин. Надлишок рідини видаляли за допомогою фільтрувального паперу та висушували на повітрі. Клітини *A. brasilense* 10/1 проглядали в електронному мікроскопі ЕМ-125 (Україна) за інструментального збільшення × 15000.

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

Для виділення сумарної ДНК використовували набір «ДНК-сорб В» згідно з протоколом виробника.

Для полімеразної ланцюгової реакції застосовували універсальні праймери: pA 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 (8-27) та pA 5-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3 (1542-1523). Робоча концентрація праймерів становила 5 пМ/мкл.

Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі GeneAmp PCR System 2720. Реакційна суміш для ПЛР складалася з 5 мкл ПЛР-буферу, 2,5 мкл дНТФ, 1 мкл суміші праймерів, 0,2 мкл *Taq* ДНК-полімерази і 1 мкл зразка ДНК.

ПЛР проводили в такий спосіб: первинна денатурація 95 °С – 3 хв, далі 30 циклів (95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 2 хв), кінцева елонгація –

72 °С – 10 хв. ПЛР-продукти розділяли за допомогою горизонтального електрофорезу у 1,5 % агарозі з ТЕ-буфером і додаванням 75 мкг бромистого етидію.

Для екстрагування продуктів ПЛР з агарозного гелю вирізані фрагменти, що містили ДНК, поміщали в пробірки на 1,5 мл і додавали 500 мкл лізуючого розчину та інкубували 5 хв при температурі 65 °С, а потім центрифугували протягом 1 хв при 4000 об/хв. Супернатант видаляли. Осад промивали послідовно розчинами №1 та №2 і видаляли залишки розчину центрифугуванням протягом 1 хв при 14000 об/хв.

Нуклеотидні послідовності отриманих ПЛР-продуктів визначали на автоматичному сиквенаторі ABI Prism 3130 (“Applied Biosystems”, США). Послідовності аналізували за допомогою програми BLAST шляхом порівняння з послідовностями міжнародної бази даних GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/).

Азотфіксувальну активність мікроорганізмів у чистій культурі і в асоціації з рослинами визначали методом редукції ацетилену [169] на газовому хроматографі “Chrom–4” з полум’яно-іонізаційним детектором. Колонка довжиною 370 см була заповнена β-β'-оксидіпропіонітрилом. Температура термостату 50^{o}С, газ-носій – азот, витрата газів (в мл/хвилину): водню – 30, азоту – 100, повітря – 500.

Для визначення азотфіксувальної активності мікроорганізмів у чистій культурі у флакони з 10 мл напіврідкого середовища Доберейнер додавали по 1 мл бактеріальної суспензії з титром 3-5·10^{8}, культивували за температури 26-28 °С упродовж 72 годин. Флакони герметизували, вводили ацетилен (10% від об'єму флакона) і інкубували протягом доби. Після закінчення строку інкубації зразки аналізували на газовому хроматографі.

Потенційну нітрогеназну активність у ризосферному ґрунті і на відмитих коренях рослин ярих пшениці та тритикале визначали за додавання напіврідкого живильного середовища Доберейнер [52].

Внутрішньосортову мінливість тритикале ярого за здатністю

підтримувати процес асоціативної азотфіксації у кореневій зоні рослин оцінювали за розробленим нами методом [71].

Вивчення здатності азоспірил продукувати фізіологічно активні речовини проводили методом біотестів [8, 66].

Визначення вмісту хлорофілів *a* і *b* у прапорцевих листках пшениці ярої та тритикале ярого проводили спектрофотометричним методом [25].

Глутамінсинтетазну активність у тканинах листків рослин пшениці та тритикале оцінювали фосфатним методом [32]. Інкубаційна суміш (кінцевий об'єм 3,4 мл) містила: 100мМ трис-HCl, pH 7,2; 150 мМ моноглутамату натрію; 7,5 мМ NH_4Cl; 10 мМоль АТР; 10 мМоль $MgCl_2$. Реакцію зупиняли внесенням 0,5 мл 20 % трихлороцтової кислоти. В освітленому центрифугуванням розчині визначали вміст фосфору (Р) молібденовим реактивом за утворенням фосфорно-молібденового комплексу.

Обрахунки проводили за формулою:

$$A = \frac{P_{станд.}\,(D_{досл.} - D_{контр.})\cdot V\cdot 1000}{D_{станд.}\cdot m_{білка}\cdot M\,(P)}$$

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

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

$D_{дослід.}$ – оптична густина досліджуваних розчинів;

$D_{контр.}$ – оптична густина розчинів, в яких реакція була зупинена одразу додаванням трихлороцтової кислоти;

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

V – об'єм інкубаційної суміші;

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

M (P) – молярна маса фосфору, г/моль;

1000 – коефіцієнт для перерахунку мг у мкг;

Вміст білка в листках рослин визначали за Лоурі за використання реактива Фоліна [205].

Вміст азоту, фосфору і калію, білка і сирої клейковини в зерні

визначали за допомогою інфрачервоного спектрофотометру ИКС-4250 в ННЦ "Інститут ґрунтознавства та агрохімії імені О. Н. Соколовського".

Біометричні показники рослин визначали вимірювально-ваговим методом. Збирання та облік урожаю проводили прямим методом (зважування продукції з облікової ділянки). З метою дослідження структурних показників урожаю тритикале ярого з кожного варіанту відбирали по 100 типових рослин. Визначали висоту рослини, довжину колоса, кількість і масу зерен в колосі, масу 1000 зерен [51].

За методичну основу розрахунків економічної ефективності бактеризації тритикале ярого новим штамом *A. brasilense* 10/1 використовували методики, які ґрунтуються на традиційному підході порівняння результату від певного агроприйому із витратами на його проведення. Аналіз економічної ефективності застосування *A. brasilense* 10/1 для інокуляції тритикале ярого здійснено за середніми даними польових дослідів за три роки.

Під час моделювання витратної частини технологічні операції та витрати ресурсів прийнято за нормативами ННЦ "Інститут аграрної економіки НААН " [99, 100] з відповідним коригуванням операцій (згідно технології) та включенням додаткових прямих і накладних витрат, пов'язаних із застосуванням бактеризації насіння.

Визначення енергетичної ефективності бактеризації тритикале *A. brasilense* 10/1 проводили за відповідними методиками [14, 92]. Для цього технологічні операції (час роботи техніки та знарядь) і витрати ресурсів (що були використані для економічної оцінки) були перераховані нами в енергетичні еквіваленти.

2.3 Умови проведення вегетаційних і польових дослідів

Вегетаційні досліди.

Вивчення ефективності інокуляції пшениці ярої та тритикале ярого новим активним штамом *A. brasilense* 77. Дослід проводили у вегетаційному

будиночку у посудинах ємністю 1100 $см^3$, наповнених чорноземом вилугуваним неглибоким легкосуглинковим на лесовидних суглинках, який характеризувався наступними агрохімічними показниками: вміст гумусу становив 3,6 %, рухомих форм фосфору (за Кирсановим) − 210-240 мг P_2O_5, обмінного калію (за Кирсановим) − 160-170 мг K_2O на 1 кг ґрунту, $pH_{водне}$ − 6,5. Вологість ґрунту підтримували на рівні 60 % від повної вологоємності. Повторність шестикратна. У досліді використовували пшеницю яру сорту Варяг і тритикале яре сорту Оберіг харківський. Інокуляцію насіння здійснювали тридобовою культурою штаму діазотрофів *A. brasilense* 77, яку вирощували на рідкому живильному середовищі з меласою та кукурудзяним екстрактом, із розрахунку 200 тис. бактеріальних клітин на одну насінину. Тривалість досліду – 50 діб після посіву.

Визначали потенційну нітрогеназну активність у кореневій зоні зазначених культур, глутамінсинтетазну активність і вміст білка у листках, надземну масу і масу коренів повітряно висушених рослин.

Схема досліду: 1 – пшениця яра (контроль); 2 – пшениця яра, інокульована *A. brasilense* 77; 3 – тритикале яре (контроль); 4 – тритикале яре, інокульована *A. brasilense* 77.

Вивчення ефективності інокуляції тритикале ярого різними штамами азоспірил. У досліді використовували тритикале яре сорту Оберіг харківський і тридобові культури бактерій роду *Azospirillum*, бактеріальне навантаження 200-300 тис. клітин на одну насінину. Ґрунт − дерново-підзолистий пилувато-суспіщаний ($pH_{сольове.}$ − 7,2; вміст гумусу − 1,02 %; P_2O_5 – 330 мг/кг; K_2O – 148 мг/кг). Повторність досліду чотирикратна, тривалість – 30 діб після посіву.

Визначали потенційну нітрогеназну активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого.

Схема досліду: 1 – контроль (без інокуляції); 2 − інокуляція штамами *A. brasilense* 10/1, 10/2, 18-2, 37, 54, 61, 77.

Вивчення впливу різних доз азотних добрив на потенційну нітрогеназну активність у ризосфері тритикале ярого за інокуляції *A. brasilense* 10/1. У досліді використовували тритикале яре сорту Оберіг харківський і тридобову культуру бактерій *A. brasilense* 10/1. Тип ґрунту такий самий, як і у попередньому досліді. Як азотне добриво використовували аміачну селітру. У досліді застосовували наступні дози мінерального азоту: N_{15}, N_{30}, N_{60}, N_{90}, N_{120}.(40 мг мінерального азоту на 1 кг ґрунту еквівалентно внесенню N_{120}). Повторність досліду чотирикратна, тривалість проведення – 30 діб.

Визначали потенційну нітрогеназну активність у ризосфері тритикале ярого.

Схема досліду: I. Контроль (без інокуляції): 1 – без внесення мінерального азоту; 2 – N_{15}; 3 – N_{30}; 4 – N_{60}; 5 – N_{90}; 6 – N_{120}; II. Інокуляція насіння *A. brasilense* 10/1: 1 – без внесення мінерального азоту; 2 – N_{15}; 3 – N_{30}; 4 – N_{60}; 5 – N_{90}; 6 – N_{120}.

Польові досліди.

Дослідження міжсортової мінливості ярих пшениць та тритикале за здатністю забезпечувати асоціативну азотфіксацію у кореневій зоні рослин проводили за умов польового дрібноділянкового досліду. Сорти пшениці ярої досліджували упродовж 2006-2008, тритикале ярого – 2006-2009 років на дослідному полі Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Ґрунт − чорнозем вилугуваний неглибокий легкосуглинковий на лесовидних суглинках (вміст гумусу в орному шарі – 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, $pH_{водне}$ − 6,5). Норма висіву − 5 млн схожих насінин на гектар. Спосіб посіву − вузькорядний, з міжряддям 15 см. Розмір дослідної ділянки 4 $м^2$, розмір облікової ділянки 1 $м^2$, повторність чотирикратна, розміщення ділянок рендомізоване.

У досліді визначали потенційну нітрогеназну активність у

ризосферному ґрунті та на відмитих коренях рослин пшениці ярої та тритикале ярого у фази кущіння, цвітіння і молочної стиглості рослин, вміст хлорофілів *a* і *b* у прапорцевих листках рослин, структурні показники урожаю (висота рослини, довжина колосу, кількість і маса зерен в колосі, маса 1000 зерен) і урожайність досліджуваних сортів.

Схема досліду: сорти пшениці ярої: 1 – Харківська 26; 2 – Героїня; 3 – Рання 93; 4 – Sunnan; 5 – Скороспілка 99; 6 – Етюд; 7 – Варяг; сорти тритикале ярого: 1 – Аіст харківський; 2 – Коровай харківський; 3 – Микола; 4 – Лосинівське; 5 – Жайворонок харківський; 6 – Соловей харківський; 7 – Оберіг харківський.

Вивчення ефективності інокуляції тритикале ярого новим штамом *A. brasilense* 10/1 проводили за умов польового дрібноділянкового досліду у 2009-2010 та 2012 роках на дослідному полі Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Тип ґрунту такий самий як і у попередньому досліді. Сорт тритикале ярого – Оберіг харківський. Норма висіву − 5 млн схожих насінин на гектар. Спосіб посіву − вузькорядний, з міжряддям 15 см. Розмір дослідної ділянки 8 м^2, розмір облікової ділянки 1 м^2, повторність чотирикратна, розміщення ділянок рендомізоване. Інокуляцію насіння проводили за дві години до посіву із розрахунку 200-300 тис. бактеріальних клітин на насінину.

Схема досліду: 1 – контроль (без інокуляції); 2 – інокуляція насіння *A. brasilense* 10/1.

Визначали потенційну нітрогеназну активність на відмитих коренях рослин, структурні показники урожаю, урожайність, вміст азоту, фосфору, калію, білка та сирої клейковини в зерні тритикале ярого.

Планування і проведення польових дослідів проводили за Доспєховим [29]. 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 ($НІР_{05}$) за формулою:

$$НІР_{05} = mdt_{05}$$

md – похибка різниці;

t_{05} – критерій Стьюдента.

РОЗДІЛ 3
АЗОТФІКСУВАЛЬНИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІКРОБНО-РОСЛИННИХ СИСТЕМ ЯРИХ ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ РІЗНИХ СОРТІВ

Азотфіксувальний потенціал рослинно-мікробних систем різних сортів сільськогосподарських злаків залежить як від наявності у складі мікробного ценозу ґрунту активних асоціативних діазотрофів, так і від здатності рослин підтримувати їх ефективне функціонування.

Асоціативні азотфіксатори у рослинно-мікробних взаємодіях виконують різноманітні функції: фіксують атмосферний азот, поліпшують живлення рослин за рахунок підвищення коефіцієнту використання мінерального азоту ґрунту, синтезують біологічно активні речовини, що стимулюють ріст і розвиток кореневої системи, підвищують стійкість рослин до дії патогенів [57, 84, 88, 153, 194].

Рослина, в свою чергу, генетично детермінує склад, кількість і швидкість виділення кореневих ексудатів і кореневого опаду, які є джерелом енергії і живлення мікроорганізмів, синтезує фітогормони, які впливають на життєдіяльність діазотрофів та підвищують здатність коренів до адгезії азотфіксувальних мікроорганізмів [117].

Накопичені досі нечисленні публікації стосовно контролю геномом рослини процесу асоціативної азотфіксації потребують аналізу, доповнення експериментальними даними і оцінки сучасного стану генетики рослин за ознакою асоціативної азотфіксації.

Наші дослідження проводили на прикладі сортів пшениці ярої та тритикале ярого – культур, які мають комплекс цінних господарських ознак, характеризуються підвищеною здатністю до адаптації за несприятливих умов навколишнього середовища, використовуються як страхові при пересіві озимини, здатні формувати і підтримувати активне функціонування азотфіксувального комплексу з ризосферними діазотрофами [45, 107, 120].

3.1 Азотфіксувальна активність у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале

Здатність до асоціативної азотфіксації рослинно-мікробних систем 7 сортів пшениці ярої досліджували упродовж 2006-2008, 7 сортів тритикале ярого – упродовж 2006-2009 років за умов польових дослідів.

Як відомо з літературних джерел, азотфіксувальний потенціал асоціацій небобових рослин з ґрунтовими мікроорганізмами обумовлений активністю процесу фіксації молекулярного азоту в трьох топологічно розділених зонах, які перебувають у постійній взаємодії: у ризосферному ґрунті, на поверхні коренів (ризоплані) та безпосередньо у кореневих тканинах рослин (гістосфері)[78].

Наші дослідження були зосереджені на визначенні потенційної нітрогеназної активності у ризосферному ґрунті і на відмитих коренях рослин пшениці та тритикале. У таблицях 3.1 і 3.2 наведено ПНА у кореневій зоні різних сортів зазначених культур у фазу цвітіння 2007 року.

Таблиця 3.1

Потенційна нітрогеназна активність у кореневій зоні рослин пшениці ярої різних сортів (*фаза цвітіння, 2007 рік*)

Сорт	Ризосферний ґрунт, нмоль етилену на 1 г ґрунту за год	Відмиті корені рослин, нмоль етилену на 1 г коренів за год
Харківська 26	331±21	1069±261
Героїня	279±13	1303±139
Рання 93	389±13	1226±162
Sunnun	378±13	1707±252
Скороспілка 99	398±23	1069±98
Етюд	365±23	1058±31
Варяг	363±19	1381±47

Таблиця 3.2

Потенційна нітрогеназна активність у кореневій зоні рослин тритикале ярого різних сортів (*фаза цвітіння, 2007 рік***)**

Сорт	Ризосферний ґрунт, нмоль етилену на 1 г ґрунту за год	Відмиті корені рослин, нмоль етилену на 1 г коренів за год
Аіст харківський	316±21	1938±224
Коровай харківський	339±18	1213±75
Микола	282±16	1821±127
Лосинівське	228±1	1630±334
Жайворонок харківський	399±24	1639±455
Соловей харківський	339±14	1501±88
Оберіг харківський	453±43	1645±169

З таблиць видно, що потенційна нітрогеназна активність у ризосферному ґрунті рослин ярих пшениць і тритикале не перевищувала 389-453 нмоль етилену на 1 г ґрунту за годину. В той же час на відмитих коренях рослин даний показник коливався в межах 1058-1707 нмоль етилену на 1 г коренів за годину для сортів пшениці ярої (табл. 3.1) і 1213-1928 – для сортів тритикале ярого (табл. 3.2). Як свідчать результати багаторічних польових дослідів, фіксація молекулярного азоту в ризоплані перевищувала таку у ризосферному ґрунті в середньому у 3-6 разів.

Згідно поглядів Дж. Доберейнер, асоціації діазотрофів з рослинами називаються екзоризосферними, якщо нітрогеназна активність переважає у ризосферному ґрунті, а у разі локалізації бактерій-азотфіксаторів на поверхні коренів рослин або безпосередньо у кореневих тканинах – ендоризосферними [165]. Дійсно, вивчаючи азотфіксувальну активність у ризоплані, ми фактично одержуємо уявлення щодо активності діазотрофів як на поверхні коренів рослин, так і тих, що локалізовані у внутрішніх

тканинах кореня. Як свідчать одержані нами результати, сумарно їх внесок у ПНА досліджуваних сортів був більш вагомим, ніж внесок мікроорганізмів, екологічною нішею яких є ризосферний ґрунт.

Проведені дослідження дозволяють зробити висновок, що асоціативні системи "пшениця яра – діазотрофи кореневої зони" і "тритикале яре – діазотрофи кореневої зони" можна віднести до ендоризосферного типу.

Зважаючи на вище сказане, надалі наша увага була зосереджена на дослідженні потенційної нітрогеназної активності саме на відмитих коренях рослин ярих пшениць та тритикале.

Міжсортову мінливість за активністю асоціативної азотфіксації досліджуваних сільськогосподарських культур визначали у найбільш фізіологічно активний період розвитку рослин – фазу цвітіння.

Аналіз даних потенційної нітрогеназної активності у ризоплані ярих пшениць упродовж 2006-2008 років показав, що коефіцієнт варіації (Vp) зазначеного показника у досліджуваній вибірці сортів становив від 18 до 56 % з середнім значенням ($\bar{x}$) – 501-1323 нмоль етилену на 1 г коренів за годину у різні роки досліджень (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Міжсортова мінливість потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях рослин пшениці ярої *(фаза цвітіння, польові досліди, 2006-2008 рр.)*

Рік	$\bar{x} \pm S_x$, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Vp, %	lim, нмоль етилену на 1 г коренів за год
2006	638±98	41	242…975
2007	1323±88	18	1069…1707
2008	501±106	56	137…882

Подібні результати були одержані і щодо варіабельності потенційної нітрогеназної активності у ризоплані ярих тритикале, яку досліджували протягом 2006-2009 років (табл. 3.4). Як видно з таблиць 3.3 і 3.4, характер варіювання ПНА змінювався залежно від року досліджень і мало відрізнявся між ярими пшеницями та тритикале.

Таблиця 3.4

Міжсортова мінливість потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях рослин тритикале ярого *(фаза цвітіння, польові досліди, 2006-2009 рр*

Рік	$\bar{x} \pm S_x$, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Vp, %	lim, нмоль етилену на 1 г коренів за год
2006	569±119	56	256…1068
2007	1628±88	14	1213…1938
2008	484±73	39	249…778
2009	1057±222	55	479…2027

При більш детальному аналізі багаторічних даних нашу увагу привернули значні флуктуації потенційної нітрогеназної активності у ризоплані рослин ярих пшениць та тритикале в межах сорту упродовж вегетаційного періоду та під час однієї фенофази у різні роки досліджень.

На рис. 3.1 представлено динаміку ПНА на відмитих коренях рослин тритикале ярого упродовж вегетаційного періоду 2008 року. Різниця за даним показником між досліджуваними сортами в окремі фази розвитку рослин підтверджує наявність міжсортової мінливості тритикале ярого. Коефіцієнт варіації потенційної активності нітрогенази у вибірці

досліджуваних сортів становив: у фазу кущіння – 47, цвітіння – 39, молочної стиглості – 46 % (рис. 3.1).

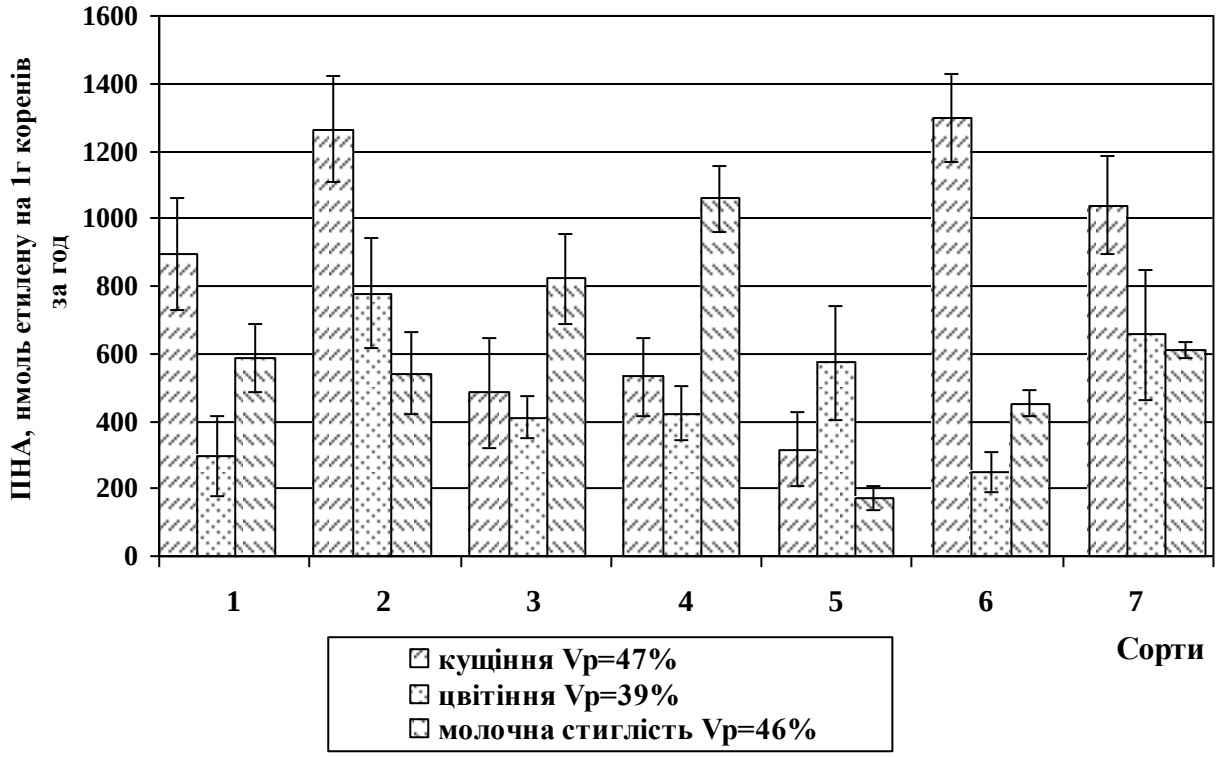


Рис. 3.1 Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого різних сортів *(польовий дослід, 2008 рік)*:

1 – Аіст харківський; 2 – Коровай харківський; 3 – Микола; 4 – Лосинівське;

5 - Жайворонок харківський; 6 – Соловей харківський; 7 – Оберіг харківський.

При цьому, ПНА на відмитих коренях рослин окремо взятих сортів упродовж вегетаційного періоду варіювала на рівні 31-83 %, що нівелювало прояв міжсортової варіабельності (рис. 3.1).

Аналіз багаторічних результатів ПНА у ризоплані рослин у фазу цвітіння показав, що діапазон коливання зазначеного показника за роками досліджень становив для різних сортів пшениці від 31 до 97, тритикале – від 41 до 88 % (табл. 3.5, 3.6). Тож флуктуації потенційної активності нітрогенази в межах одного сорту і в даному випадку були більш істотними, ніж величина міжсортового варіювання (табл. 3.3-3.6).

Таблиця 3.5

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

Сорт	$\bar{x} \pm S_x$, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Vp, %	lim, 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

Таблиця 3.6

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

Сорт	$\bar{x} \pm S_x$, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Vp, %	lim, нмоль етилену на 1 г коренів за год
Соловей харківський	723±273	76	249…1501
Микола	872±333	76	404…1821
Аіст 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

Згідно середніх багаторічних даних, найвищим азотфіксувальним потенціалом серед сортів пшениці ярої характеризувався сорт Варяг, найнижча азотфіксувальна активність була властива сорту Харківська 26 (табл. 3.5). Серед сортів тритикале ярого максимальну ПНА на відмитих коренях рослин проявив сорт Лосинівське, мінімальна була відмічена для сорту Соловей харківський (табл. 3.6).

В окремі роки досліджень нами була відмічена тенденція до більш істотного коливання показника ПНА протягом вегетації у сортів пшениці з низьким потенціалом азотфіксації [23]. Як свідчать дані, наведені у табл. 3.5, сорт Харківська 26 характеризувався значними флуктуаціями потенційної активності нітрогенази не тільки під час вегетаційного періоду, але і у фазу цвітіння у різні роки досліджень (коефіцієнт варіації Vp становив 97 %). ПНА у ризоплані сорту Варяг, навпаки, стабільно приймала високі значення (коефіцієнт варіації Vp не перевищував 31 %).

Коефіцієнт кореляції між величиною потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях рослин пшениці ярої та її варіабельністю (r) становив (-0,74), що характеризує зв'язок як тісний (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Коефіцієнт кореляції (r) між величиною ПНА на відмитих коренях рослин та її варіабельністю

Ярі пшениці	Ярі тритикале
-0,74	-0,47

Примітка: коефіцієнт кореляції (r), вірогідний при P<0,05, виділено жирним шрифтом

Щодо сортів тритикале ярого, між ПНА і варіабельністю даного показника була відмічена лише тенденція до зворотного зв’язку(табл. 3.7).

Значний діапазон коливання азотфіксувальної активності може бути обумовлений наступними чинниками. По-перше, закономірною

перебудовою азотфіксувального мікробного угруповання, що спричинена зміною складу та кількості кореневих ексудатів в онтогенезі рослин [232]. По-друге, впливом факторів навколишнього середовища як на загальний стан рослин і перебіг всіх біологічних процесів у діазотрофів, асоційованих з коренями цих рослин, так і на функціонування рослинно-мікробної асоціації в цілому [76, 86]. По-третє, існуванням внутрішньосортової мінливості за здатністю до асоціативної азотфіксації [60, 117].

До того ж, варіабельність азотфіксувальної активності в межах сорту може значно посилюватися за рахунок локального та нерівномірного поширення асоціативних азотфіксаторів у відкритому ґрунті.

3.2 Вплив абіотичних і біотичних чинників на потенційну нітрогеназну активність у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале

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 ^{0}C), максимальна активність нітрогеназного ферментного комплексу спостерігається за температури 28-30 ^{0}C. Тому підвищення температури повітря позитивно відбивається на азотфіксувальній активності у кореневій зоні пшениці ярої та 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 [97]. Експериментально було доведено, що ефективність зволоження ґрунту для процесу азотфіксації стрімко зростає за високих температур і знижується за низьких [41]. Зважаючи на те, що в природних умовах існують значно складніші поєднання багатьох чинників, виокремити 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. 3.8).

Таблиця 3.8

Дані метеоспостережень за травень-червень 2006-2008 рр.

Місяць	Декада	Температура повітря, ^{0}C			Температура ґрунту на глибині 10 см, ^{0}C			Опади, мм		
		2006	2007	2008	2006	2007	2008	2006	2007	2008
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

Примітка: підвищення температур повітря, ґрунту і кількості опадів у травні-червні 2007 року виділено жирним шрифтом

Як свідчать дані табл. 3.8, 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 1,7-1,9 ^{0}C 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 у кореневій зоні ярих пшениць та тритикале, фаза цвітіння яких припадала на кінець травня – початок червня (рис. 3.2, 3.3). Так, потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин у фазу цвітіння 2007 року істотно переважала активність фіксації молекулярного азоту у 2006 та 2008 роках.

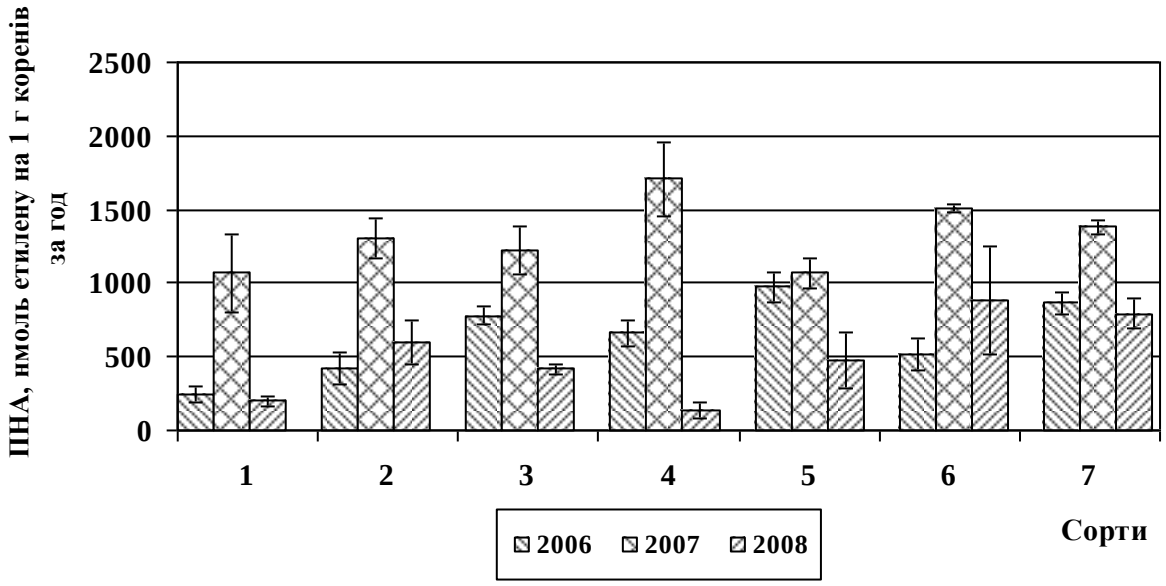


Рис. 3.2 Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин пшениці ярої різних сортів *(фаза цвітіння, польові досліди 2006-2008 рр.)*:

1 – Харківська 26; 2 – Героїня; 3 – Рання 93; 4 – Sunnan;

5 – Скороспілка 99; 6 – Етюд; 7 – Варяг.

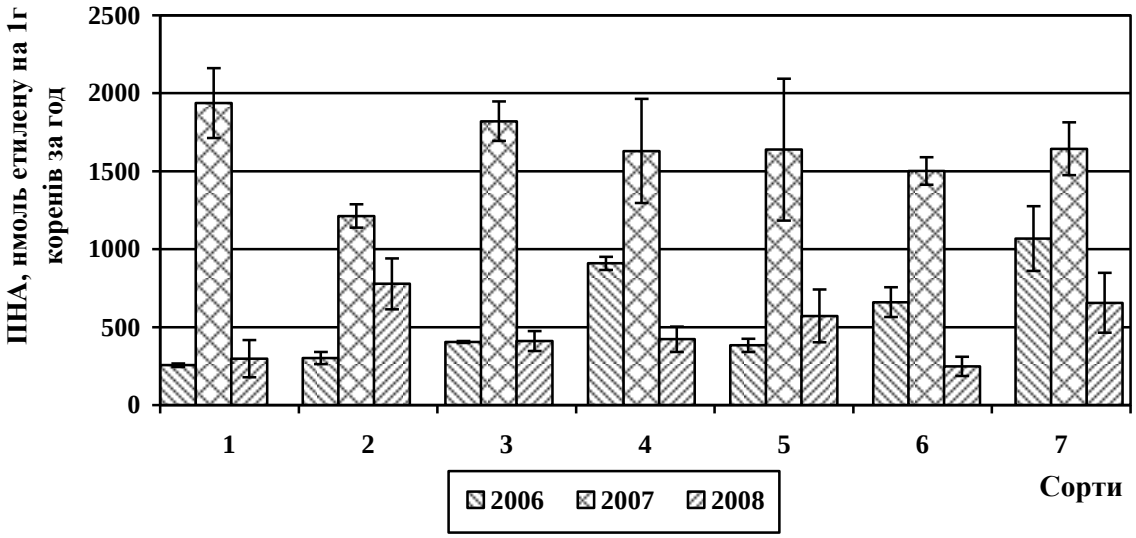


Рис. 3.3 Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого різних сортів

(фаза цвітіння, польові досліди 2006-2008 рр.):

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

Звертають на себе увагу сорти пшениці Харківська 26 і Sunnan, тритикале – Аіст харківський і Микола, азотфіксувальна активність на відмитих коренях яких підвищилася у 2007 році порівняно з 2006 і 2008 роками у 3-10 разів.

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 ярих пшениць та тритикале у фазу цвітіння (табл. 3.9).

Як видно з таблиці 3.9, потенційна активність нітрогенази у кореневій зоні зазначених культур 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 ^{0}C, наступне її підвищення призводить до зниження активності

азотфіксації, що пов’язано з температурним оптимумом нітрогеназного ферментного комплексу [41]. Зв’язок між ПНА і середньою кількістю опадів у травні 2006-2008 років характеризувався за співвідношенням Чеддока як помітний [6].

Таблиця 3.9

Коефіцієнти кореляції (r) між ПНА у ризоплані рослин у фазу цвітіння та середньомісячними показниками температури і кількості опадів у травні *(польові досліди, 2006-2008 рр.)*

Показники		Температура повітря, ^{0}C	Температура ґрунту на глибині 10 см, ^{0}C	Опади, мм
ПНА на відмитих коренях рослин, нмоль етилену на 1 г коренів за 1 год	Пшениця яра	0,83	0,77	0,62
	Тритикале яре	0,91	0,87	0,62

Примітка: усі наведені у таблиці коефіцієнти кореляції (r) вірогідні при $P<0,05$

Поряд з істотним підвищенням потенційної нітрогеназної активності за оптимального для асоціативної азотфіксації режиму температури і зволоження ґрунту, варіабельність даного показника у 2007 році знизилася до 14 і 18 % у вибірках сортів тритикале та пшениці відповідно (табл. 3.3, 3.4).

Як відомо з літературних джерел, процеси азотфіксації і фотосинтезу тісно пов’язані між собою, адже продукти фотосинтезу рослин є субстратом для діазотрофів їх кореневої зони.

Вміст хлорофілів у листі є одним з показників, що дозволяє оцінити інтенсивність процесу фотосинтезу і є безпосереднім діагностичним показником стану рослин а також умов, у яких вони перебувають. Відомо,

що обробка посівів гербіцидними препаратами призводить до зниження вмісту фотосинтетичних пігментів у тканинах зеленої рослини, і такі зміни зберігаються протягом всього онтогенезу [30, 119]. Оптимізація азотного живлення навпаки сприяє підвищенню вмісту хлорофілів у листках рослин.

При дослідженні фотосинтетичних показників у гетерозисних гібридів м'яких пшениць, виявлено підвищений (до 45 %) вміст хлорофілів у високопродуктивних форм. Важливе значення мав якісний склад пігментів і міцність їх зв'язку з білком: підвищення вмісту міцнозв'язаного хлорофілу *а,* тенденція до підвищення його частки у загальному вмісті хлорофілів певною мірою може бути пов'язана з ефективністю діяльності реакційних центрів фотосистем [40].

Згідно результатів досліджень Даштоян Ю. В., в межах однойменних листків можуть спостерігатися сортові розбіжності за вмістом хлорофілів *а* і *в,* величиною співвідношення між ними, що обумовлено генотипом сорту, ступенем його пластичності та стійкості до екзогенних факторів середовища [27].

Існують поодинокі відомості про існування кореляційних зв'язків між інтенсивністю фотосинтезу, чисельністю діазотрофів, вмістом АТФ і активністю азотфіксації в кореневій зоні злакових рослин [34, 89]. У дослідженнях генетичної детермінації азотфіксувальної активності, проведених з ячменем, найбільшу кількість низькоактивних щодо асоціативної азотфіксації генотипів було виявлено серед ліній, що несли мутацію за вмістом хлорофілу [117].

Різниця у вмісті хлорофілів у прапорцевих листках становила інтерес з огляду на можливість існування зв'язку з потенційною нітрогеназною активністю у кореневій зоні рослин досліджуваних сортів пшениці та тритикале.

Тому поряд з ПНА у кореневій зоні різних сортів пшениці ярої і тритикале ярого вивчали вміст хлорофілів *a* і *b* у прапорцевих листках рослин у фазу цвітіння, під час якої коренева ексудація набуває свого

максимуму.

Аналіз одержаних даних показав, що сорти пшениці з високим потенціалом азотфіксації – Етюд і Варяг – у всі роки досліджень перевищували за сумарним вмістом хлорофілів *a* і *b* у прапорцевих листках сорт Харківська 26, що характеризувався низькою ПНА (табл. 3.10). В середньому різниця становила 24-32 %.

Таблиця 3.10

Вміст хлорофілів у прапорцевих листках рослин пшениці ярої *(польові досліди 2006-2008 рр.)*

Сорт пшениці	Сума хлорофілів (*a*+*b*), мг/100г сирої речовини		
	2006 р.	2007 р.	2008 р.
Харківська 26	272,8	218,3	229,5
Етюд	**343,6**	**260,1**	**298,2**
Варяг	**332,9**	**269,8**	**272,1**
$НІР_{0,5}$	28,3	25,7	29,4

Примітка: вірогідно підвищений вміст хлорофілів виділено жирним шрифтом

Кореляційний аналіз усієї досліджуваної вибірки сортів пшениці ярої підтвердив існування тенденції до підвищеного вмісту хлорофілів у листках пшениці тих сортів, які характеризувалися підвищеною потенційною нітрогеназною активністю у ризоплані (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Коефіцієнти кореляції (r) між ПНА у ризоплані у фазу цвітіння і сумарним вмістом хлорофілів у листках ярих пшениць

(польові досліди, 2006-2008 рр.)

2006 р.	2007 р.	2008 р.
0,41	0,72	0,49

Примітка: всі наведені коефіцієнти кореляції (r) не вірогідні при $P<0,05$

Так, коефіцієнт кореляції вмісту хлорофілів у прапорцевих листках і ПНА на відмитих коренях рослин пшениці становив від 0,41 до 0,72 у різні роки досліджень.

Дані про вміст хлорофілів у листках рослин тритикале ярого наведено у таблиці 3.12.

Таблиця 3.12

Вміст хлорофілів у прапорцевих листках рослин тритикале ярого

Сорт тритикале	Сума хлорофілів (*a*+*b*), мг/100г сирої речовини			
	2006 р.	2007 р.	2008 р.	2009 р.
Соловей харківський	253,5	187,7	226,6	267,2
Оберіг харківський	**305,9**	**218,7**	223,0	281,7
Жайворонок харківський	271,7	**215,1**	225,1	**286,5**
Лосинівське	248,9	**210,8**	**281,2**	**305,8**
$НІР_{0,5}$	25,6	19,3	29,3	14,1

Примітка: вірогідно підвищений вміст хлорофілів виділено жирним шрифтом

Звертає на себе увагу, що сорту Соловей харківський, який у фазу цвітіння 2006-2009 років досліджень характеризувався найнижчою потенційною нітрогеназною активністю, властивий і невисокий вміст хлорофілів у прапорцевих листках рослин (табл. 3.6, 3.12). Сорти Оберіг харківський, Жайворонок харківський і Лосинівське, потенційна активність нітрогенази у ризоплані яких в середньому перевищувала 1000 нмоль етилену на 1 г коренів за годину, характеризувалися підвищеним вмістом в окремі роки досліджень (табл. 3.6, 3.12). Так, вміст хлорофілів у листках рослин сорту Оберіг харківський за результатами 2006-2007 років був

найвищим, а у 2008-2009 роках, навпаки, приймав найнижчі значення у вибірці сортів.

Проте, істотних кореляційних зв'язків між вмістом хлорофілів у прапорцевих листках і потенційною нітрогеназною активністю на відмитих коренях рослин ярих тритикале нами виявлено не було, коефіцієнт кореляції зазначених показників у різні роки досліджень не перевищував 0,35 (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Коефіцієнти кореляції (r) між ПНА у ризоплані у фазу цвітіння і сумарним вмістом хлорофілів у листках ярих тритикале

(*польові досліди, 2006-2009 рр.)*

2006 р.	2007 р.	2008 р.	2009 р.
0,21	0,35	-0,03	0,23

Примітка: всі наведені коефіцієнти кореляції (r) не вірогідні при $P<0,05$

В селекційній роботі традиційно враховуються такі ознаки як висота рослин, кількість і маса зерен в колосі, крупність, білковість. Такий важливий фактор як здатність до фіксації атмосферного азоту селекціонери не беруть до уваги. Щоб полегшити пошук генотипів-донорів високої нітрогеназної активності, дослідники вивчали можливість існування маркерних ознак, які б опосередковано вказували на рівень прояву азотфіксувальної здатності [77, 79, 87, 117].

Для виявлення зв'язків між потенційною нітрогеназною активністю на відмитих коренях та селекційними ознаками рослин, вмістом загального азоту і білку у зерні тритикале ярого, ми провели кореляційний аналіз за даними окремих років досліджень і за трирічними даними (табл. 3.14, ДОДАТКИ А.1-А.5). Це дозволило не тільки врахувати співвідношення рівня азотфіксувальної активності та прояву селекційних ознак у

досліджуваній вибірці сортів, але і з'ясувати, чи пов'язані між собою зміни зазначених показників у різні роки досліджень і яку спрямованість має даний зв'язок.

Таблиця 3.14

Коефіцієнти кореляції (r) між ПНА на відмитих коренях рослин тритикале ярого та селекційними ознаками

Селекційні ознаки	ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год			
	2007 р.	2008 р.	2009 р.	Дані за три роки
Висота рослини, см	-0,50	-0,06	-0,04	-0,38
Довжина колосу, см	0,17	-0,39	-0,12	-0,39
Кількість зерен в колосі, шт.	**0,79**	-0,39	-0,38	-0,38
Маса зерен з колосу, г	**0,82**	-0,33	**-0,72**	**-0,49**
Маса 1000 зерен	0,09	0,18	-0,21	-0,35

Примітка: коефіцієнти кореляції, вірогідні при $P<0,05$, виділено жирним шрифтом

Як свідчать дані, представлені у таблиці 3.14, між рівнем ПНА у ризоплані та висотою рослин тритикале ярового не виявлено істотних кореляцій. Тільки у 2007 році спостерігалася тенденція до зворотного кореляційного зв'язку між зазначеними показниками. Загалом, за трирічними даними, відмічено тенденцію до підвищення рівня асоціативної азотфіксації у кореневій зоні рослин тритикале ярого різних сортів при зниженні їх висоти.

Між селекційними ознаками висота рослин та кількість зерен в колосі встановлено істотний негативний кореляційний зв'язок від (-0,83) до (-0,67)

у різні роки досліджень, тобто короткостеблі сорти характеризувалися підвищеною кількістю зерен в колосі порівняно з високостеблими (ДОДАТКИ А.1-А.3). При цьому, флуктуації показників висоти рослин та кількості зерен в колосі упродовж 2007-2009 років досліджень були мало пов'язані між собою, про що свідчить низький коефіцієнт кореляції r (-0,28) (ДОДАТОК А.5). Імовірно, для сортів тритикале ярого зазначений зв'язок закріплений генетично.

Істотна позитивна кореляція була встановлена між висотою рослин тритикале та масою 1000 зерен (r=0,76) за результатами 2009 року (ДОДАТОК А.3). У 2007 і 2008 роках відмічено тенденцію до позитивного зв'язку між даними показниками: коефіцієнти кореляції (r) становили відповідно 0,45 і 0,44 (ДОДАТОК А.1-А.2). Кореляційний зв'язок між висотою рослин тритикале та масою 1000 зерен, встановлений за трирічними даними, можна охарактеризувати як помітний – коефіцієнт кореляції (r) становив 0,64 (ДОДАТОК А.5). Імовірно, збільшення висоти рослин тритикале у окремі роки досліджень пов'язано саме з посиленням їх габітусу за умов, сприятливих для формування урожаю та його параметрів.

Кореляційний аналіз не показав існування істотних зв'язків між рівнем ПНА у кореневій зоні тритикале ярого та довжиною колосу рослин досліджуваних сортів (табл. 3.14). Звертають на себе увагу істотні негативні кореляції довжини колосу з кількістю і масою зерен з колосу і масою 1000 зерен, встановлені за результатами 2007-2009 років досліджень (ДОДАТОК А.5). Формування колосу з більш довгими вістями, очевидно, пов'язано з захисною функцією від несприятливих погодних умов в окремі роки досліджень. У видовженому колосі утворювалася менша кількість повноцінних зернівок, і вони мали нижчу масу (ДОДАТОК А.5).

Суперечливий результат було одержано щодо кореляції ознак кількість зерен в колосі і маса зерен з колосу з рівнем асоціативної азотфіксації у кореневій зоні рослин тритикале ярого. Так, за даними 2007 року, вегетаційний період якого характеризувався сприятливими для

асоціативних діазотрофів погодними умовами, встановлено істотні тісні позитивні кореляційні зв'язки між даними показниками (табл. 3.14). У 2008 і 2009 роки досліджень кореляції мали негативну спрямованість. А за результатами 2009 року між рівнем ПНА у ризоплані і масою зерен з колосу було встановлено істотний тісний негативний зв'язок. Аналіз трирічних даних потенційної нітрогеназної активності на відмитих коренях рослин і маси зерен з колосу різних сортів тритикале ярого показав існування помірного негативного зв'язку (коефіцієнт кореляції (r) становив (-0,49)).

Вміст загального азоту та білку в зерні тритикале ярого різних сортів визначали у 2007 році, що характеризувався високими показниками і низькою варіабельністю потенційної нітрогеназної активності між досліджуваними сортами (1213-1938 нмоль етилену на 1 г коренів за годину) і у 2009 році, коли ПНА у ризоплані сортів відрізнялася більш істотно (479-2027 нмоль етилену на 1 г коренів за годину) (табл. 3.4).

Коефіцієнти кореляції між рівнем асоціативної азотфіксації та вмістом загального азоту і вмістом білка в зерні тритикале, встановлені за даними 2007 і 2009 років, мало відрізнялися між собою і свідчили про існування тенденції до помірного позитивного зв'язку між зазначеними показниками (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Коефіцієнти кореляції (r) між ПНА на відмитих коренях та вмістом загального азоту і білка в зерні тритикале ярого

Показники	2007 р.	2009 р.
Вміст загального азоту в зерні, %	0,37	0,35
Вміст білка в зерні, %	0,38	0,42

Примітка: всі наведені коефіцієнти кореляції (r) не вірогідні при $P<0,05$

З літератури відомо, що підвищення урожаю зерна пшениць, вівсів, ячменів та інших злаків супроводжується істотним зниженням білка в зерні [115, 139, 206]. Кореляція між крупністю зерна (масою 1000 зерен) злакових

культур і вмістом білка у ньому також, як правило, має негативну спрямованість [206]. Результати досліджень, проведених нами з сортами тритикале ярого, узгоджуються з наведеними літературними даними. Так, у 2009 році спостерігалася тенденція до підвищеного вмісту білка в зерні сортів тритикале, що характеризувалися невисокою крупністю та урожайністю (ДОДАТОК А.3).

3.3 Внутрішньосортовий поліморфізм тритикале ярого за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію

Як нами було показано вище, флуктуації потенційної нітрогеназної активності у кореневій зоні ярих пшениць і тритикале упродовж вегетації та у різні роки досліджень були обумовлені впливом чинників навколишнього середовища. Проте зазначена причина не пояснює значної розбіжності між значеннями ПНА у ризоплані рослин одного сорту в межах одного вимірювання за одних і тих самих погодних умов.

З літератури відомо про існування внутрішньосортової мінливості зернових культур за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію [60, 117]. Так, В. К. Шумним у дослідженні ярого ячменю встановлено, що контрастні за nis-ознакою сорти відрізнялися між собою у 40 разів, при цьому спектр мінливості рослин за нітрогеназною активністю у межах сорту складав 0-500 нмоль етилену на одну рослину за годину [117]. О.В. Надкерничною було показано існування міжсортової мінливості озимого жита від 0 до 600 %, при цьому різниця за азотфіксувальною активністю між сім'ями одного сорту становила від 0 до 330 % [60].

Перед нами постало завдання вияснити, чи характерний перспективним сортам тритикале ярого внутрішньосортовий поліморфізм щодо здатності підтримувати процес асоціативної азотфіксації, чи вони є гомогенними за даною ознакою. Щоб одержати відповідь на дане запитання, ґрунтуючись на даних літератури і експериментальних даних, ми розробили і запропонували спосіб оцінки азотфіксувального потенціалу асоціативних систем "діазотрофи – рослина" залежно від сорту зернової культури [71].

Польовий метод визначення асоціативної азотфіксації пов’язаний з впливом неконтрольованих факторів, характеризується трудомісткістю і значною тривалістю у часі, що унеможливлює одночасний аналіз значної кількості зразків. Зважаючи на це, нами було запропоновано оцінювати азотфіксувальний потенціал рослинно-мікробних систем різних сортів і вивчати внутрішньосортову мінливість зернових культур за nis-ознакою, базуючись на визначенні ПНА на коренях рослин, що були вирощені за умов лабораторних та вегетаційних дослідів.

Лабораторний експрес-метод з використанням рулонної культури дає змогу оцінити за азотфіксувальною активністю на коренях рослин велику кількість генотипів окремого досліджуваного сорту, дозволяє уникнути багатьох операцій, пов’язаних з ґрунтом, а саме набивання стаканів, посів насіння у ґрунт, вивільнення коренів з ґрунту та їх відмивання. Зазначений метод дає змогу попередньо оцінити діапазон внутрішньосортової мінливості і азотфіксувальний потенціал рослинно-мікробної системи сорту і є доречним при порівнянні сортів за nis-ознакою.

Суть експрес-методу з використанням рулонної культури полягає у наступному. На стрічках фільтрувального паперу (60 × 20 см) в 3 см від верхнього краю і 5 см від лівого берега за розміткою через 1 см розміщують по 50 насінин зернової культури досліджуваного сорту. Накривають іншою зволоженою паперовою стрічкою (60 × 20 см) так, щоб зафіксувати насіння, змочують і прокладають корекс. Згортають у нетугий рулон. Згорнені рулони вміщують у скляні посудини (500 мл), наполовину заповнені ґрунтовою витяжкою та експонують у лабораторних умовах протягом трьох тижнів.

Ґрунтову витяжку готують на кип’яченій воді із розрахунку 100 г абсолютно сухого ґрунту на 1000 мл води. По закінченні терміну експозиції рулони розгортають, корені окремих рослин обережно відділяють від стрічки, промокають фільтрувальним папером, подрібнюють і вміщують у флакони місткістю 40 $см^3$, закриті ватно-марлевими пробками. У кожен

флакон додають 5 мл напіврідкого середовища Доберейнер. За три доби флакони герметизують, вводять ацетилен (10 % від об'єму газової фази у флаконі) та інкубують протягом доби за температури 26-28 ^{o}C. Після закінчення терміну інкубації зразки аналізують на газовому хроматографі.

Обрахунки ведуть за формулою, загальноприйнятою для визначення потенційної азотфіксувальної активності [52].

Результати дослідження внутрішньосортового поліморфізму перспективних сортів тритикале ярого – Коровай харківський та Оберіг харківський – за допомогою лабораторного експрес-методу представлені у таблиці 4.1.

Як видно з таблиці, 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 стимулювати фіксацію молекулярного азоту. Так, максимальна ПНА на відмитих коренях рослин сорту Коровай харківський сягала діапазону 40,1-60,0, а сорту Оберіг харківський – 80,1-100,0 нмоль етилену на рослину за годину.

Таблиця 4.1

Внутрішньосортовий поліморфізм тритикале ярого за здатністю до асоціативної азотфіксації *(лабораторний дослід)*

Інтервал ПНА, нмоль етилену на рослину за год	Кількість рослин	
	сорт Коровай харківський	сорт Оберіг харківський
0-20,0	45	37
20,1-40,0	1	4
40,1-60,0	1	0
60,1-80,0	0	4
80,1-100,0	0	1

Спосіб оцінки сортів зернових культур за здатністю підтримувати азотфіксувальну активність у кореневій зоні в умовах вегетаційного досліду є більш наближеним до реальних умов вегетації і потребує більш ретельної підготовки. 40-60 одноразових стаканів місткістю 200 мл наповнюють заздалегідь просіяним і звільненим від рослинних решток ґрунтом. Паралельно з наповненням стаканів визначають вологість і повну вологоємкість ґрунту. Надалі підтримують вологість ґрунту на рівні 60 % від повної вологоємкості. У кожен стакан висівають по 3 насінини досліджуваного сорту зернової культури. За 3-5 діб після появи сходів на кожен стакан залишають по одній рослині, намагаються, щоб рослини у виборці для аналізу були середні за розміром, подібні між собою. Експонують в умовах люміностату (інтенсивність освітлення 2000-2500 люкс, фотоперіод 16 годин, температура 26±2 ^{0}C) протягом трьох тижнів. По закінченні терміну експозиції обережно вивільняють кореневу систему з ґрунту, відмивають під водогінною водою і здійснюють всю послідовність операцій, наведену в описі експрес-методу з використанням рулонної культури.

Результати дослідження внутрішньосортового поліморфізму за nis-ознакою перспективних сортів тритикале ярого – Коровай харківський та Оберіг харківський – за умов вегетаційного досліду наведено у таблиці 4.2.

Дані щодо внутрішньосортового поліморфізму тритикале ярого за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію, одержані у вегетаційному досліді, в цілому узгоджуються з результатами лабораторного експрес-методу (табл. 4.1). При цьому, азотфіксувальна активність на коренях рослин тритикале ярого за вирощування їх безпосередньо в ґрунті характеризувалася більш широким діапазоном мінливості для сорту Оберіг харківський і більшою кількістю зразків з підвищеною ПНА – для обох досліджуваних сортів (табл. 4.1, 4.2).

Як свідчать результати, одержані нами у лабораторному і вегетаційному дослідах, сорт Оберіг харківський був більшою мірою

насичений генотипами з підвищеною здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію, ніж сорт Коровай харківський, рослинно-мікробна система даного сорту характеризувалася більш високим азотфіксувальним потенціалом (табл. 4.1, 4.2).

Таблиця 4.2

Внутрішньосортовий поліморфізм тритикале ярого за здатністю до асоціативної азотфіксації *(вегетаційний дослід)*

Інтервал ПНА, нмоль етилену на рослину за год	Кількість рослин	
	сорт Коровай харківський	сорт Оберіг харківський
0-20,0	42	35
20,1-40,0	5	4
40,1-60,0	3	5
60,1-80,0	0	1
80,1-100,0	0	3
100,1-120,0	0	0
120,1-140,0	0	1

Підсумовуючи результати, викладені у розділі, можна зробити наступні висновки.

За результатами багаторічних польових досліджень встановлено, що потенційна азотфіксувальна активність у ризоплані ярих пшениць і тритикале перевищує таку у ризосферному ґрунті у 3-6 разів, отже асоціативні системи “пшениця яра – діазотрофи кореневої зони” і “тритикале яре – діазотрофи кореневої зони” можна віднести до ендоризосферного типу.

Встановлено спектр мінливості сортів пшениці ярої за азотфіксувальною активністю від 137 до 1707, тритикале ярого – від 249 до

2027 нмоль етилену на 1 г коренів за 1 годину.

Показано значні флуктуації потенційної нітрогеназної активності у ризоплані рослин упродовж вегетаційного періоду (31-83 %) і під час однієї фенофази у різні роки досліджень (31-97 %).

Встановлено, що коливання рівня потенційної активності азотфіксації пов'язані із впливом абіотичних чинників навколишнього середовища. Спостерігався тісний зв'язок з температурою повітря і ґрунту (коефіцієнт кореляції (r) становив 0,83 та 0,77 для ярих пшениць і 0,91 та 0,87 для ярих тритикале відповідно), помітний – з середньомісячною кількістю опадів (r дорівнював 0,62).

За результатами кореляційного аналізу показано тенденцію до підвищеного вмісту хлорофілів у прапорцевих листках пшениці ярої з високим азотфіксувальним потенціалом. Відмічено тенденцію до помірного позитивного зв'язку рівня азотфіксувальної активності у ризоплані і вмістом загального азоту та білку у зерні тритикале ярого різних сортів.

Встановлено, що селекційні ознаки (висота рослин, довжина колосу, маса і кількість зерен в колосі, маса 1000 зерен) не можуть бути використані як маркерні для виявлення сортів тритикале ярого, що здатні утворювати рослинно-мікробні системи з високим азотфіксувальним потенціалом.

Показано, що перспективні вітчизняні сорти тритикале ярого характеризуються значним внутрішньосортовим поліморфізмом за здатністю підтримувати асоціативну азотфіксацію.

Розроблено спосіб оцінки азотфіксувального потенціалу асоціативних систем "діазотрофи – рослина" залежно від сорту зернової культури, який захищено патентом України № 63718.

Основні одержані нами результати наведені в опублікованих наукових працях [23, 64, 71, 106, 107, 111, 112].

РОЗДІЛ 4
СКРИНІНГ ДІАЗОТРОФІВ, ЩО ЗДАТНІ УТВОРЮВАТИ ЕФЕКТИВНІ АСОЦІАЦІЇ З РОСЛИНАМИ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ТА ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО

4.1 Склад азотфіксувального мікробного угруповання кореневої зони ярих пшениць та тритикале

Оскільки активність азотфіксації у кореневій зоні рослин безпосередньо пов’язана з активністю окремих груп мікроорганізмів-діазотрофів, властивих досліджуваній сільськогосподарській культурі, наступним етапом нашої роботи було вивчення якісного і кількісного складу азотфіксувального мікробного угруповання пшениці ярої та тритикале ярого.

Для дослідження нами були обрані сорт пшениці ярої Варяг і тритикале ярого – Оберіг харківський, які характеризувалися підвищеною азотфіксувальною здатністю. Як свідчать одержані дані, у ризосферному ґрунті і на коренях обох сільськогосподарських культур створювалися сприятливі умови для розвитку діазотрофів різних таксономічних та еколого-трофічних груп (табл. 4.1, 4.2). Так, визначена методом ґрунтових грудочок чисельність азотобактера становила у ґрунті без рослин 38,8-62,5, у ризосферному ґрунті пшениці ярої – 35,0-93,0, у ризосферному ґрунті тритикале ярого 32,5-88,2 % (табл. 4.1, 4.2). Високий відсоток обростання колоніями азотобактера –до 88,0 та 90,1 % був відмічений і на коренях пшениці та тритикале відповідно, що свідчить про тісну взаємодію даного мікроорганізму з рослинами.

Поряд з азотобактером широко представлені у кореневій зоні ярих пшениці та тритикале флуоресціюючі псевдомонади. Їх чисельність у ризосферному ґрунті пшениці становила 5,2-165,0, тритикале – 7,8-172,0 %, що значно перевищує контрольний варіант (табл. 4.1, 4.2).

Таблиця 4.1

Склад азотфіксувального мікробного угруповання кореневої зони пшениці ярої сорту Варяг

(польовий дослід, середнє за 2008-2009 рр.)

Варіант досліду	Кількість азотфіксувальних бактерій в 1 г сухого ґрунту або коренів					
	Azotobacter, % оброслих грудочок	*Pseudomonas* (на середовищі з гліцерином), млн	*Clostridium* (на середовищі Виноградського), тис	На середовищі Доберейнер з малатом, млн	На середовищі Ешбі, млн	На середовищі Федорова-Калінінської), млн
Ґрунт без рослин (контроль)	38,8-62,5	0,5-75,2	4,5-12,8	1,2-38,3	7,2-125,8	5,0-120,4
Ґрунт ризосфери	35,0-93,0	5,2-165,0	27,2-100,8	8,9-50,3	3,8-128,0	2,9-135,0
Відмиті корені	45,0-88,0	58,0-108,0	8,0-72,5	10,8-98,2	29,2-100,5	1,8-98,5

Таблиця 4.2

Склад азотфіксувального мікробного угруповання кореневої зони тритикале ярого сорту Оберіг харківський

(польовий дослід, середнє за 2008-2009 рр.)

Варіант досліду	Кількість азотфіксувальних бактерій в 1 г сухого ґрунту або коренів					
	Azotobacter, % оброслих грудочок	*Pseudomonas* (на середовищі з гліцерином), млн	*Clostridium* (на середовищі Виноградського), тис	На середовищі Доберейнер з малатом, млн	На середовищі Ешбі, млн	На середовищі Федорова-Калінінської), млн
Ґрунт без рослин (контроль)	38,8-62,5	0,5-75,2	4,5-12,8	1,2-38,3	7,2-125,8	5,0-120,4
Ґрунт ризосфери	32,5-88,2	7,8-172,0	35,8-110,2	3,8-59,2	5,2-111,3	4,4-120,1
Відмиті корені	48,3-90,1	64,3-115,2	6,2-64,3	8,8-102,5	22,4-108,3	2,2-88,2

Складовою частиною азотфіксувального мікробного угруповання кореневої зони пшениці ярої та тритикале ярого були анаеробні бактерії роду *Clostridium*. Найсприятливішими умовами для розвитку клостридій і для пшениці, і для тритикале характеризувався ризосферний ґрунт, де їх чисельність була на порядок вищою, ніж у контрольному варіанті і помітно перевищувала кількість на відмитих коренях (табл. 4.1, 4.2).

Чисельність азотфіксаторів, які розвиваються на напіврідкому середовищі Доберейнер з малатом, у ризосфері пшениці ярої становила 8,9-50,3, тритикале ярого – 3,8-59,2 млн в 1 г сухого ґрунту і дещо перевищувала контрольний варіант (табл. 4.1, 4.2). Кількість діазотрофів, що утилізують малат і розвиваються на коренях пшениці і тритикале становила відповідно до 98,2 і 102,5 млн в 1 г сухих коренів.

На напіврідкому середовищі Ешбі розвиваються мікроорганізми, що одержали назву олігонітротрофів, здатні асимілювати поживні речовини з розчинів з низькою концентрацією азотовмісних сполук. До групи олігонітротрофів належать багато типових сапротрофів (бактерії родів *Enterobacter, Azotobacter, Bacillus*), а також ряд специфічних видів мікроорганізмів, що характеризуються різноманітними культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями. Кількість олігонітротрофів, що розвиваються на середовищі Ешбі, становила у контрольному варіанті 7,2-125,8 млн в 1 г сухого ґрунту, діапазон чисельності зазначеної вище групи у кореневій зоні пшениці і тритикале мало відрізнявся від контролю (табл. 4.1, 4.2).

Факультативно-симбіотрофні азотфіксатори (азотфіксувальні асоціації), що характеризуються специфічними живильними потребами (наявність у середовищі вітамінів групи В та органічних кислот як джерел вуглецевого живлення та енергії) і добре розвиваються за умов симбіозу з іншими мікроорганізмами [38]. Дана група діазотрофів широко представлена як у кореневій зоні пшениці та тритикале, так і в ґрунті без рослин (табл. 4.1, 4.2). Дещо нижча чисельність азотфіксувальних асоціацій, порівняно з

контролем, була характерна для ризоплани обох сільськогосподарських культур.

Отже, активні щодо азотфіксації сорти пшениці ярої – Варяг і тритикале ярого – Оберіг харківський за складом азотфіксувального мікробного угруповання мало відрізнялися між собою. Одержані нами результати узгоджуються з літературними даними щодо складу азотфіксувального мікробного угруповання під такими сільськогосподарськими культурами як жито озиме [1] і пшениця яра [44].

4.2 Діазотрофи, виділені з ризосфери та ризоплани ярих пшениць та тритикале

Підвищити рівень асоціативної азотфіксації у кореневій зоні тієї чи іншої культури можна як за рахунок добору сортів з високою азотфіксувальної здатністю, так і за допомогою інокуляції високоактивними штамами ґрунтових діазотрофів. Тому 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 тритикале ярого було виділено 83 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. 15 ізолятів азотфіксувальних бактерій, які характеризувалися високою нітрогеназною активністю, були ідентифіковані до роду.

Усі виділені бактерії представляли собою рухливі палички. Переважали неспороутворюючі ізоляти, що давали негативне забарвлення за Грамом. Найвищою азотфіксувальною активністю характеризувалися ізоляти, що утворювали на картопляному агарі світло-рожеві колонії з характерним металевим блиском, червоні блискучі колонії на середовищі Касераса (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Здатність відновлювати етилен найбільш активних культур діазотрофів, виділених з кореневої зони тритикале ярого різних сортів

Ізоляти	Джерело виділення	АА, нмоль етилену на 1 мл середовища за добу
Azospirillum sp. 10/1	Сорт Оберіг харківський, ризоплана	**172,2**
Azospirillum sp. 10/3	Сорт Оберіг харківський, ризоплана	112,0
Azospirillum sp. 1302	Сорт Коровай харківський, ризоплана	55,3
Azospirillum sp. 1303	Сорт Коровай харківський, ризоплана	105,3
Azospirillum sp. 1305	Сорт Коровай харківський, ризоплана	75,0
Azospirillum sp. 9 а	Сорт Соловей харківський, ризосфера	25,4
Azospirillum sp. 22 а	Сорт Жайворонок харківський, ризосфера	28,7
Azotobacter sp. 1325	Сорт Коровай харківський, ризосфера	88,8
Azotobacter sp. 1140	Сорт Оберіг харківський, ризосфера	90,4
Enterobacter sp. 1342	Сорт Соловей харківський, ризосфера	68,3
Enterobacter sp. 1345	Сорт Жайворонок харківський , ризосфера	77,2
Bacillus sp. 17 б	Сорт Лосинівське, ризосфера	18,2
Bacillus sp. 19 б	Сорт Оберіг харківський, ризосфера	26,5
Pseudomonas sp. 5 в	Сорт Микола, ризосфера	12,0
Pseudomonas sp. 11 в	Сорту Аіст харківський, ризосфера	15,3
$НІР_{05}$	-	50,4

Примітка: вірогідно найвища азотфіксувальна активність відмічена жирним шрифтом

При вирощуванні на напіврідкому середовищі Доберейнер зазначені ізоляти утворювали напівзанурену плівку і підлуговували середовище, при

вирощуванні на рідких і напіврідких середовищах бактерії здійснювали характерний гвинтоподібний рух. Добре росли на середовищах з органічними кислотами, не використовували глюкозу, цукрозу і не потребували для розвитку біотину. Каталазо- і оксидазопозитивні. Ізоляти були здатні відновлювати нітрати до нітритів. Властивості даних штамів відповідали властивостям представників роду *Azospirillum*, описаним у визначнику Берджі [167].

Згідно сучасних уявлень, ці мікроорганізми поширені практично у всіх ґрунтово-кліматичних зонах, включаючи райони Арктики [195]. Азоспірили досліджують у багатьох лабораторіях світу у зв'язку з їх здатністю утворювати ефективні асоціації з багатьма видами вищих рослин, в тому числі, сільськогосподарських злаків. За здатність колонізувати внутрішні тканини і провідну систему кореня, дослідники називають представників роду *Azospirillum* природними симбіонтами пшениці [134, 158, 178]. З огляду на успішний досвід використання азоспірил як інокулянтів жита озимого та пшениці ярої, ми сподівалися віднайти ефективні штами бактерій роду *Azospirillum* у складі азотфіксувального мікробного угруповання тритикале ярого [45, 61, 118].

До окремої групи були віднесені штами, що утворювали великі випуклі слизисті світло-коричневі і темно-коричневі колонії зі складчастою поверхнею на середовищі Ешбі та середовищі Федорова. Ці ізоляти утворювали цисти при старінні культури. Бактерії даної групи каталазопозитивні, не відновлювали нітрати, засвоювали цукрозу, рафінозу, маніт, глюкозу, крохмаль, не розріджували желатину, згортали і підлуговували лакмусове молоко. Порівняльний аналіз властивостей досліджуваних ізолятів з даними визначника Берджі дозволив віднести їх до роду *Azotobacter*. Їх нітрогеназна активність становила 88,8-90,4 нмоль етилену на 1 мл середовища за добу (табл. 4.3).

Інша група дрібних грамнегативних бактерій характеризувалася слизистим ростом на гороховому і картопляному агарі, на м'ясопептонному

агарі утворювалися дрібні округлі випуклі колонії жовтувато-білого і світло-бежевого кольору. За використання вуглеводів (глюкози, цукрози, лактози) відбувалося підкислення середовища і виділення пухирців газу. Зазначені ізоляти відновлювали нітрати до нітритів, утворювали каталазу, протеолітичні ферменти (спостерігалося розрідження желатини) і не виділяли амілолітичні ферменти (не відбувалося гідролізу крохмалю). Реакція Фогеса-Проскауера і тест на середовищі Сіммонса з цитратом позитивні. Результати вивчення властивостей даних бактерій дозволили віднести їх до роду *Enterobacter*. Ізоляти, виділені з ризосфери сортів Соловей харківський та Жайворонок харківський, проявили азотфіксувальну активність на рівні 68,3-77,2 нмоль етилену на 1 мл середовища за добу (табл. 4.3).

Спороутворюючі грампозитивні бактерії утворювали білі та кремові колонії зі звивистим краєм. Спори мали циліндричну форму і розміщувалися в центрі клітини. Зазначені ізоляти гідролізували крохмаль, утворювали каталазу і ферменти, що гідролізують казеїн, відновлювали нітрати до нітритів, утворювали кислоту з арабінози, ксилози, маніту на середовищі з цитратами. Порівняльні дані про фізіолого-біохімічні властивості спороутворюючих бактерій дозволили віднести їх до роду *Bacillus*.

Рухливі грамнегативні бактерії, що утворювали на селекційному середовищі з гліцерином та глутаматом флуоресціюючий пігмент, були віднесені до роду *Pseudomonas*. Зазначені ізоляти були каталазо- і оксидазопозитивними, розріджували желатину. Ризосферні псевдомонади і бацили виявили невисоку азотфіксувальну здатність (12,0-26,5 нмоль етилену на 1 мл середовища за добу).

Отже, дізотрофи, виділені з кореневої зони рослин тритикале ярого, належали до родів *Azospirillum, Azotobacter, Enterobacter, Pseudomonas, Bacillus.* Серед них найбільш активно фіксували атмосферний азот в чистій культурі представники роду *Azospirillum.*

Азоспірили як активні азотфіксатори виділяли також з кореневої зони ярих пшениць. Високу нітрогеназну активність у чистій культурі проявили 9 ізолятів, що були виділені з ризосфери та відмитих коренів рослин пшениці сортів Рання 93, Скороспілка 99, Етюд і Варяг (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Здатність відновлювати етилен найбільш активних культур бактерій роду *Azospirillum*, виділених з кореневої зони пшениці ярої

Ізоляти	Джерело виділення	АА, нмоль етилену на 1 мл середовища за добу
Azospirillum sp. 77	Сорт Варяг, ризоплана	**161,9**
Azospirillum sp. F1	Сорт Варяг, ризосфера	125,0
Azospirillum sp. P2	Сорт Рання 93, ризоплана	108,9
Azospirillum sp. P3	Сорт Скороспілка 99, ризоплана	120,0
Azospirillum sp. P4	Сорт Героїня, ризоплана	61,1
Azospirillum sp. F5	Сорт Харківська 26, ризосфера	70,0
Azospirillum sp. P6	Сорт Етюд, ризоплана	111,9
Azospirillum sp. 37	Сорт Етюд, ризоплана	**171,1**
Azospirillum sp. P7	Сорт Sunnan, ризоплана	78,9
$НІР_{05}$	-	71,6

Примітка: вірогідно найвища азотфіксувальна активність відмічена жирним шрифтом

Для віднесення діазотрофа до асоціативних мікроорганізмів недостатньо ґрунтуватися тільки на його азотфіксувальній активності в чистій культурі на живильному середовищі. Необхідно впевнитися в його спроможності підсилювати процес асоціативної азотфіксації при інтродукції в кореневу зону рослин. Адже пряма залежність між нітрогеназною

активністю діазотрофа в чистій культурі і в асоціації з рослиною не встановлена. Так, штами, що активно фіксували азот в чистій культурі можуть бути неспроможними формувати ефективні азотфіксувальні асоціації з рослинами і навпаки [60].

Для дослідження здатності утворювати ефективні асоціації з рослинами тритикале ярого було відібрано ізоляти *Azospirillum sp.* 10/1, *Azospirillum sp.* 37, *Azospirillum sp.* 77, що характеризувалися найвищою азотфіксувальною активністю у чистій культурі (табл. 4.3, 4.4). Відібрані ізоляти порівнювали з активними штамами азоспірил, виділеними з кореневої зони різних сільськогосподарських культур (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Здатність відновлювати етилен чистих культур азоспірил, виділених з різних джерел

Штам	Джерело виділення	АА, нмоль етилену на 1 мл середовища за добу
Azospirillum brasilense 18-2	Гречка сорту Ідель, ризосфера	137,2±12,6
A. brasilense 54	Шовковиця сорту Українська 61, бульбочкоподібні утворення	168,0±14,0
A. brasilense 61	Шовковиця сорту Українська 61, бульбочкоподібні утворення	134,4±14,0
Azospirillum sp. 10/2	Пшениця озима сорту Донской сюрприз, ризоплана	30,8±1,4

На рис. 4.1 представлено здатність діазотрофів роду *Azospirillum* утворювати асоціації з рослинами тритикале ярого і сприяти підвищенню нітрогеназної активності в кореневій зоні культури. Як свідчать одержані дані, всі досліджувані штами азоспірил сприяли підвищенню потенційної нітрогеназної активності на 65-366 % порівняно з варіантом без інокуляції.

За використання *Azospirillum sp.* 10/1 вдалося сформувати найбільш ефективну асоціативну систему “діазотроф-тритикале яре”.

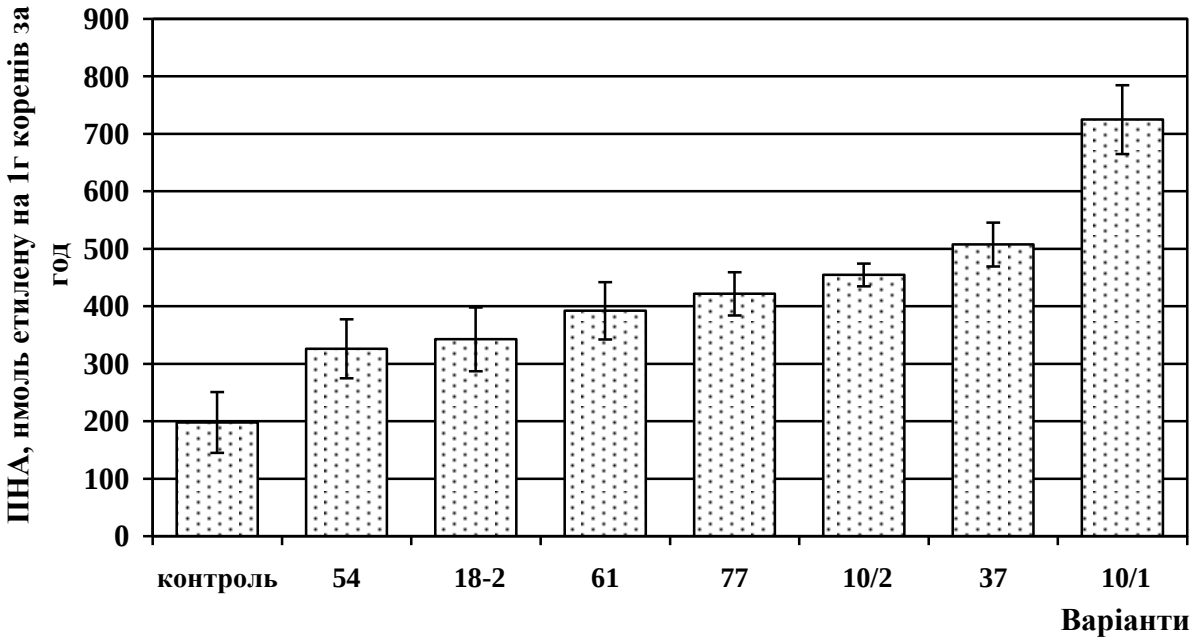


Рис. 4.1. Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції активними штамами азоспірил (вегетаційний дослід)

Здатність досліджуваних культур продукувати біологічно активні речовини вивчали на проростках тритикале ярого сорту Оберіг харківський (табл. 4.6). Згідно результатів, наведених у таблиці 4.6, найбільш інтенсивно ріст корінців тритикале ярого стимулювали штами *Azospirillum sp.* 10/1 та *Azospirillum sp.* 77, приріст становив 32,43 і 27,70 % до контролю відповідно.

Отже, для подальших досліджень нами були відібрані штами *Azospirillum sp.* 10/1 та 77, що характеризувалися високою здатністю відновлювати ацетилен у чистій культурі, підвищували ПНА на відмитих коренях в асоціації з рослинами тритикале ярого, стимулювали ріст корінців тритикале.

Таблиця 4.6

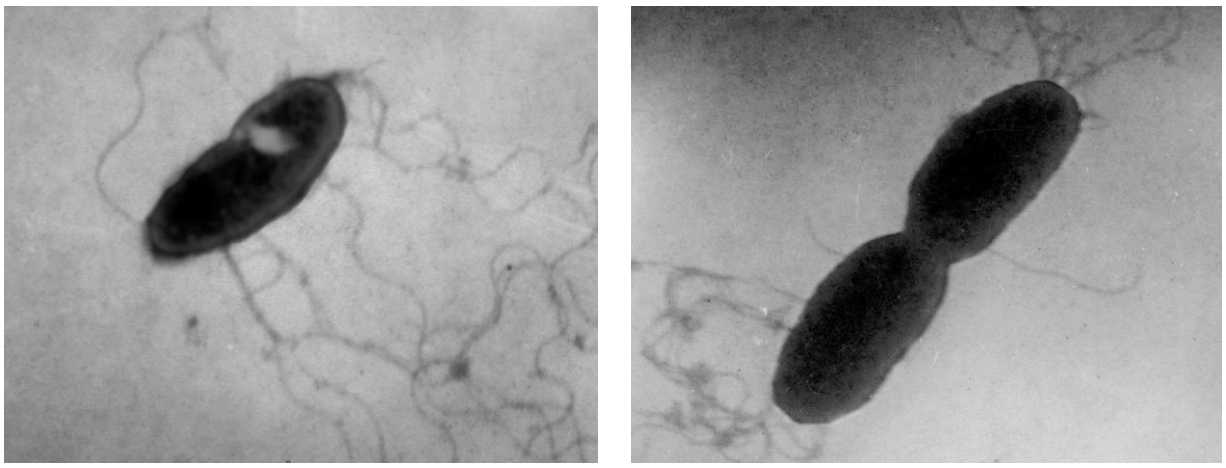
Вплив різних штамів азоспірил на приріст корінців тритикале ярого сорту Оберіг харківський

Варіанти	Приріст корінців, см	% до контролю
Контроль (вода)	1,85±0,04	-
Azospirillum sp. 10/1	2,45±0,08	32,43
Azospirillum sp. 37	2,29±0,08	23,65
Azospirillum sp. 77	2,36±0,06	27,70
Azospirillum sp. 10/2	2,26±0,08	22,29
A. brasilense 18-2	2,08±0,06	12,16
A. brasilense 54	2,10±0,05	13,51
A. brasilense 61	2,01±0,08	8,78

4.3 Ідентифікація нових перспективних штамів *Azospirillum sp.* 77 і *Azospirillum sp.* 10/1

Ідентифікацію нових перспективних штамів *Azospirillum sp.* 77 і 10/1 проводили за визначником Берджі та оригінальними роботами [167].

Досліджувані штами характеризуються наступними морфолого-культуральними особливостями. Клітини представляють собою дещо зігнуті палички розміром 1,0-1,2 ^{x} 1,8-2,5 мкм (рис. 4.2). Не утворюють спор. Рухливі, під час руху форма клітин S-подібна. Грамнегативні.



а) б)

Рис. 4.2 Електронна мікрофотографія *Azospirillum sp.* 10/1, ×15000; забарвлення уранілацетатом

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

Добре ростуть на картопляному агарі з 2,5 % бурштинової кислоти, де за три доби утворюються круглі колонії діаметром 3-5 мм (рис. 4.3).

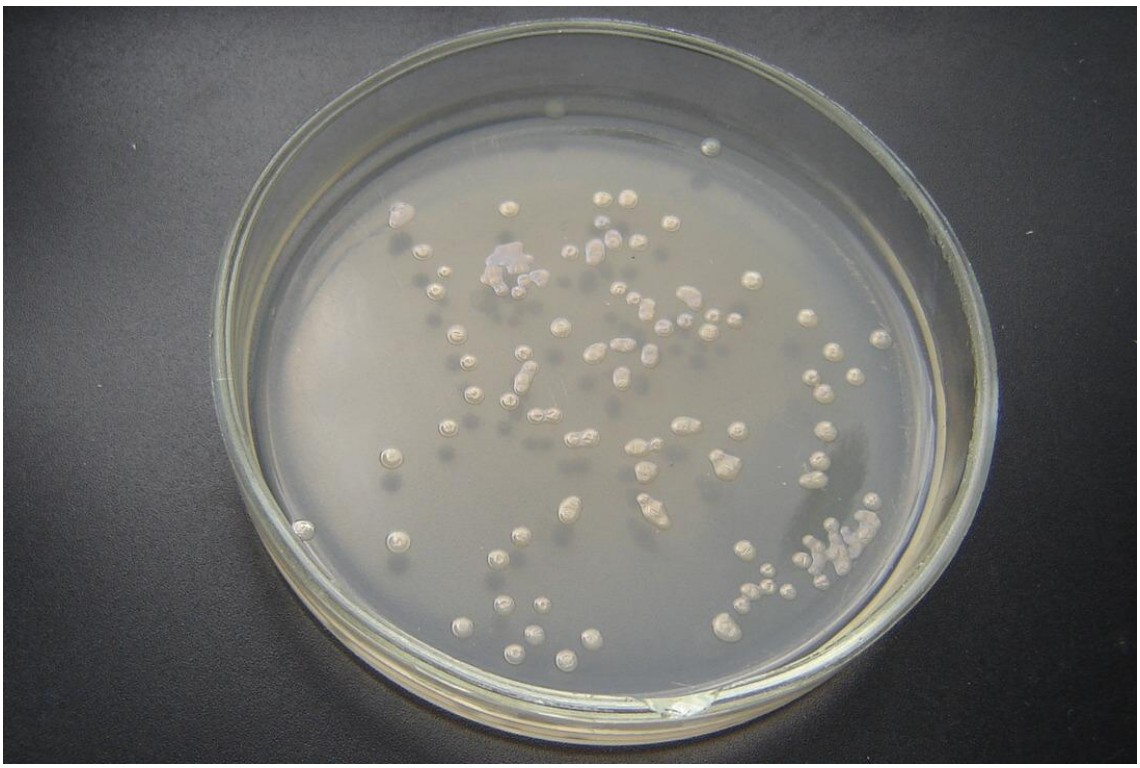


Рис. 4.3 Колонії *Azospirillum sp.* 10/1. Картопляний агар з 2,5 % бурштинової кислоти, 72 год, 28 °С

При старінні колонії набувають перламутрового блиску і накопичують рожевий пігмент, який не дифундує у середовище. За таких умов культивування *Azospirillum sp.* 77 і 10/1 не дисоціюють R і S-форми.

При додаванні 0,5 % D-глюкози у середовище утворюють великі білі слизисті колонії (рис. 4.4).

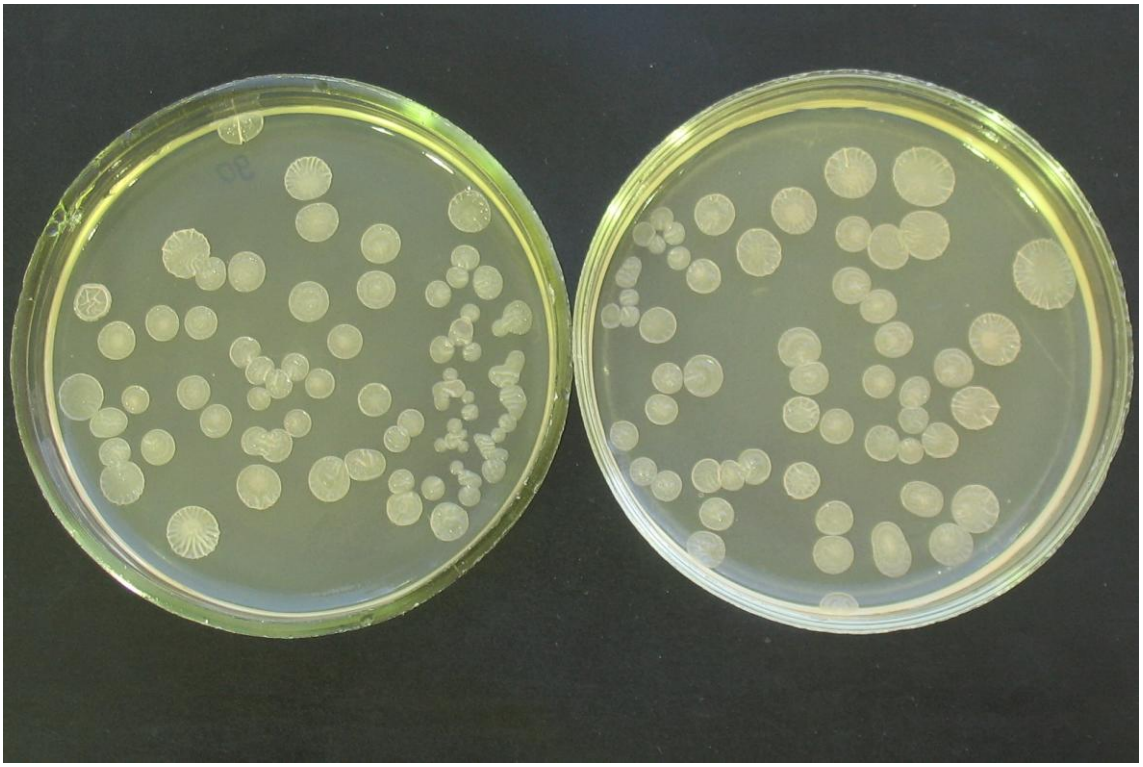


Рис. 4.4 Колонії *Azospirillum sp.* 10/1. Картопляний агар з з 2,5 % бурштинової кислоти та 0,5 % D-глюкози, 72 год, 28 °С

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 pH 6,8-7,6; температурі 28^0-30 ^{0}С. Не потребують біотину.

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

Виходячи з результатів екологічних досліджень, в зоні помірного клімату з відомих на сьогодні видів азоспірил зустрічаються *A. brasilense* та *A. lipoferum* [167]. Згідно даних, наведених у визначнику Берджі, однією з діагностичних властивостей, які відрізняють *A. lipoferum* від *A. brasilense*, є здатність використовувати глюкозу та маніт як джерела вуглецю.

При додаванні суспензії клітин досліджуваних штамів до рідкого середовища з мінеральними солями, бромтимолом і глюкозою з наступним інкубуванням за температури 28 ^{0}C упродовж 5 діб було відмічено підвищення оптичної густини розчинів у 3,2-4,2 рази та зниження їх pH до 6,7 (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Розвиток *Azospirillum sp.* 77 і 10/1 за використання глюкози та маніту як єдиного джерела вуглецевого живлення

Варіант		D_{665}	pH
Контроль (середовище з глюкозою або манітом без суспензії клітин)		0,015±0,000	7,1
Azospirillum sp. 77	Контроль (суспензія клітин без джерела вуглецю)	0,029±0,004	7,1
	Середовище з глюкозою	0,092±0,006	6,7
	Середовище з манітом	0,023±0,001	6,9
Azospirillum sp. 10/1	Контроль (суспензія клітин без джерела вуглецю)	0,024±0,002	7,1
	Середовище з глюкозою	0,100±0,000	6,7
	Середовище з манітом	0,021±0,001	6,9

Одержані результати засвідчили розвиток *Azospirillum sp.* 77 і 10/1 за використання глюкози як єдиного джерела вуглецевого живлення. Як

свідчать дані, наведені у таблиці 4.7, на середовищі з додаванням маніту досліджувані штами азоспірил не розвивалися.

Дослідження відношення *Azospirillum sp.* 77 до антибіотиків показало, що зазначений штам чутливий до ципрофлоксацину, левоміцитіну, гентаміцину, еритроміцину, канаміцину, фурадоніну, цефтріаксону, резистентний до поліміксину, ампіцилліну, оксацилліну, амоксициліну.

Штам *Azospirillum sp.* 10/1 чутливий до цефотаксиму, норфлоксацину, ципрофлоксацину, левоміцитіну, гентаміцину, еритроміцину, канаміцину, фурадоніну, резистентний до поліміксину, ампіцилліну, оксацилліну, амоксициліну, цефтріаксону. Цефалексин здійснює бактеріостатичний вплив на обидва штами.

З метою уточнення таксономічного положення *Azospirillum sp.* 10/1 було проведено сиквенс-аналіз генів 16S рРНК зазначеного штаму. За використання універсальних бактеріальних праймерів одержано продукти ампліфікації розміром ~1500 п.н. (рис. 4.5).

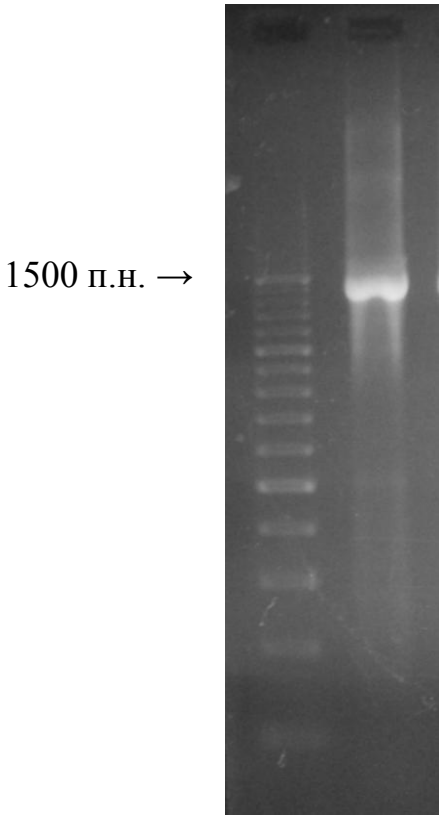


Рис. 4.5 Електрофореграма продуктів ампліфікації гена 16S рРНК штаму *Azospirillum sp.* 10/1

За порівняльного аналізу 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. 4.8). Так, ідентичність послідовностей 16S рРНК *Azospirillum sp.* 10/1 з референт-штамами *A. brasilense* досить висока і становить 99,5-99,6 %, в той час як ідентичність з референт-штамами, що належать до виду *A. lipoferum* не перевищує 96,7%.

Таблиця 4.8

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, %
Azospirillum brasilense Gr 66	1362	99,5
A. brasilense Gr 22	1362	99,6
A. brasilense Gr 27	1362	99,6
A. brasilense ISSDS-858	1362	99,6
A. brasilense ISSDS-855	1362	99,6
Azospirillum sp. 7C	1362	98,9
A. lipoferum B22	1251	96,7
A. lipoferum B21	1251	96,7
A. lipoferum 64	1229	96,0
A. lipoferum A5	1229	95,9
A. lipoferum 59B	1206	95,8

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

4.4 Вплив *Azospirillum brasilense* 77 і 10/1 на потенційну нітрогеназну активність та біосинтетичні процеси в рослинах пшениці ярої та тритикале ярого

Ефективність штамів *Azospirillum brasilense* 77 і 10/1 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 штамом *A. brasilense* 77 сприяла підвищенню потенційної активності азотфіксації як у ризосфері, так і у ризоплані культур (табл. 4.9).

Таблиця 4.9

Вплив *Azospirillum brasilense* 77 на потенційну нітрогеназну активність (ПНА) у кореневій зоні пшениці ярої та тритикале ярого

(вегетаційний дослід)

Варіанти досліду		ПНА, нмоль етилену на 1 г ґрунту (коренів) за год
Ризосферний ґрунт		
Пшениця яра	Без інокуляції (контроль)	8,7±2,5
	Інокуляція *A. brasilense* 77	43,6±4,4
Тритикале яре	Без інокуляції(контроль)	16,2±3,6
	Інокуляція*A. brasilense* 77	37,5±1,0
Відмиті корені рослин		
Пшениця яра	Без інокуляції (контроль)	1590,6±323,6
	Інокуляція *A. brasilense* 77	2192,0±144,5
Тритикале яре	Без інокуляції (контроль)	815,2±90,2
	Інокуляція *A. brasilense* 77	2606,7±37,5

Слід зазначити, що потенційна нітрогеназна активність відмитих коренів рослин перевищувала таку у ризосферному ґрунті у 50-180 разів, що

свідчить про розвиток найбільш активних азотфіксувальних мікроорганізмів безпосередньо на поверхні коренів рослин. У варіантах з інокуляцією потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях пшениці ярої підвищилася на 38 %, тритикале ярого – на 220 % (табл. 4.9).

Результати дослідження впливу *A. brasilense* 10/1 на потенційну нітрогеназну активність у кореневій зоні пшениці ярої сорту Варяг і тритикале ярого сорту Оберіг харківський наведено у таблиці 4.10.

Таблиця 4.10

Вплив *Azospirillum brasilense* 10/1 на потенційну нітрогеназну активність (ПНА) у кореневій зоні пшениці ярої та тритикале ярого

(вегетаційний дослід)

Варіанти досліду		ПНА, нмоль етилену на 1 г ґрунту (коренів) за год
Ризосферний ґрунт		
Пшениця яра	Без інокуляції (контроль)	27,6±7,5
	Інокуляція *A. brasilense* 10/1	390,1±10,6
Тритикале яре	Без інокуляції(контроль)	32,5±11,9
	Інокуляція*A. brasilense* 10/1	389,1±5,0
Відмиті корені рослин		
Пшениця яра	Без інокуляції (контроль)	1346,8±310,6
	Інокуляція *A. brasilense* 10/1	2125,2±161,1
Тритикале яре	Без інокуляції (контроль)	1228,5±263,5
	Інокуляція *A. brasilense* 10/1	2029,2±186,1

Звертає на себе увагу той факт, що інокуляція зазначеним штамом сприяла підвищенню ПНА більш ніж у 10 разів у ризосфері обох досліджуваних культур (табл. 4.10).

Потенційна активність нітрогенази на відмитих коренях рослин пшениці та тритикале, що становила у контрольних варіантах 1346,8 і 1228,5

нмоль етилену на 1 г коренів за годину відповідно, за інокуляції зросла менш істотно, а саме на 58-65 %.

Відомо, що внесення під сільськогосподарські культури азотних добрив впливає на активність асоціативної азотфіксації. Так, невисокі дози стимулюють процес, а надлишкові – репресують синтез нітрогенази у ризосферних мікроорганізмів, незважаючи на підвищення їх загальної чисельності [19]. Виходячи з цього, продуктивність асоціативної азотфіксації за різних доз мінерального азоту вважають одним з критеріїв екологічної доцільності їх застосування [103].

Інтродуковані у кореневу зону рослин діазотрофи нівелюють негативну дію мінеральних добрив і значною мірою відновлюють активність процесу азотфіксації у варіантах з невисокими дозами добрив [104].

Ми вивчали потенційну нітрогеназну активність у ризосфері тритикале ярого сорту Оберіг харківський за використання різних доз азоту та інокуляції насіння *A. brasilense* 10/1 за умов вегетаційного досліду (рис. 4.6). Як свідчать одержані нами результати, максимальний стимулюючий ефект на потенційну активність нітрогенази азотфіксувального мікробного угруповання тритикале ярого здійснювала доза N_{30} (рис. 4.6).

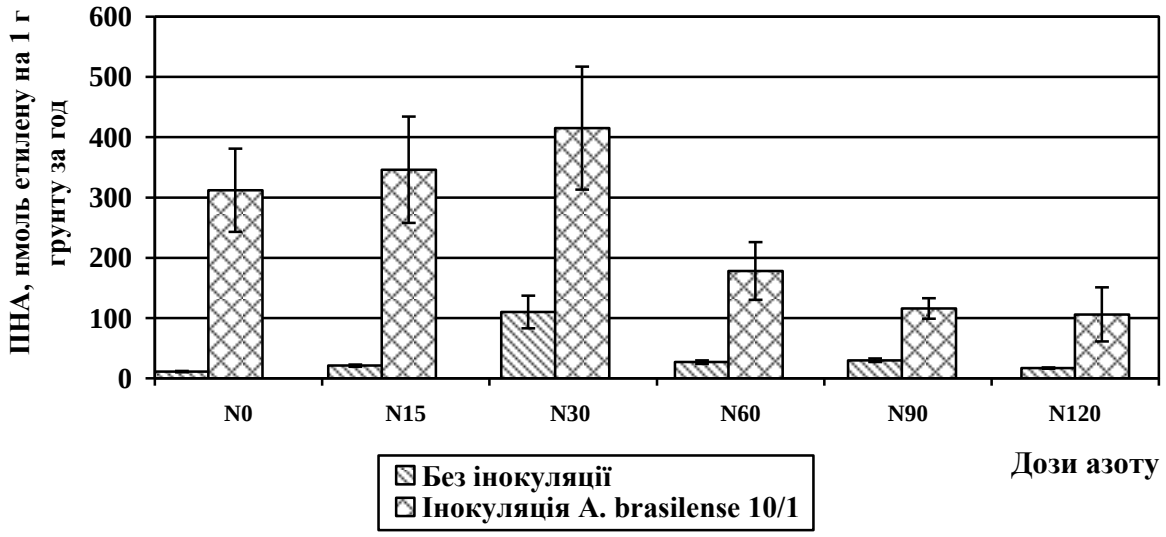


Рис. 4.6 Потенційна нітрогеназна активність у ризосфері тритикале ярого за інокуляції *Azospirillum brasilense* 10/1 та різних доз мінерального азоту *(вегетаційний дослід)*

Поєднання інокуляції тритикале *A. brasilense* 10/1 з внесенням вище зазначеної дози азоту сприяло підвищенню ПНА у ризосфері культури у 3,8 раза порівняно з варіантом без інокуляції. У міру збільшення дози азоту до 120 кг/га відбувалося зниження потенційної активності нітрогенази як у варіантах без інокуляції, так і у варіантах з бактеризацією насіння *A. brasilense* 10/1 (рис. 4.6).

Як видно з рис. 4.7, інокуляція насіння тритикале ярого *A. brasilense* 10/1 на початкових етапах розвитку забезпечила прибавку надземної маси рослин, що еквівалентна внесенню 30 кг/га мінерального азоту.

Рис. 4.7 Рослини тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції *A. brasilense* 10/1 та внесення мінерального азоту

Для пояснення позитивного ефекту від інокуляції зернових азоспірилами необхідно було дослідити не тільки позитивні зміни щодо нітрогеназної активності у кореневій зоні інокульованих рослин, а й перебіг біосинтетичних процесів у рослинному організмі під впливом діазотрофа.

Згідно сучасних уявлень, молекулярний азот атмосфери, який у процесі функціонування асоціативних систем "діазотрофи – рослина" перетворюється на амоній, асимілюється рослиною у вигляді органічних сполук азоту. Ключовим ферментом азотного обміну як для бактерій, так і для рослин є глутамінсинтетаза, що каталізує утворення амінокислоти глутаміну з L-глутамату за участю АТФ (так звана прогресивна гілка азотного обміну).

На сьогодні структурна організація, каталітичні та регуляторні функції глутамінсинтетаз вивчаються у багатьох лабораторіях світу. В роботах Окона і Готьє зі співавторами показано чітку кореляцію між активностями нітрогенази і глутамінсинтетази азоспірил [164, 196].

Щодо активності рослинної глутамінсинтетази, Дубицьким та співавторами встановлено, що даний фермент відіграє провідну роль в асиміляції амонійного азоту за оптимальних умов живлення і розвитку рослин пшениці озимої. Несприятливий режим живлення та низький рівень продуктивності пшениці супроводжувався зниженням активності глутамінсинтетази в листках рослин [31].

Вплив бактеризації діазотрофами на активність рослинної глутамінсинтетази залишається мало дослідженим, літературні дані щодо цього питання здебільшого стосуються симбіотичної азотфіксації. У роботі Давидової М.О., присвяченій регуляції активності глутамінсинтетази і глутаматдегідрогенази в рослинах люпина білого, показано, що при засвоєнні симбіотично фіксованого азоту зростає активність глутамінсинтетази у листках та бульбочках рослин. Автор також відмічає позитивну кореляцію активності глутамінсинтетази з приростом біомаси вісьових органів та листків [26]. Підвищення глутамінсинтетазної активності

у листках рослин сої за використання мікробних препаратів Ризоторфіну та Ризогуміну показано також у роботі Комка М. С. Як свідчать одержані ним результати, найсуттєвіше активність ферменту зростала у варіанті з інокуляцією насіння Ризогуміном – у 1,74 раза за наявності фонової популяції ризобій і у 2,69 раза за її відсутності. Високу активність глутамінсинтетази у цих варіантах автор пов'язує як з високою нітрогеназною активністю бульбочок сої, так і з позитивним впливом фізіологічно активних речовин (особливо цитокінінової природи), що входять до складу препарату [43].

Дані про активність рослинної глутамінсинтетази та вміст розчинного білка у листках ярих пшениці та тритикале за інокуляції азоспірилами наведено у таблиці 4.11.

Таблиця 4.11

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

Варіанти досліду		Глутамінсинтетазна активність, мкмоль P_i / мг білка / год	Вміст розчинного білка, мг / г
Пшениця яра	Без інокуляції (контроль)	2,42	22,88
	Інокуляція *A. brasilense* 77	3,80	25,09
Тритикале яре	Без інокуляції (контроль)	3,49	19,56
	Інокуляція *A. brasilense* 77	6,00	22,75
$НІР_{0,5}$		0,57	0,24

Як свідчать одержані результати, інокуляція рослин активним штамом *A. brasilense* 77 привела до вірогідного підвищення глутамінсинтетазної

активності тканин пшениці ярої сорту Варяг на 58,0 %, тритикале ярого сорту Оберіг харківський – на 71,9 % (табл. 4.11).

Зростання активності зазначеного ферменту, в свою чергу, вплинуло на синтез білка у листках рослин. Так, за інокуляції азоспірилами вміст білка у листках рослин пшениці ярої та тритикале ярого підвищився відповідно на 9,7 і 16,3 % (табл. 4.11).

Вплив інокуляції насіння пшениці ярої та тритикале ярого штамами *Azospirillum brasilense* 77 і 10/1 на масу сухої речовини в рослинах наведено у табл. 4.12.

Таблиця 4.12

Вплив інокуляції насіння активними штамами діазотрофів на масу сухої речовини в рослинах пшениці ярої та тритикале ярого

(вегетаційний дослід)

Варіанти	Суха надземна маса однієї рослини, мг	Маса повітряно висушених коренів однієї рослини, мг
Пшениця яра		
Контроль (без інокуляції)	179±4	33±3
Інокуляція насіння *Azospirillum brasilense* 77	195±3	39±4
Інокуляція насіння *A. brasilense* 10/1	182±6	33±2
Тритикале яре		
Контроль (без інокуляції)	200±9	37±1
Інокуляція насіння *A. brasilense* 77	202±9	34±1
Інокуляція насіння *A. brasilense* 10/1	227±12	42±3

Згідно одержаних результатів, 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 зростанню маси рослин тільки у варіанті з *A. brasilense* 10/1: суха надземна маса підвищувалася на 13,5%, маса повітряно висушених коренів – на 13,3 %.

Результати, одержані у вегетаційних дослідах, підтверджують перспективність використання штаму *A. brasilense* 10/1 для інокуляції тритикале ярого, а штаму *A. brasilense* 77 – пшениці ярої.

Підсумовуючи результати, викладені у розділі, можна зробити наступні висновки.

Встановлено, що у кореневій зоні пшениці ярої та тритикале ярого створюються сприятливі умови для розвитку бактерій родів *Azospirillum, Azotobacter, Pseudomonas, Enterobacter, Bacillus, Clostridium.*

Показано, що найбільш активними діазотрофами були бактерії роду *Azospirillum.*

Шляхом аналітичної селекції відібрано штами *A. brasilense* 10/1 і 77, перспективні для інокуляції тритикале ярого і пшениці ярої.

Нові штами *A. brasilense* 10/1 і *A. brasilense* 77 захищено патентами України № 104212 і № 105118.

Основні одержані нами результати наведені в опублікованих наукових працях [69, 70, 72, 107-109].

РОЗДІЛ 5
ВПЛИВ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 10/1 НА ВНУТРІШНЬОСОРТОВИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО ЗА ЗДАТНІСТЮ ПІДТРИМУВАТИ АСОЦІАТИВНУ АЗОТФІКСАЦІЮ

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

За емпіричними даними побудовано графіки розподілу значень ПНА на коренях рослин тритикале ярого (рис. 5.1, 5.2).

Для характеристики варіаційних рядів ПНА на коренях контрольних та інокульованих рослин застосовували такі статистичні показники як середнє ($\bar{x} \pm S_x$), медіана (Me), модальний інтервал (Mo), стандартне відхилення (σ), коефіцієнт варіації (Vp), найменше і найбільше значення (Lim), коефіцієнти асиметрії (As) та ексцесу (Ex) (табл. 5.1).

Оскільки на величину середнього арифметичного значною мірою можуть впливати крайні варіанти варіаційного ряду, які є найменш характерними для досліджуваної сукупності, для узагальненої характеристики ми визначали також медіану і модальний інтервал. Медіана – середня, яка розподіляє варіаційний ряд навпіл, модальний інтервал – клас, що має найбільшу частоту [47]. Як абсолютний і відносний показники варіації визначали стандартне відхилення і коефіцієнт варіації. Для позначення границь, в межах яких варіювала ПНА на коренях рослин різних варіантів, навели найменше і найбільше значення. Для оцінки ступеню асиметрії та характеристики гостровершинності розподілу визначали коефіцієнти асиметрії та ексцесу.

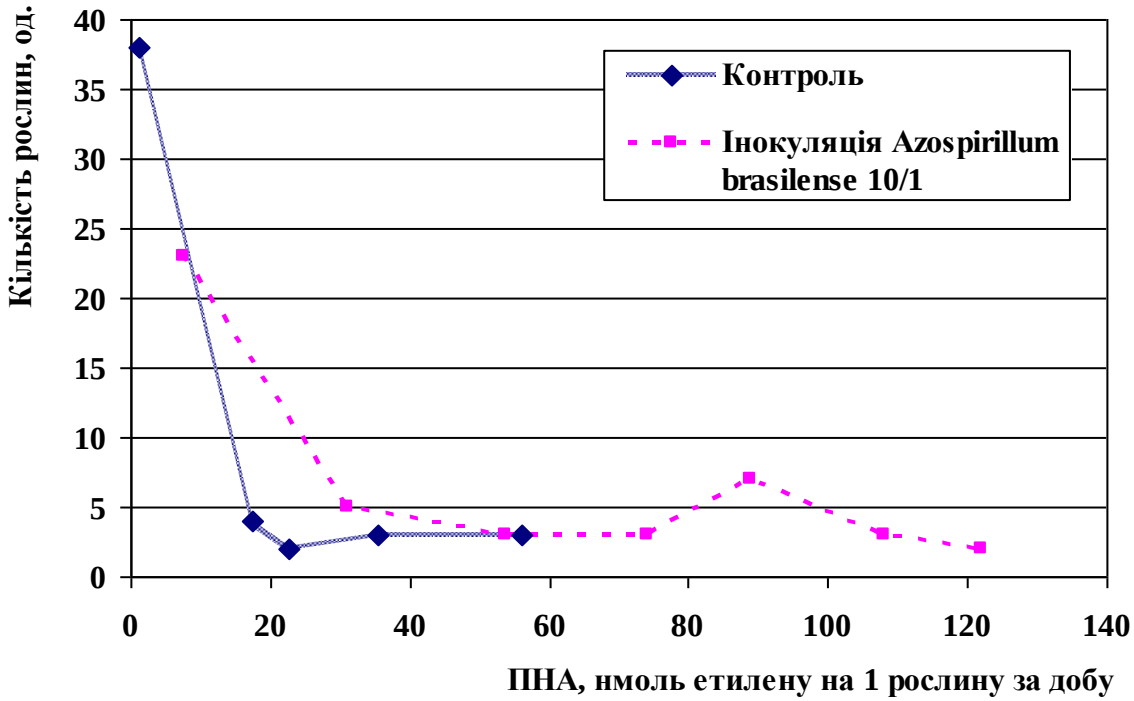


Рис. 5.1 Розподіл значень потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале ярого сорту Коровай харківський

На рис. 5.1 представлено графіки розподілу значень ПНА на коренях рослин тритикале ярого сорту Коровай харківський. Асоціація рослин даного сорту з грунтовими діазотрофами характеризується низьким азотфіксувальним потенціалом, адже ПНА на коренях переважної більшості рослин не перевищувала 10 нмоль етилену на одну рослину за добу, розподілу властива лівобічна асиметрія (As>0). При цьому даному сорту властива і значна варіабельність за азотфіксувальною активністю (показник коливався в діапазоні від 0,12 до 59,34 нмоль етилену на одну рослину за добу, коефіцієнт варіації (Vp) становив 178 %). Відомо, що для нормального розподілу коефіцієнти асиметрії та ексцесу дорівнюють нулю. Високі коефіцієнти асиметрії та ексцесу, встановлені для контрольних вибірок, свідчать про різке відхилення розподілу рослин тритикале ярого nis-ознакою від нормального (табл. 5.1). 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 (Vp)

знижувався до 98 %, що характеризує вибірку інокульованих рослин як дещо більш однорідну за ПНА, ніж у контрольному варіанті (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

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

Стати-стичний показник	Сорт			
	Коровай харківський		Оберіг харківський	
	Контроль	Інокуляція *A. brasilense* 10/1	Контроль	Інокуляція *A. brasilense* 10/1
$\bar{x} \pm S_x$, нмоль етилену на рослину за добу	8,75±2,22	41,55±6,02	19,37±4,39	62,58±5,25
σ, нмоль етилену на рослину за добу	15,07	40,83	30,70	35,19
Me, нмоль етилену на рослину за добу	0,75	18,50	2,7	62,5
Mo, нмоль етилену на рослину за добу	0-10	0-20	0-20	40-60
$Vp \pm m_v$, %	178±18	98±4	158±16	56±6
Lim, нмоль етилену на рослину за добу	0,12…59,34	2,67…128,22	0,18…130,34	2,14…139,88
As	2,32	0,69	1,96	0,13
Ex	4,85	-1,07	3,48	-0,77

Вивчення внутрішньосортової мінливості сорту Оберіг харківський за потенційною нітрогеназною активністю на коренях рослин, як і у попередньому випадку, показало, що в популяціях переважали рослини з

низьким проявом даної ознаки (модальний інтервал – від 0 до 20 нмоль етилену на одну рослину за добу). Але слід зазначити, що для даного сорту характерна більша кількість рослин з підвищеною азотфіксувальною активністю на коренях, яка в окремих випадках становила 128 нмоль етилену на одну рослину за добу (рис. 5.2).

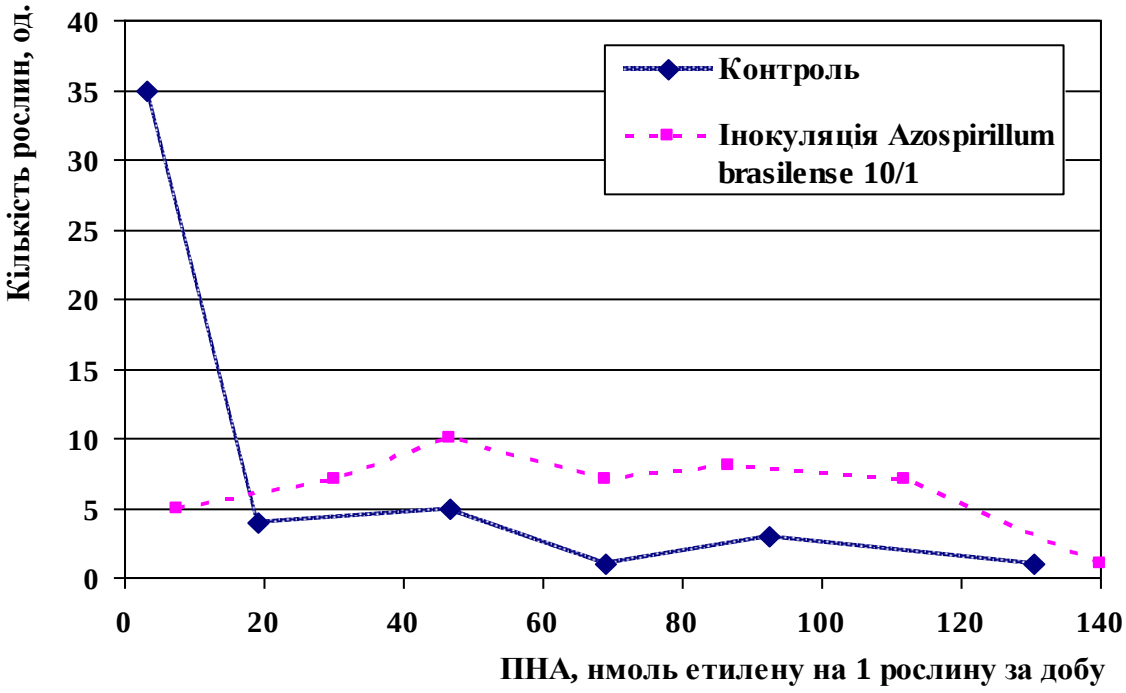


Рис. 5.2 Розподіл значень потенційної нітрогеназної активності на коренях рослин тритикале ярого сорту Оберіг харківський

Інокуляція тритикале сорту Оберіг харківський *A. brasilense* 10/1 приводила до підвищення ПНА в середньому у 3,2 рази, і, що особливо важливо, сприяла нормалізації розподілу значень азотфіксувальної активності у кореневій зоні рослин. Так, модальний інтервал зміщувався від 0-20 до 40-60 нмоль етилену на одну рослину за добу, асиметрія змінювалася від украй високої – 1,96 до слабкої – 0,13, від'ємний коефіцієнт ексцесу (Ex) вказує на плосковершинний, більш рівномірний характер розподілу, коефіцієнт варіації (Vp) знижувався за інокуляції у 2,8 раза (табл. 5.2).

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

Основні одержані нами результати наведені в опублікованій науковій праці [72].

РОЗДІЛ 6
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 [46]. В цьому відношенні заслуговує на увагу порівняно нова в рослинництві культура – тритикале яре. Завдяки комплексу фізико-біологічних і хіміко-технологічних властивостей, що характеризують якість зерна та зеленої маси, тритикале знаходить застосування у хлібопекарській, кондитерській, спиртовій, пивоварній промисловості та у виготовленні кормів для тваринництва [11-13, 94]. Для зерна тритикале відмічають найвищу серед зернових поживну цінність за більш низької собівартості [49]. За загальним вмістом білку (в середньому 14-16 %) і вмістом незамінної амінокислоти лізину (3,5-3,8 %) воно переважає зерно батьківських форм [12, 37]. Застосування даної культури у кормовиробництві зумовлене високим урожаєм зеленої маси, що має значні переваги над житом та пшеницею за вмістом протеїну, цукрів і каротиноїдів [49]. Крім цього, зерно тритикале містить удвічі менше, ніж жито, антипоживних речовин – алкілрезорцинолів [12].

Тритикале яре набуло найбільшого поширення в Австралії, Польщі, Україні, Білорусії, Іспанії [120]. До Державного реєстру сортів рослин України станом на грудень 2016 року занесено 15 сортів тритикале ярого [28].

Завдяки корисним властивостям (пластичність до умов вирощування), цінним біологічним особливостям (високій здатності

засвоювати поживні елементи, підвищеної стійкості до заморозків, посухи, хвороб та шкідників) тритикале яре стало досить поширеною зерновою культурою в центральному та північному Степу, Лісостепу та Поліссі України і використовується як страхова культура при пересіві озимини [120].

За умов мінімального рівня енергетичних та матеріальних затрат тритикале яре вважається культурою, найбільш пристосованою до біологізації сільського господарства, і може гарантувати одержання високоякісного урожаю зерна [80].

Для отримання високих врожаїв тритикале визначальне значення має азотне живлення [24]. Так, Л. Ю. Блажевич методом дисперсійного аналізу результатів багаторічних досліджень встановлено, що продуктивність тритикале ярого сорту Арсенал на 62,3 % визначається системою удобрення, на 18,6 % – погодними умовами, на 4,9 % – системою захисту рослин [16].

Інтродукція асоціативних азотфіксаторів у зону коренів дає змогу 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 кореневих 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 [9].

Одними з найбільш активних асоціативних діазотрофів є представники роду *Azospirillum,* що утворюють ефективні асоціації з рослинами пшениці, жита, ячменю, гречки тощо і успішно використовуються як біоагенти мікробних препаратів для підвищення урожайності зазначених сільськогосподарських культур. Щодо тритикале ярого такі дані в літературі відсутні.

Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення ефективності нового перспективного штаму *A. brasilense* 10/1 для підвищення урожайності тритикале ярого і покращення якості одержаної продукції.

Позитивний вплив інокуляції азоспірилами на урожайність злакових культур може бути забезпечений як за рахунок підвищення азотфіксувальної активності у кореневій зоні рослин, так і завдяки їх здатності продукувати речовини фітогормональної природи.

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 (рис. 6.1).

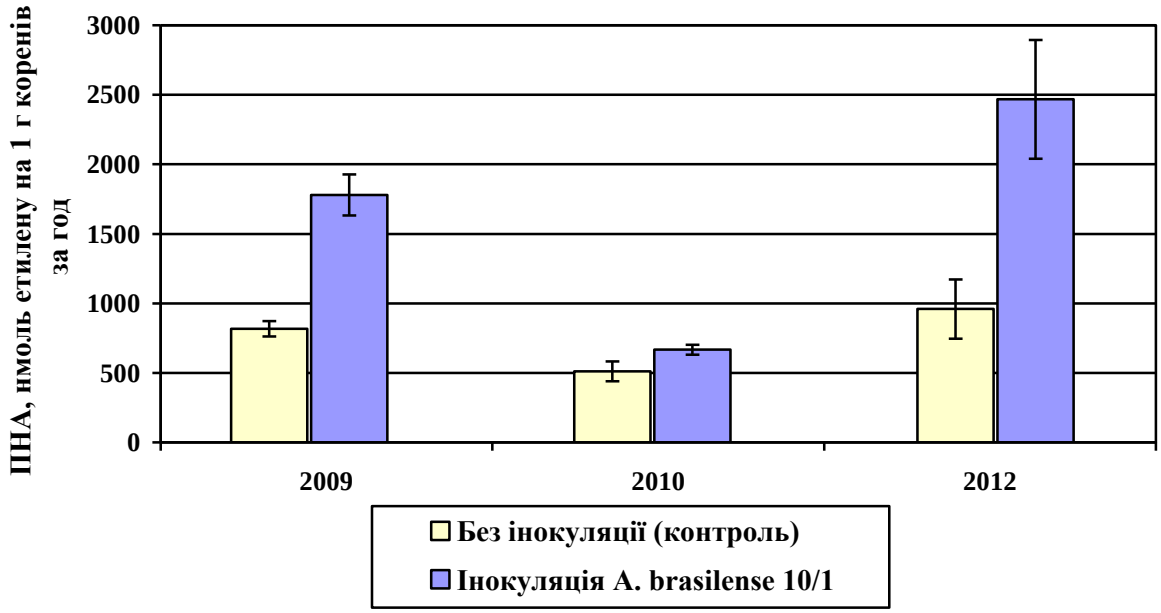


Рис. 6.1 Потенційна нітрогеназна активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції *A. brasilense* 10/1 *(фаза цвітіння, польові досліди, 2009, 2010, 2012 рр.)*

Здатність штаму *A. brasilense* 10/1 продукувати рістстимулювальні речовини досліджували на проростках тритикале ярого сорту Вікторія (рис. 6.2). Як свідчать дані, наведені на рис. 6.2, найбільш істотний приріст сухої надземної маси проростків до контролю (обробка насіння стерильною

водою) спостерігався за розведення культуральної рідини штаму у співвідношенні 1:50 і становив 36,2 %. Подальше розведення культуральної рідини супроводжувалося зниженням приросту маси. Використання нерозведеної культуральної рідини не викликало пригнічення росту проростків тритикале.

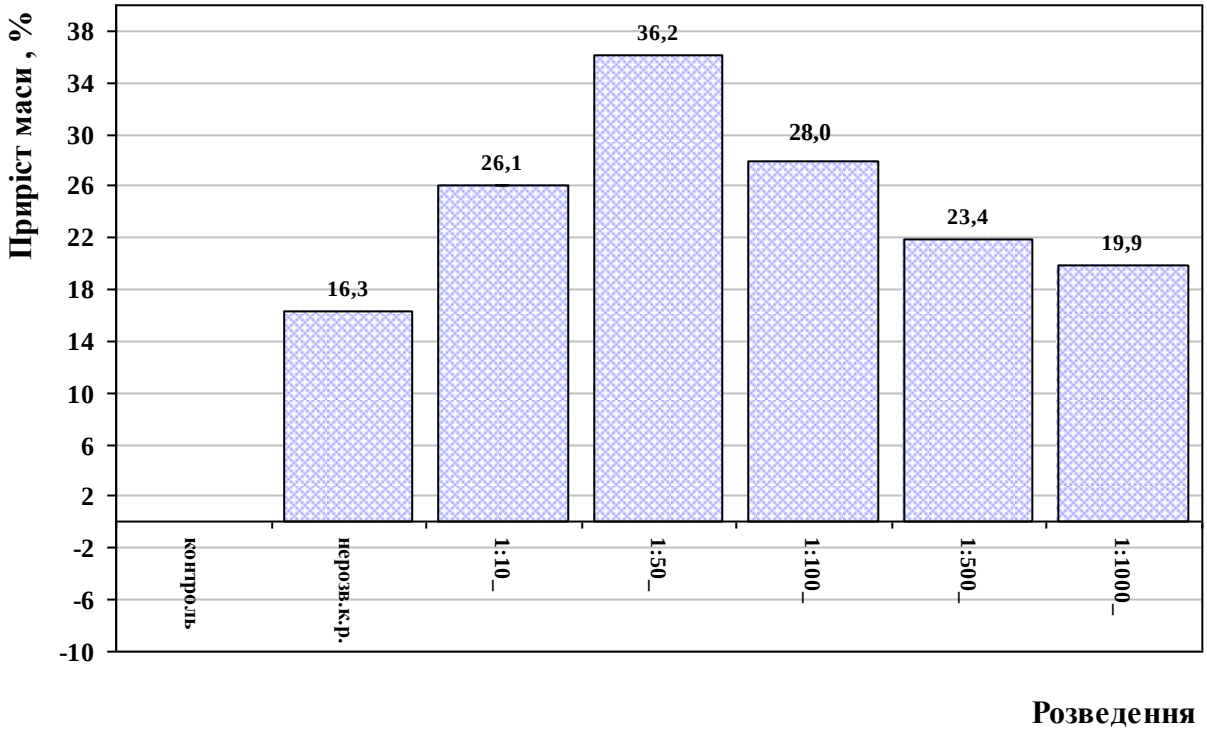


Рис. 6.2 Приріст сухої надземної маси проростків тритикале ярого сорту Вікторія за обробки культуральною рідиною *A. brasilense* 10/1

Отже, штам *A. brasilense* 10/1 впливає на ріст і 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 16,39 % до контролю (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

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

Варіант	Урожайність, т/га				Приріст до контролю, %
	2009 р.	2010 р.	2012 р.	Середнє	
Без інокуляції (контроль)	3,85	2,59	2,77	3,07	-
Передпосівна інокуляція	4,35	3,20	3,17	3,57	16,39
$НІР_{05}$	0,28	0,17	0,16	-	-

Оскільки тритикале є пшенично-житнім амфідиплоїдом, у польових дослідах 2010 та 2012 року використовували як позитивний контроль біоагент мікробного препарату Діазобактерину – штам *A. brasilense* 18-2, рекомендований для інокуляції жита озимого (рис. 6.3).

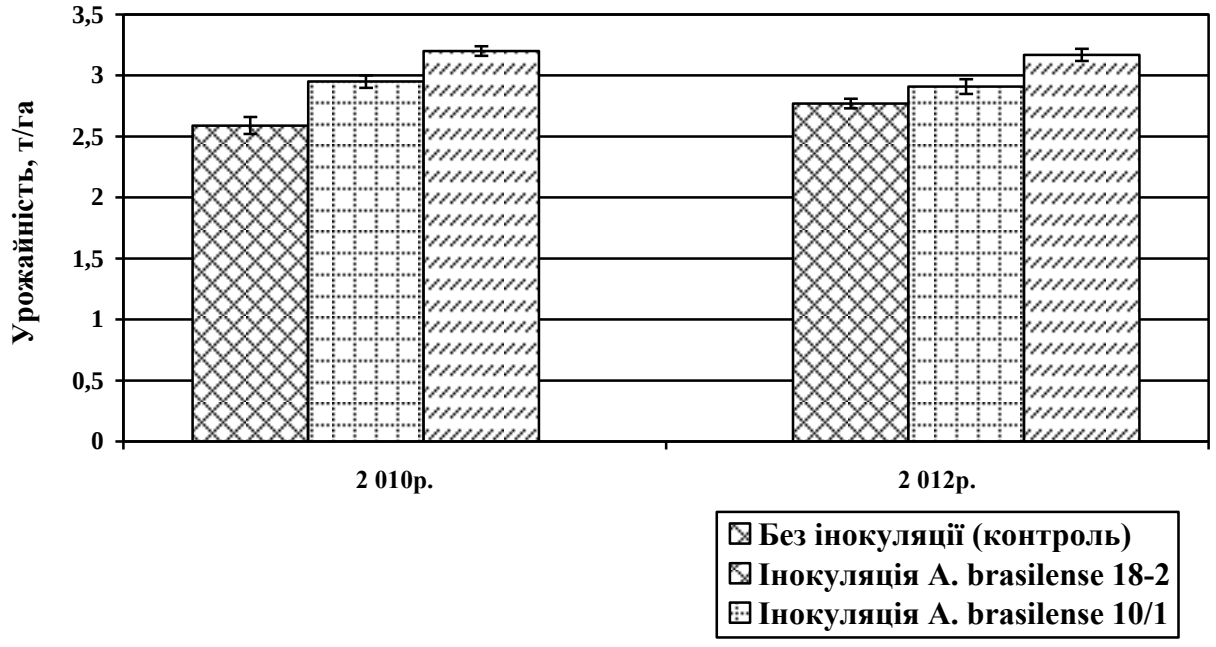


Рис. 6.3 Урожайність тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції активними штамами діазотрофів *(польові досліди, 2010, 2012 рр.)*

Згідно одержаних результатів, зернова продуктивність тритикале ярого у варіанті з інокуляцією насіння *A. brasilense* 18/2 перевищувала

абсолютний контроль на 5,0-13,9 %. Приріст урожайності від застосування нового перспективного штаму *A. brasilense* 10/1 становив 8,5-8,9 % до позитивного контролю і 14,4-23,6 % до абсолютного контролю, що свідчить про його ефективність і певну специфічність до культури тритикале ярого (рис. 6.3).

Проведений структурний аналіз урожаю показав, що передпосівна інокуляція тритикале ярого штамом *A. brasilense* 10/1 сприяла збільшенню висоти рослин на 1,4-1,8 см, у той час як бактеризація насіння *A. brasilense* 18-2 на даний показник істотно не вплинула (рис. 6.4).

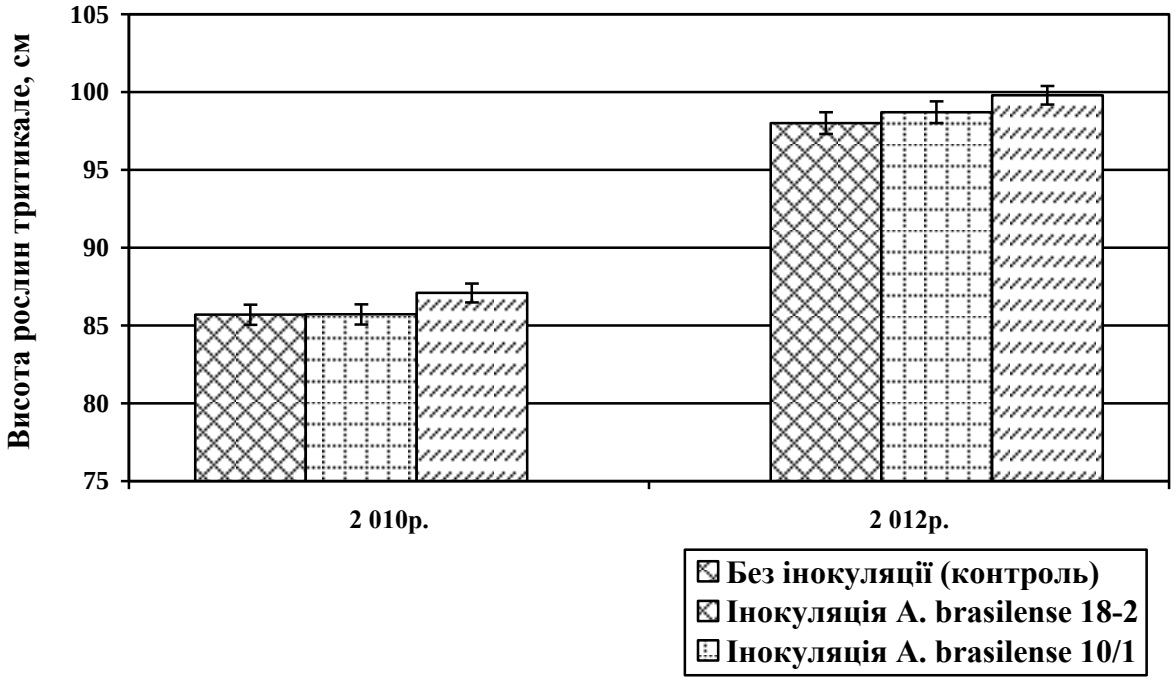


Рис. 6.4 Висота рослин тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції активними штамами діазотрофів
(польові досліди, 2010, 2012 рр.)

Найбільш визначальними для формування урожайності тритикале ярого вважаються такі елементи структури урожаю як кількість і маса зерен з одного колосу та маса 1000 зерен [48]. Їх рівень більшою мірою залежить від еколого-географічних умов, погодно-кліматичного фактору

вегетаційного періоду, якості і своєчасності проведення агротехнологічних заходів на відміну від показників довжини колоса і кількості колосків у колосі, які вважаються стабільними і залежать від властивостей конкретного генотипу [21].

Як свідчать одержані нами результати, інокуляція насіння тритикале ярого активними штамами азоспірил сприяла вірогідному підвищенню кількості і маси зерен в одному колосі у 2010 і менш істотно вплинула на зазначені показники у 2012 році (рис. 6.5, 6.6).

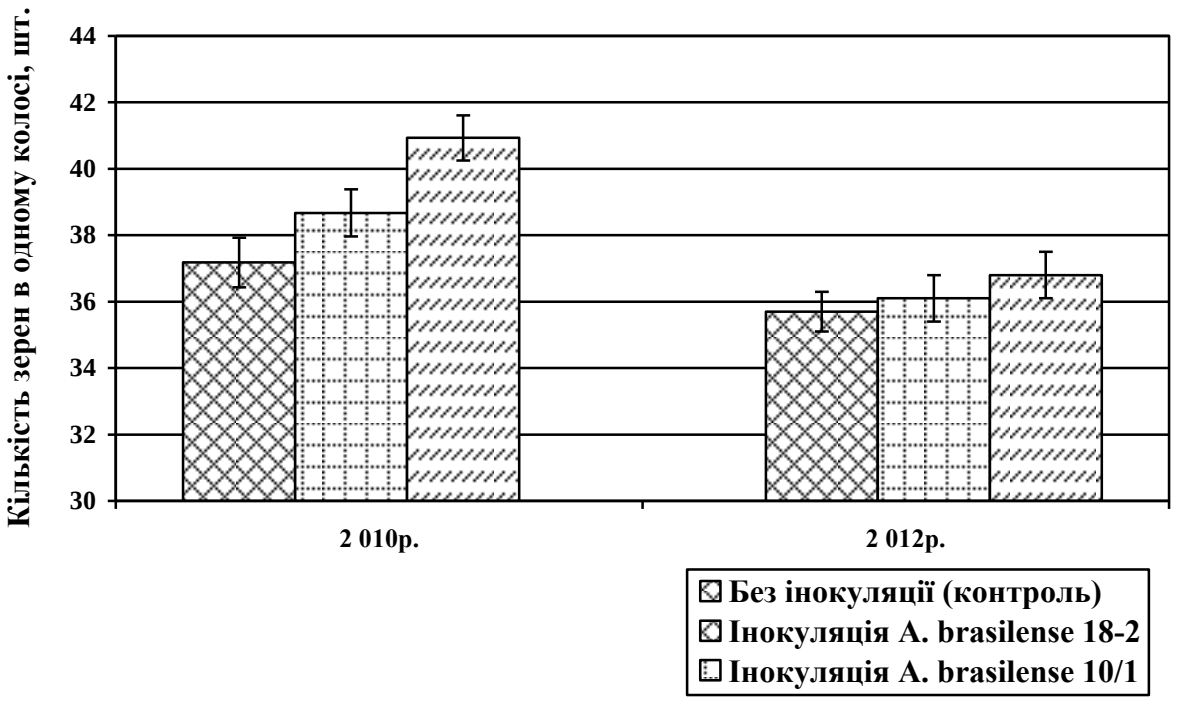


Рис. 6.5 Кількість зерен в одному колосі тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції активними штамами діазотрофів *(польові досліди, 2010, 2012 рр.)*

Слід зазначити, що за кількістю і масою зерен з одного колосу варіант з передпосівною інокуляцією насіння новим штамом *A. brasilense* 10/1 переважав як абсолютний, так і позитивний контроль. За інокуляції *A. brasilense* 10/1 кількість зерен в колосі тритикале збільшувалася на 3,1-

10,1 %, маса зерен з одного колосу – на 14,5-21,1 % відносно абсолютного контролю.

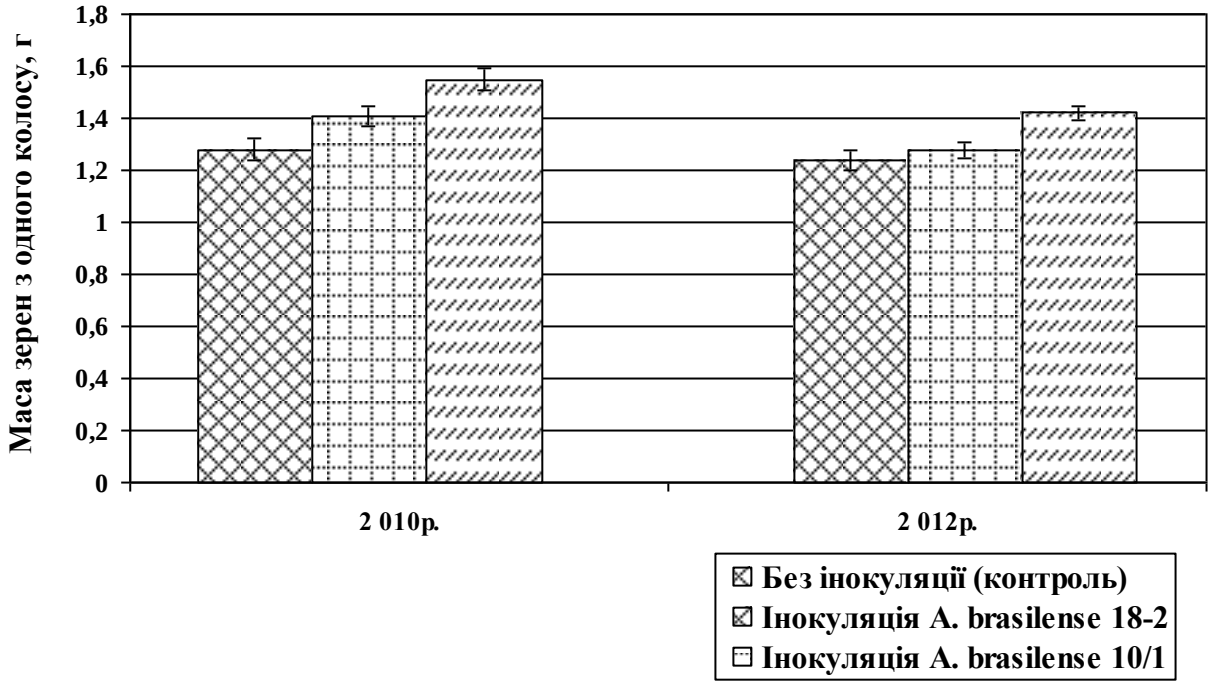


Рис. 6.6 Маса зерен з одного колосу тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції активними штамами діазотрофів *(польові досліди, 2010, 2012 рр.)*

Наступний важливий показник, на який було виявлено вплив інокуляції діазотрофами, – маса 1000 зерен, що характеризує крупність і виповненість зерна і визначає його технологічну цінність (рис. 6.7). Зазначений елемент структури урожаю тісно пов'язаний з продуктивністю колоса і натурою зерна і поряд з генетичними особливостями сорту значною мірою залежить від умов середовища, а саме температури, вологості, засміченості посівів, пошкодження шкідниками тощо [93].

Як видно з рис. 6.7, обидва штами азоспірил вірогідно підвищували масу 1000 насінин порівняно з контрольним варіантом. Так, застосування для передпосівної бактеризації *A. brasilense* 18/2 сприяло збільшенню даного показника на 3,4-7,7 %, *A. brasilense* 10/1 – на 11,8-11,9 % відносно контролю у різні роки досліджень.

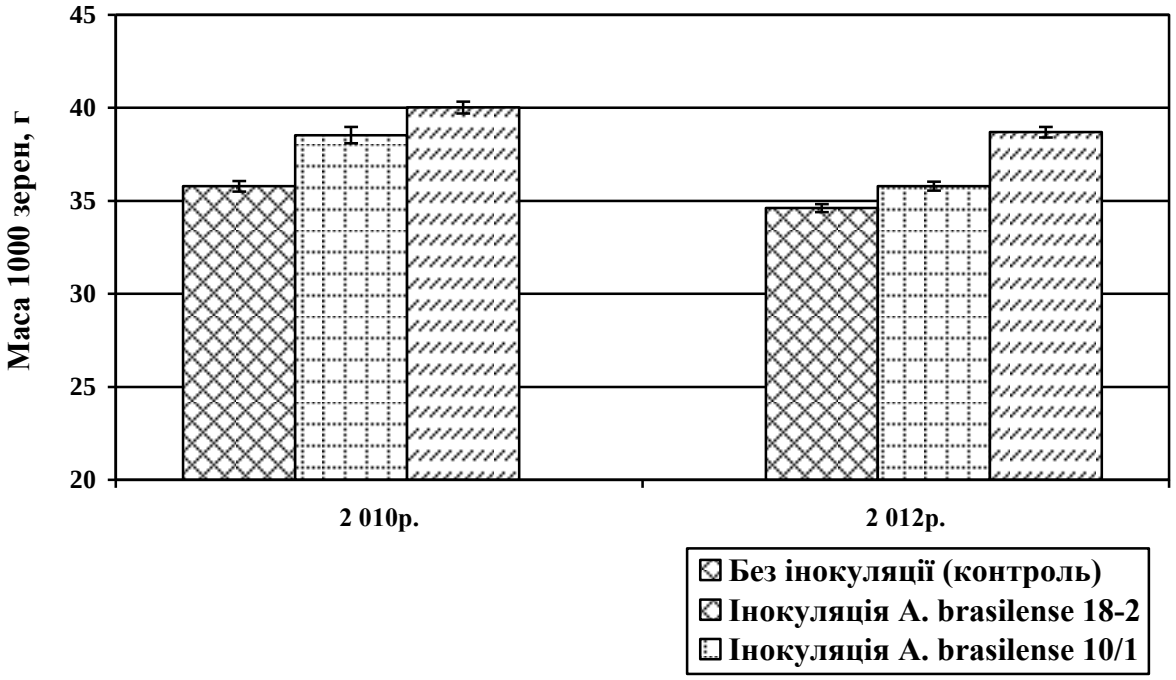


Рис. 6.7 Маса 1000 зерен тритикале ярого сорту
Оберіг харківський за інокуляції активними штамами діазотрофів
(польові досліди, 2010, 2012 рр.)

Оскільки новий штам *A. brasilense* 10/1 є активним асоціативним діазотрофом, досліджували його вплив на вміст азоту в зерні тритикале ярого (табл. 6.2). Згідно даних О. М. Павлова, вміст азоту в зерні злакових культур за низьких доз азотного удобрення, як правило, не змінюється, оскільки він використовується на формування маси зерна. За високого вмісту азоту у ґрунті його достатньо для формування маси зерна, і відбувається підвищення концентрації азоту у зерні [68]. П. Р. Шотт вважає, що відмітною особливістю дії біопрепаратів є переважне надходження додатково засвоєного азоту до репродуктивних органів рослин і пропорційне збільшення їх маси, в результаті чого істотно зростає урожай зерна і значно меншою мірою – вміст у ньому азоту [116]. Результати наших досліджень підтверджують наведені вище дані і свідчать про тенденцію до підвищення вмісту азоту в зерні тритикале за інокуляції на рівні 6 в. п. поряд зі значним вірогідним зростанням крупності зерна і урожайності культури.

Вміст фосфору і калію в зерні тритикале підвищувався відповідно на 25 і 20 в. п. порівняно з контролем (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Вміст макроелементів у зерні тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції насіння активним штамом *A. brasilense* 10/1

(польовий дослід, 2009 р.)

Варіанти досліду	Вміст, %		
	Азот	Фосфор	Калій
Без інокуляції (контроль)	2,12±0,07	0,87±0,03	0,25±0,01
Інокуляція *A. brasilense* 10/1	2,25±0,09	1,09±0,03	0,30±0,01

Одночасно з підвищенням урожайності тритикале передпосівна бактеризація насіння *A. brasilense* 10/1 позитивно вплинула на якість одержаного урожаю. Поняття “якість зерна” можна визначити як взаємозв’язок успадованих генетичних властивостей організму рослин з комплексом зовнішніх умов в процесі достигання, збирання, зберігання і переробки зерна [85].

Найбільш важливими показниками якості зерна є вміст у ньому білка, клейковини і натурна маса зерна.

За даними О. О. Саричевої препарати асоціативних діазотрофів можуть або підвищувати масу зерна без підвищення його білковості, або збільшують вміст білка в зерні, не впливаючи на продуктивність злакової культури. Зазначені протилежні тенденції, на думку автора, проявляються залежно від реакції асоціації сорт-діазотроф на величину фона азотного живлення [35].

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 %, сирої клейковини – від 29,00 до 35,17 %, якість клейковини покращувалася на 19 одиниць ІДК (за шкалою вимірювання деформації клейковини), натурна маса зерна збільшувалася на 7,3 % (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

Якість зерна тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції насіння активним штамом *A. brasilense* 10/1

(польовий дослід, 2009 р.)

Варіанти досліду	Вміст білка, %	Вміст сирої клейковини, %	ІДК, од.	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 *A. brasilense* 10/1	14,06±0,42	35,17±1,05	80,09±0,52	735,54±22,05

Виробнича перевірка ефективності нового штаму *A. brasilense* 10/1 для підвищення урожайності різних сортів тритикале ярого була проведена у 2010-2012 роках на випробувально-демонстраційному полігоні приватного підприємства “Аграрна компанія 2004” (табл.6.4-6.6).

Результати виробничої перевірки підтвердили дані, одержані у польових дослідах. Так, приріст урожайності від застосування штаму *A. brasilense* 10/1 в посівах тритикале ярого сорту Оберіг харківський, районованого для зони Полісся і Лісостепу, становив у середньому за 2010-2012 роки досліджень 0,31 т/га або на 8,0 %)(табл. 6.4).

Таблиця 6.4

Урожайність зерна тритикале ярого сорту Оберіг харківський за інокуляції насіння активним штамом *A. brasilense* 10/1

(виробничі досліди, 2010-2012 рр.)

Варіанти досліду	Урожайність, т/га				Приріст до контролю, %
	2010 р.	2011 р.	2012 р.	середнє	
Без інокуляції (контроль)	3,67	3,79	4,11	3,86	-
Інокуляція *A. brasilense* 10/1	3,98	4,13	4,39	4,17	8,0
$НІР_{05}$	0,11	0,09	0,08	-	-

Окрім сорту Оберіг харківський, який є джерелом виділення штаму *A. brasilense* 10/1 і використовувався нами як об'єкт досліджень у вегетаційних і польових дослідах, до виробничих випробувань були залучені сорти тритикале ярого Легінь харківський та Коровай харківський (табл.6.5-6.6).

Таблиця 6.5

Урожайність зерна тритикале ярого сорту Легінь харківський за інокуляції насіння активним штамом *A. brasilense* 10/1

(виробничі досліди, 2010-2012 рр.)

Варіанти досліду	Урожайність, т/га				Приріст до контролю, %
	2010 р.	2011 р.	2012 р.	середнє	
Без інокуляції (контроль)	3,84	3,92	4,42	4,06	-
Інокуляція *A. brasilense* 10/1	4,17	4,29	4,68	4,38	7,9
$НІР_{05}$	0,08	0,09	0,10	-	-

Сорт Легінь харківський завдяки підвищеній посухостійкості рекомендується як основна та страхова культура для вирощування на продовольче, технічне та фуражне зерно в Степових районах, характеризується стабільною урожайністю, що на 1,1 т/га вище національного стандарту – сорту Аіст харківський.

Передпосівна інокуляція тритикале сорту Легінь харківський забезпечила підвищення урожайності у середньому за 2010-2012 роки досліджень від 4,06 до 4,38 т/га (на 0,32 т/га або на 7,9 %) (табл. 6.5).

Сорт Коровай харківський, рекомендований до вирощування у зонах Лісостепу та Степу України, за середньою урожайністю у конкурсному сортовипробуванні перевищує національний стандарт Аіст харківський на 0,9 т/га.

Результати проведених виробничих досліджень засвідчили, що застосування штаму азотфіксувальних бактерій *A. brasilense* 10/1 в посівах тритикале ярого сорту Коровай харківський сприяло підвищенню урожайності від 3,84 до 4,17 т/га (на 0,33 т/га або на 8,6 %) (табл. 6.6).

Таблиця 6.6

Урожайність зерна тритикале ярого сорту Коровай харківський за інокуляції насіння активним штамом *A. brasilense* 10/1

(виробничий дослід, 2010 р.)

Варіант досліду	Урожайність,т/га	Приріст до контролю, %
Без інокуляції (контроль)	3,84	-
Інокуляція *A. brasilense* 10/1	4,17	8,6
$НІР_{05}$	0,12	-

Підсумовуючи результати, викладені у розділі, можна зробити наступні висновки.

Згідно результатів трирічних польових досліджень, приріст урожайності від передпосівної інокуляції насіння тритикале ярого новим перспективним штамом *A. brasilense* 10/1 становив в середньому 0,5 т/га або 16,39 % до контролю.

Бактеризація зерна тритикале ярого *A. brasilense* 10/1 позитивно вплинула на структурні показники урожаю тритикале ярого: кількість зерен в колосі тритикале зростала на 3,1-10,1 %, маса зерен з одного колосу – на 14,5-21,1 %, маса 1000 зерен – на 11,8-11,9 %.

Встановлено, що за інокуляції насіння тритикале ярого штамом *A. brasilense* 10/1 поліпшувалася якість одержаного урожаю: вміст білка в зерні підвищувався від 12,35 до 14,06 %, сирої клейковини – від 29, 00 до 35,17 %, натурна маса зерна збільшувалася на 7,3%.

Виробнича перевірка ефективності нового штаму *A. brasilense* 10/1 підтвердила результати польових дослідів.

Основні одержані нами результати наведені в опублікованих наукових працях [69, 107].

РОЗДІЛ 7
ЕКОНОМІЧНА ТА ЕНЕРГЕТИЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ БАКТЕРИЗАЦІЇ НАСІННЯ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 10/1 ПРИ ВИРОЩУВАННІ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО

Необхідним аспектом оцінки певного агрозаходу, у даному випадку бактеризації насіння тритикале ярого штамом *A. brasilense* 10/1, є вивчення його ефективності. З видів ефективності, які розглядаються у сучасній науковій літературі [4], найбільш доречним для наших досліджень є визначення технологічної, економічної та енергетичної.

Технологічна ефективність інокуляції тритикале ярого асоціативним діазотрофом *A. brasilense* 10/1, а саме вплив зазначеного заходу на показники урожайності культури та вміст білка у зерні, була детально розглянута у попередньому розділі роботи. У даному розділі розглянемо економічний та енергетичний аспекти.

Результати розрахунків основних економічних показників виробництва зерна тритикале ярого наведено у таблиці 7.1. Результати деталізовано такими показниками економічної ефективності як собівартість одиниці продукції, прибуток із розрахунку на 1 га зібраної площі та на 1 т продукції, рентабельність виробництва та окупність додаткових витрат, пов’язаних із бактеризацією насіння *A. brasilense* 10/1.

Враховано зміну не лише тих показників, які безпосередньо пов’язані з інокуляцією (прямі витрати: вартість препарату, витрати на обробку, вартість на транспортування та доробку додаткового урожаю), а також і зміну накладних витрат, які при калькуляції собівартості продукції, розподіляються пропорційно прямим. Тобто, розраховано повну собівартість основної продукції (зерна тритикале ярого), оскільки прибуток є різницею між виручкою та повною собівартістю продукції.

Ціни на матеріально-технічні ресурси та рівень заробітної плати прийнято на середньому рівні станом на грудень 2015 року. Реалізаційні

ціни на зерно тритикале ярого прийнято на середньому рівні по сільськогосподарських підприємствах у грудні 2015 р. (за даними Головного управління статистики у Чернігівській області).

Таблиця 7.1

Основні економічні показники виробництва зерна тритикале ярого сорту Оберіг харківський за дії азотфіксувальних бактерій *A. brasilense* 10/1

Показники	Контроль	Інокуляція *A. brasilense* 10/1	Відхилення (±)	
			абсолютне	%
Урожайність, т / га	3,07	3,57	+0,50	+16,3
Витрати на 1 га на основну продукцію, грн.	5001,81	5243,87	+242,06	+4,8
У т.ч. додаткові витрати, пов’язані з інокуляцією насіння *A. brasilense* 10/1, грн. / га	×	242,06	×	×
Повна собівартість 1 т, грн.	1629,25	1468,87	−160,38	−9,8
Виручка з розрахунку на 1га *(за ціни реалізації 2500 грн. / т)*, грн.	7675,00	8925,00	+1250,00	+16,3
Прибуток на 1 га, грн.	+2673,19	+3681,13	+1007,94	+37,7
Прибуток на 1 т, грн.	+870,75	+1031,13	+160,38	+18,4
Рівень рентабельності, %	+53,4	+70,2	+16,8 в.п.	×
Окупність прибутком додаткових витрат, пов’язаних з інокуляцією, грн. / грн.	×	+4,16	×	×

Результати моделювання витрат на виробництво зерна тритикале ярого з розрахунку на 1 га посівної площі наведено в ДОДАТКАХ Д. 1 і Д. 2. Зазначені розрахунки виконано за методикою, розробленою в Інституті аграрної економіки НААН [99, 100].

Згідно даних, наведених у табл. 7.1, урожайність тритикале за інокуляції *A. brasilense* 10/1 підвищилася на 16,3 %, у той час як витрати із розрахунку на 1 га зросли тільки 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 %. При цьому рівень рентабельності виробництва піднявся з 53,4 до 70,2 %, тобто на 16,8 відсоткових пункти. В цілому отримано 4,16 грн. додаткового прибутку на кожну гривню додаткових витрат технології з бактеризацією насіння.

Отже, інокуляція насіння *A. brasilense* 10/1 сприяла значному підвищенню економічної ефективності виробництва зерна тритикале ярого.

За результатами проведеного аналізу можна виділити три основні фактори, які безпосередньо впливають на економічну ефективність досліджуваного агрозаходу: урожайність культури, витрати із розрахунку на 1 га посівів та ціна реалізації продукції. У зв’язку з цим доцільно визначити кількісний вплив зазначених факторів на зміну основних показників економічної ефективності виробництва зерна тритикале ярого: собівартість 1 т зерна, розмір прибутку із розрахунку на 1 га посівів та рівень рентабельності виробництва. З цією метою нами була використана методика детермінованого факторного аналізу.

На собівартість одиниці продукції впливають два фактори: урожайність культури та розмір витрат на 1 га посіву. За результатами аналізу показників, відповідні розрахунки яких наведено в таблиці 7.2, можна зробити висновок, що за рахунок збільшення розміру витрат із розрахунку на 1 га посіву у варіанті з бактеризацією *A. brasilense* 10/1

спостерігалося незначне підвищення собівартості 1 т зерна – на 78,85 грн. При цьому підвищення урожайності тритикале ярого за інокуляції забезпечило значне зниження собівартості продукції – на 239,23 грн. Загальне зниження собівартості за впливу обох факторів становило 160,38 грн.

Таблиця 7.2

Розрахунок впливу зміни розміру витрат на 1 га та рівня урожайності на відхилення рівня собівартості 1 т зерна тритикале ярого за інокуляції *A. brasilense* 10/1

Показники	Умовні позначення та формули розрахунку	Значення показників
Урожайність у контролі (без інокуляції), т/га	$У_к$	3,07
Урожайність у досліді (за інокуляції *A. brasilense* 10/1), т / га	$У_д$	3,57
Витрати на 1 га в контролі, грн.	$В_к$	5001,81
Витрати на 1 га в досліді, грн.	$В_д$	5243,87
Повна собівартість 1 т в контролі, грн.	$С_к = \frac{В_к}{У_к}$	1629,25
Повна собівартість 1 т в досліді, грн.	$С_д = \frac{В_д}{У_д}$	1468,87
Розрахункова собівартість 1 т, грн.	$С_р = \frac{В_д}{У_к}$	1708,10
Загальне відхилення собівартості, грн.	$С_{заг.}=С_д–С_к$	−160,38
Відхилення собівартості 1 т за рахунок зміни витрат на 1 га, грн.	$С_в=С_р–С_к$	+78,85
Відхилення собівартості 1 т за рахунок зміни урожайності, грн.	$С_у=С_д–С_р$	−239,23

На розмір прибутку із розрахунку на 1 га посівної площі впливають такі фактори як урожайність культури, ціна реалізації продукції та розмір витрат із розрахунку на 1 га посівів. Відповідні розрахунки наведено в таблиці 7.3.

Таблиця 7.3

Розрахунок впливу зміни розміру витрат на 1 га та рівня урожайності на відхилення розміру прибутку із розрахунку на 1 га посіву тритикале ярого за інокуляції *A. brasilense* 10/1

Показники	Умовні позначення та формули розрахунку	Значення показників
Урожайність у контролі (без інокуляції), т/га	$У_к$	3,07
Урожайність у досліді (за інокуляції *A. brasilense* 10/1), т/га	$У_д$	3,57
Витрати на 1 га в контролі, грн.	$В_к$	5001,81
Витрати на 1 га в досліді, грн.	$В_д$	5243,87
Ціна реалізації 1 т зерна, грн.	$Ц$	2500,0
Прибуток на 1 га в контролі, грн.	$П_к=Ц\times У_к-В_к$	2673,19
Прибуток на 1 га в досліді, грн.	$П_д=Ц\times У_д-В_д$	3681,13
Розрахунковий прибуток на 1 га, грн.	$П_р=Ц\times У_д-В_к$	3923,19
Загальне відхилення прибутку, грн.	$\Delta П_{заг.}=П_д-П_к$	1007,94
Відхилення прибутку за рахунок зміни урожайності, грн.	$\Delta П_{у.}=П_р-П_к$	+1250,0
Відхилення прибутку за рахунок зміни витрат на 1 га, грн.	$\Delta П_{в.}=П_д-П_р$	−242,06

З таблиці видно, що у варіанті з інокуляцією прибуток зменшився на 242,06 грн./га за рахунок збільшення витрат, але зріс на 1250,0 грн./га за рахунок підвищення урожайності, що забезпечило загальний приріст на рівні 1007,24 грн./га.

Розрахунок впливу зміни рівня урожайності та розміру витрат на 1 га на відхилення рівня рентабельності виробництва зерна тритикале ярого за інокуляції *A. brasilense* 10/1 наведено у таблиці 7.4. Бактеризація забезпечила загальне підвищення рівня рентабельності виробництва тритикале ярого на 16,8 в. п. Зокрема, за рахунок збільшення урожайності рентабельність підвищувалася на 25 в. п., при зменшенні на 8,2 в. п. за рахунок додаткових витрат (табл. 7.4).

Таблиця 7.4

Розрахунок впливу зміни рівня урожайності та розміру витрат на 1 га на відхилення рівня рентабельності виробництва зерна тритикале ярого за інокуляції *A. brasilense* 10/1

Показники	Умовні позначення та формули розрахунку	Значення показників
1	2	3
Урожайність у контролі(без інокуляції), т/га	$У_к$	3,07
Урожайність у досліді (за інокуляції *A. brasilense* 10/1), т/га	$У_д$	3,57
Витрати на 1 га в контролі, грн.	$В_к$	5001,81
Витрати на 1 га в досліді, грн.	$В_д$	5243,87
Ціна реалізації 1т зерна, грн.	$Ц$	2500,0
Рівень рентабельності в контролі, %	$P_к = \left(\frac{Ц \times У_к}{В_к} - 1 \right) \times 100$	53,4
Рівень рентабельності в досліді, %	$P_д = \left(\frac{Ц \times У_д}{В_д} - 1 \right) \times 100$	70,2
Розрахунковий рівень рентабельності, %	$P_р = \left(\frac{Ц \times У_д}{В_к} - 1 \right) \times 100$	78,4

Продовження таблиці 7.4

1	2	3
Загальне відхилення рівня рентабельності, в. п.	$\Delta P_{заг.} = P_д - P_к$	16,8
Відхилення рівня рентабельності за рахунок зміни урожайності, в. п.	$\Delta P_у = P_р - P_к$	25,0
Відхилення рівня рентабельності за рахунок зміни розміру витрат на 1 га, в. п.	$\Delta P_в = P_д - P_р$	−8,2

У цілому ж за результатами проведеного факторного аналізу можна зробити висновок, що підвищення економічної ефективності виробництва зерна тритикале ярого досягається завдяки вагомішому позитивному впливу зростання урожайності в порівнянні з додатковими витратами, пов’язаними бактеризацією насіння *A. brasilense* 10/1. Отже, додаткові витрати, зумовлені застосуванням зазначеного агрозаходу, багатократно окупаються.

Поряд з економічною оцінкою ефективності інокуляції насіння тритикале ярого штамом азотфіксувальних бактерій *A. brasilense* 10/1 важливою є енергетична оцінка, а саме визначення відношення кількості енергії, що накопичується в урожаї до сукупних затрат енергії, які вкладаються для одержання цього урожаю. Необхідність такої оцінки є однією з вимог сучасного виробництва заощаджувати енергію на одиницю одержуваної продукції. До того ж, на економічну оцінку, яка проводиться у вартісних показниках, впливають кон’юнктура ринку, диспаритет цін на сільськогосподарську продукцію і засоби для її виробництва, інфляційні процеси тощо. В той же час, енергетична оцінка не залежить від наведених впливів і тому забезпечує більш об’єктивну характеристику ефективності та доцільності певного агрозаходу, зокрема, бактеризації насіння тритикале ярого азоспірилами.

Нами проведено аналіз енергетичної ефективності застосування бактеризації насіння тритикале ярого *A. brasilense* 10/1 у технології

вирощування зазначеної культури за результатами приведених вище дослідів. Натуральні показники витрат ресурсів розраховано за методикою [99], а енергоємність продукції (витрати антропогенної енергії на виробництво) та енерговміст урожаю визначено за методикою [14, 93]. Розрахунок енергоємності виробництва та енерговмісту урожаю в контрольному та дослідному (застосування бактеризації) варіантах наведено в ДОДАТКУ Д. 3. Основні показники енергетичної ефективності застосування бактеризації насіння тритикале ярого *A. brasilense* 10/1 при виробництві зерна тритикале ярого наведено в табл. 7.5.

Таблиця 7.5

Розрахунок енергетичної ефективності інокуляції насіння штамом *A. brasilense* 10/1 при виробництві зерна тритикале ярого

Показники	Контроль	Інокуляція *A. brasilense* 10/1	Відхилення (±)	
			абс.	%
1	2	3	4	5
Енергоємність виробництва (сукупні затрати антропогенної енергії) МДж/га	8611,7	8953,4	+341,7	+3,9
В т.ч. додаткові витрати енергії, пов’язані з інокуляцією *A. brasilense* 10/1, МДж/га	×	341,7	×	×
Урожайність зерна, т/га	3,07	3,57	+0,5	+16,3
Енерговміст зерна, МДж/га	57071,3	66366,3	+9295,0	+16,3
Коефіцієнт енергетичної ефективності за господарсько-цінною частиною урожаю (зерном)	6,6	7,4	+0,8	×
Вихід соломи, т/га	4,9	5,7	+0,8	+16,3
Енерговміст соломи, МДж/га	85468,8	99388,8	+13920,0	+16,3

Продовження таблиці 7.5

1	2	3	4	5
Сукупний енерговміст отриманої продукції (основної та побічної), МДж/га	142540,1	165755,1	+23215,0	+16,3
в т.ч. додаткового урожаю, МДж/га	×	23215,0	×	×
Енергетична ефективність, МДж / га	+133928,4	+156801,7	+22873,3	+17,1
Коефіцієнт енергетичної ефективності за сукупним енерговмістом основної та побічної продукції	16,6	18,5	+1,9	×
Коефіцієнт ефективності додаткових витрат енергії	×	67,9	×	×

Одержані дані свідчать про те, що як контрольний, так і дослідний варіанти забезпечують перевищення енергії одержаного урожаю тритикале ярого над витратами енергії антропогенного походження на його отримання. Так, коефіцієнт енергетичної ефективності за сукупним енерговмістом основної та побічної продукції у контрольному варіанті становить 16,6, у дослідному – 18,5. Слід відмітити, що енергетична ефективність досягається навіть за господарсько-цінною частиною урожаю (зерном), не враховуючи енерговміст побічної продукції (соломи). Так, коефіцієнт енергетичної ефективності за зерном становить 6,6 у контролі та 7,4 у дослідному варіанті.

Звертає на себе увагу істотне зростання енерговмісту урожаю тритикале ярого завдяки підвищенню виходу продукції у варіанті з бактеризацією насіння (за зерном і за соломою – на 16,3 %) при незначному підвищенні енергоємності виробництва (на 3,9 %). При цьому коефіцієнт енергетичної ефективності додаткових витрат енергії, пов’язаних із застосуванням бактеризації насіння тритикале *A. brasilense* 10/1 (відношення

енерговмісту додаткової продукції до додаткової енергоємності виробництва), складав 67,9.

Отже, за підсумками дослідження економічної та енергетичної ефективності встановлено, що застосування у технології вирощування тритикале ярого передпосівної бактеризації насіння азотфіксувальними бактеріями *A. brasilense* 10/1 є економічно та енергетично вигідним. Так, за інокуляції повна собівартість 1 т зерна знижувалася на 9,8 %, прибуток з 1 га зростав на 37,7 %, рівень рентабельності виробництва підвищувався на 16,8 відсоткових пункти, окупність прибутком додаткових витрат становила 4,16 грн./грн., коефіцієнт енергетичної ефективності за зерном зростав з 6,6 до 7,4, коефіцієнт ефективності додаткових витрат енергії становив 67,9.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Результати багаторічних польових і виробничих дослідів дозволяють рекомендувати новий штам *Azospirillum brasilense* 10/1 (Патент України № 104212) для створення на його основі бактеріального препарату для передпосівної інокуляції тритикале ярого, що дозволить активізувати процес фіксації біологічного азоту в кореневій зоні рослин, забезпечити прибавку урожайності культури від 12,9 до 23,6 % залежно від року досліджень з одночасним поліпшенням якості зернової продукції (зростанням вмісту білка у зерні на 1,3 в. п., сирої клейковини – на 6,2 в. п.).

Препарат виготовляється у формі рідкого концентрату, який являє собою живильне середовище з розмноженими у ньому клітинами азоспірил. В 1 мл препарату міститься 3-5 млрд. клітин бактерій.

Місце бактеризації у технології вирощування тритикале ярого наведено у схемі.

Бактеризацію насіння здійснюють у день або за 1-2 дні до посіву. Рекомендована норма витрат препарату: 150-200 мл на 1 гектарну норму або 750-1000 мл на 1 т насіння. Препарат розводять у водогінній воді із розрахунку 10 л суспензії на 1 т насіння.

Передпосівна обробка насіння тритикале ярого азоспірилами проводиться вручну або механізованим способом. При механізованій обробці використовуються машини для протруєння насіння "Мобітокс-Супер", ПСШ-2, ПСШ-5, ПС-10 та інші, які перед інокуляцією очищають від залишків ядохімікатів і промивають.

Здорове насіння тритикале ярого можна не протруювати, а у разі необхідності для протруєння насіння дозволяються наступні препарати: Вінцит 050SC, Дезорал, Сульфокарбатіон, Фундазол. При цьому фунгіцид застосовується за 7-10 днів до бактеризації насіння, а дозу препарату збільшують.

Детально рекомендації виробництву викладено у публікації [56].

ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОЩУВАННЯ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО

Обробіток ґрунту

Оранка на глибину 18-22 см. Напередодні оранки в залежності від попередника слід провести лущення ґрунту. Рано навесні, по мірі дозрівання ґрунту – культивація з боронуванням і передпосівний обробіток агрегатом типу «Європак» на глибину загортання насіння.

Підготовка насіння, сівба

Бактеризація у день або за 1-2 дні до посіву. На одну гектарну норму насіння тритикале ярого витрачають 150-200 мл препарату. У разі необхідності для протруєння насіння дозволяються наступні препарати: *Вінцит 050SC*, *Дезорал, Сульфокарбатіон, Фундазол.* При цьому фунгіцид застосовується за 7-10 днів до бактеризації насіння, а дозу препарату збільшують.
Сівба звичайним рядковим способом на глибину 3-6 см з міжряддям 15 см, норма висіву − 4,5-6,0 млн. схожих зерен на гектар.

У фазі кущіння при сильній забур'яненості посіви обробляють гербіцидами *Гроділ Максі* (0,09-0,11 л/га), *Калібр* (0,03-0,06 кг/га), *Гранстар 75*, в. г. (0,015-0,025 кг/га) або іншими рекомендованими.

Удобрення

При використанні препарату рекомендується зменшення доз мінерального азоту, розрахованих за виносом із запланованим урожаєм, на 30-40 %.

Сівба

Проростання насіння, сходи

Третій листок, формування вузла кущіння

Кущіння

Вихід у трубку − початок колосіння

Цвітіння

Молочна стиглість

Воскова і повна стиглість

Щоб запобігти виляганню рослин, посіви тритикале ярого рекомендується обприскувати у фазі виходу в трубку (після формування першого вузла) *Хлормекват-хлоридом* (2−3 л препарату на 1 га) або препаратом *Антивилягач 675* (2 л/га).

Збирання проводять прямим комбайнуванням на початку повної стиглості.

ВИСНОВКИ

Багаторічні дослідження асоціативної азотфіксації у кореневій зоні різних сортів ярих пшениці та тритикале засвідчили існування як міжсортової, так і внутрішньосортової 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 штамами дає змогу знизити внутрішньосортову варіабельність nis-ознаки і є одним з шляхів підвищення азотфіксувального потенціалу мікробно-рослинних систем “діазотроф–зернова культура”.

1. Досліджено міжсортову мінливість ярих пшениць та тритикале за nis-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 внутрішньосортовим 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 штамами позитивно позначалася на біосинтетичних процесах рослин: глутамінсинтетазна 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 nis-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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Активность азотфиксации и азотфиксирующие микроорганизмы ризосферы озимой ржи / Н. Н. Мальцева, Е. В. Надкерничная, В. В. Волкогон, М. А. Ушакова // Микробиол. журн. — 1992. — Т. 54, № 6. — С. 10–16.

2. Аленькина С. А. Изменение метаболической активности корней проростков, индуцированное лектинами ростстимулирующих ризобактерий / С. А. Аленькина, В. Е. Никитина // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). — 2014. — № 3. — С. 1–6.

3. Анализ поверхностных структур клеток при R-S диссоциации штамма *A. brasilense* Sp7 / Л. Ю. Матора, В. А. Богатырев, Л. А. Дыкман, С. Ю. Щеголев // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В. В. Игнатова. — М.: Наука, 2005а. — С. 222–227.

4. Андрійчук В. Г. Ефективність діяльності аграрних підприємств : теорія, методика, аналіз : [монографія] / В. Г. Андрійчук. — К. : КНЕУ, 2005. — 292 с.

5. Антонюк Л. П. Регуляция метаболизма *Azospirillum brasilense* Sp245: особенности азотного обмена и влияние лектина пшеницы (агглютинина зародышей пшеницы): автореф. дис. на соискание уч. степени доктора биол. наук : спец. 03.00.04. "Биохимия" / Л. П. Антонюк — Москва, 2002. — 48 с.

6. Балинова В. С. Статистика в вопросах и ответах : Учебное пособие / В. С. Балинова. — М. : Проспект, 2004. — 343 с.

7. Белимов А. А. АЦК-деаминаза и растительно-микробные взаимодействия / А. А. Белимов, В. И. Сафронова // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — №3. — С. 23–28.

8. Берестецький О. О. Простий метод виявлення фітотоксичних речовин, утворюваних мікроорганізмами / О. О. Берестецький // Мікробіол. журн. —1972. — Т. 34, № 6. — С. 798–799.

9. Биологическая фиксация азота: [монография в 4-х т.]. Т. 4: Ассоциативная азотфиксация / [С. Я. Коць, В. В. Моргун, В. Ф. Патика и др.] / К. : Логос , 2014. — 412 с.

10. Биорегуляция микробно-растительных систем / [Е. И. Андреюк, А. Ф. Антипчук, О. В. Бабаянц и др.] / Под ред. Г. А. Иутинской, С. П. Пономаренко. — К. : Нічлава, 2010. — 472 с.

11. Білітюк А. П. Агротехнологічні основи вирощування тритикале в Україні / А. П. Білітюк // Агроном. — 2005. — № 3. — С. 26–30.

12. Білітюк А. П. Вирощування та використання тритикале на корм у тваринництві / А. П. Білітюк, С. М. Каленська // Вісник аграрної науки. — 2003. — № 10. — С. 23–28.

13. Білітюк А. П. Культура, що збільшує рентабельність: пшениця+жито=тритикале / А. П. Білітюк // Агроном. — 2007. — № 11. — С. 96–101.

14. Біоенергетична оцінка сільськогосподарського виробництва: науково-методичне забезпечення / [Ю. О. Тараріко, О. Ю. Несмашна,О. М. Бердніков та ін.] ; за наук. ред. Ю. О. Тараріка. — К. : Аграрна наука, 2005. — 200 с.

15. Біологічний азот / [В. П. Патика, С. Я. Коць, В. В. Волкогон та ін.] ; за ред. В. П. Патики. — К.: Світ, 2003. — 424 с.

16. Блажевич Л. Ю. Формування продуктивності тритикале ярого залежно від елементів технології вирощування в Лісостепу України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. сільськогосподарських наук : спец. 06.01.09 "Рослинництво" / Л. Ю. Блажевич. — Київ, 2005. — 20 с.

17. Влияние предпосевной обработки бактериями семян пшеницы на качество зерна нового урожая / Л. П. Антонюк, Н. И. Старичкова, М. А. Ханадеева, Л. Н. Злобина // Вавиловские чтения — 2014 : Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 127-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова (г. Саратов, 25–27 ноября 2014 г.). — 2014. — С. 97–98

18. Возможные пути активизации ассоциативной азотфиксации в ризосфере пшеницы / Б. Ф. Садыков, Л. Б.Ильина, Л. А. Пропадущая, В. Ю. Горбунова // С.-х. биология. — 1988. — № 6. — С. 58–60.

19. Волкогон В. В. Влияние минерального азота на активность ассоциативной азотфиксации / Волкогон В. В. // Почвоведение. — 1997. — № 12. — С. 1486–1490.

20. Волкогон В. В. Мікробіологічні аспекти оптимізації азотного удобрення сільськогосподарських культур / В. В. Волкогон — К.: Аграрна наука, 2007. — 143 с.

21. Вплив біологізованої агротехнології вирощування тритикале озимого на елементи структури урожайності зерна / П. В. Писаренко, В. В. Москалець, Т. З. Москалець, В. І. Москалець // Вісник Полтавської державної аграрної академії. — 2013. — № 2. — С. 10–14.

22. Генетика развития растений / Лутова Л. А., Проворов Н. А., Тиходеев О. Н. и др. — СПб: Наука, 2000. — 539 с.

23. 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.

24. Городній М. М. Урожайність та якість зерна ярого тритикале залежно від удобрення / М. М. Городній, С. Д. Павлюк // Збірник наукових праць ННЦ "Інститут землеробства УААН". — 2006. — № 3–4. — С. 32–36.

25. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений. — К.: Наукова думка, 1973. — 591 с.

26. Давыдова М. А. Регуляция активности глутаминсинтетазы и глутаматдегидрогеназы при усвоении связанного и симбиотически фиксированного азота у люпина белого : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.12 "Физиология и биохимия растений" / Давыдова М. А. — Москва, 2005. — 28 с.

27. Даштоян Ю. В. Метамерные особенности развития мезофилла и содержание пигментов пластид листьев пшеницы : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.05 "Ботаника" / Даштоян Ю. В. — Саратов, 2009. — 18 с.

28. Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні у 2015 році. — Режим доступу : http://vet.gov.ua

29. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. — Москва: Агропромиздат, 1985. — 352 с.

30. Дремова М. С. Изменение хлорофилльных показателей в растениях яровой пшеницы при обработке посевов гербицидными препаратами / М. С. Дремова // Вестник Алтайского государственного университета — 2009 — № 6 (56). — С. 10–13.

31. Дубицький О. Зміни активності глутамінсинтетази листків в онтогенезі озимої пшениці залежно від умов живлення / О. Дубицький, Г. Габріель // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. — 2006. — Вип. 42. —– С. 128–132.

32. Евстигнеева З. Г. Определение активности глутаминсинтетазы / З. Г. Евстигнеева, Е. Г. Громыко, К. Б. Асеева // Биохимические методы. — М.: Наука, 1980. — С. 84–86.

33. Емцев В. Т. Об эффективности азотфиксирующего ассоциативного симбиоза у небобовых растений / В. Т. Емцев, М. И. Чумаков // Почвоведение. — 1990 — № 11. — С. 116–126.

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

35. Завалин А. А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А. А. Завалин. — М.: Изд. ВНИИА, 2005. — 302 с.

36. Иммунохимическая идентификаци азоспирилл и исследование их антигенных структур / Л. Ю. Матора, В. А. Богатырев, Л. А. Дыкман, С. Ю. Щеголев // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных

микроорганизмов с растениями / Под ред. В. В. Игнатова. — М.: Наука, 2005. — С. 209–221.

37. Казаков Е. Д. Биохимия зерна и хлебопродуктов / Е. Д. Казаков, Г. П. Карпиленко. — СПб: ГИОРД, 2005. — 512 с.

38. Калининская Т. А. Применение ацетиленового метода для количественного учёта разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений / Т. А. Калининская, Т. В. Редькина, Ю. М. Белов // Микробиология. — 1981. — Т. 50, №5. — С. 924–927.

39. Калининская Т.А. Микрофлора семян риса как источник азотфиксирующих микроорганизмов в его ризосфере / Т. А. Калининская, Т. В. Редькина // Изв. АН СССР. Сер. Биол. — 1981. — № 4. — С. 617–621.

40. Кершанская О. И. Концепция оптимального фотосинтетического типа растения пшеницы в оптимизации селекционного процесса / О. И. Кершанская // Вестник Башкирского университета. — 2001. — № 2 (1). — С. 39–41.

41. Клевенская И. Л. Экологические и агрономические аспекты несимбиотической фиксации азота / И. Л. Клевенская // Биологическая фиксация азота / В. К. Шумный, К. К. Сидорова, И. Я. Клевенская и др. — Новосибирск: Наука, 1991. — С. 186–263

42. Кожемяков А. П. Использование инокулянтов бобовых и биопрепаратов комплексного действия в сельском хозяйстве / А. П. Кожемяков, И. А. Тихонович // Доклады Россельхозакадемии. — 1998. — № 6. — С. 7–10.

43. Комок М. С. Фізіологічно активні речовини як фактор активізації азотфіксувальних симбіозів та азотного обміну сої / М. С. Комок // Сільськогосподарська мікробіологія. — 2011. — Вип. 14. — С. 49–63.

44. Копилов Є. П. Вплив *Chaetomium cohlioides* Palliser на функціонування азотфіксувального мікробного угруповання кореневої зони пшениці ярої / Є. П. Копилов // Агроекологічний журнал. — 2008. — № 1. — С. 80–83.

45. Копилов Є. П. Селекція ефективних штамів діазотрофів для інокуляції ярої пшениці / Є. П. Копилов // Мікробіологія і біотехнологія. — 2007. — № 1. — С. 67–74.

46. Костромітін В. М. Вплив попередників і фонів мінерального живлення на врожай зерна ярого тритикале [Електронний ресурс] / В. М. Костромітін, І. М. Музафаров, А. О. Рожков // Наукові праці ЧДУ ім. Петра Могили. — 2008. — Вип. 69, Т. 82. — Режим доступу : hppt://bibl.kma.mk.ua/pdf/naukpraci/ecology/2008/82-69-14.pdf.

47. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М. : Высшая школа, 1990. — 350 с.

48. Лопушняк В. Формування структури врожаю тритікале ярого за різних систем удобрення / В. Лопушняк, М. Августинович // Вісник Львівського національного аграрного університету. Серія : Агрономія. — 2013. — № 17(1). — С. 211–217.

49. Максимов М. Г. Тритикале як кормова культура та його вітчизняні сорти / М. Г. Максимов // Агроном. — 2006. — № 3. — С. 30–34.

50. Мальцева Н. Н. Азотфиксирующие ассоциации азоспирилл и некоторых видов злаковых культур / Н. Н. Мальцева, В. В. Волкогон, Е. В. Надкерничная // Мікробіологічний журнал. — 1995. — Т. 57, № 1. — С. 24–31.

51. Методи біологічних та агрохімічних досліджень рослин та ґрунтів / З. М. Грицаєнко, А. О. Грицаєнко, В. П. Карпенко. —— К.: ЗАТ Нічлава, 2003. — 320 с.

52. Методичні рекомендації по визначенню активності азотфіксації в грунті та кореневій зоні рослин ацетиленовим методом / В. В. Волкогон. — Чернігів: ЦНТІ, 1997. — 12 с.

53. Методы общей бактериологии / Ф. Герхардт, Р. Г. И. Мюррей, Р. Н. Костилоу и др.: Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — Т. 3. — 264 с.

54. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учебное пособие / [И. В. Асеева, И. П. Бабьева, Б. А. Бызов и др.] ; под ред. Д. Г. Звягинцева. — М. : Изд-во МГУ, 1991. — 304 с.

55. Мікробні препарати в землеробстві. Теорія і практика: Монографія / [В. В. Волкогон, О. В. Надкернична, Т. М. Ковалевська та ін.]; за ред. В. В. Волкогона — К. : Аграрна наука, 2006 — 312 с.

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

57. Мікроорганізми і альтернативне землеробство / [Патика В. П., Тихонович І. А., Філіп'єв І. Д. та ін.] /За ред. В. П. Патики. — К.: Урожай, 1993. — 176 с.

58. Мусієнко М. М. Фізіологія рослин. / М. М. Мусієнко — Київ : Либідь, 2005. — 808 с.

59. Надкернична О. В. Використання азотфіксуючих бактерій *Azospirillum brasilense* для поліпшення якості зерна озимого жита / О. В. Надкернична // Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН. — 2000. — № 8. — С. 18–20.

60. Надкернична О. В. Генетичний поліморфізм озимого жита за здатністю до асоціативної азотфіксації / О. В. Надкернична // Агроекологічний журнал. — 2003. — № 4. — С. 62–65.

61. Надкернична О. В. Мікробний препарат Діазобактерин для підвищення урожаю і поліпшення якості зерна озимого жита / О. В. Надкернична // Посібник українського хлібороба. — 2011. — С. 134.

62. 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.

63. Надкернична О. В. Функціонування асоціативної системи діазотрофи-озиме жито залежно від сортових особливостей рослин /

О. В. Надкернична // Сільськогосподарська мікробіологія. — 2007. — № 6. — С. 7–18.

64. 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.

65. 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.

66. Некоторые новые методы количественного учёта почвенных микроорганизмов и изучение их свойств. Методические рекомендации. / Под ред. Ю. М. Возняковской. — Ленинград, 1982. — 52 с.

67. Особенности диссоциации в культурах *Azospirillum brasilense* Sp7 / В. Ю. Матвеев, Л. П. Петрова, Е. А. Журавлева, В. И. Панасенко // Молекуляр. генетика. — 1987. — №8. — С. 16–18.

68. Павлов А. Н. Повышение содержание белка в зерне / А. Н. Павлов. — М. : Наука, 1984. — 119 с.

69. Пат. № 104212 С2 Україна МПК C12N 1/20 (2006.01) C12R (2006.01) C05F11/08 (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. — № a 2012 03817; заявл. 29.03.2012; опубл. 10.01.2014, Бюл. № 1.

70. Пат. № 105118 Україна МПК C12N 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.

71. Пат. № 63718 Україна МПК (2011.01)C01B 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. — № u 2010 13996; заявл. 24.11.2010; опубл. 25.10.2011, Бюл. № 20.

72. Патика В. П. Вплив *Azospirillum brasilense* 10/1 на асоціативну азотфіксацію і внутрішньосортовий поліморфізм тритикале ярого / В. П. Патика, О. В. Надкернична, О. О. Шаховніна // Мікробіологічний журнал. — 2015. — Т. 77, № 5. — С. 29–36.

73. Патыка В. Ф. Агроэкологическая роль азотфиксирующих микроорганизмов / В. Ф. Патыка — Киев, 2004. — 320 с.

74. Применение минеральных удобрений и бактериальных препаратов под полевые культуры на чернозёмах Ростовской области / С. А. Гужвин, Н. Ф. Климашевская, Н. П. Каменский, В. В. Клыков // Научный журнал КубГАУ. — 2012. — № 82 (08). — С. 1–10.

75. Проворов Н. А. Эволюция генетических систем симбиоза у клубеньковых бактерій / Н. А. Проворов // Генетика. — 1996. — Т.32, №8. — С. 1029–1040.

76. Пузік В. К., Кореневі виділення хлібних злаків залежно від температури / В. К. Пузік, В. А. Єльнікова, С. О. Білецька // Агроекологічний журнал. — 2003. — №1. — С. 15–20.

77. 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.

78. Родынюк И. С. Влияние генотипа пшеницы на формирование

эффективности ассоциаций с азотфиксирующими микроорганизмами / И. С. Родынюк // Бюл. ВНИИСХМ. — 1985. — №42. — С. 54–56.

79. Родынюк И. С. Генетические и экологические факторы ассоциативной азотфиксации // Биологическая фиксация азота / В. С. Шумный, К. К. Сидорова, И. Л. Клевенская и др. — Новосибирск : Наука. Сиб. отд-ние, 1991. — С. 142–163.

80. Рябчун В. К. Каталог сортів ярих тритикале та технології їх вирощування. Методичне видання ІР ім. В. Я. Юр'єва / В. К. Рябчун. — Харків, 2006. — 32 с.

81. Садыков Б. Ф. Ассоциативная фиксация молекулярного азота в ризосфере различных сортов пшеницы / Б. Ф. Садыков, Л. Б. Ильина // Микробиология. — 1987. — 56, № 6. — С. 1038–1039.

82. Самойлов А. М. Динаміка чисельності діазотрофів у кореневій зоні ізогенних за генами Vrn ліній пшениці / А. М. Самойлов, В. В. Жмурко // Мікробіол. журн. — 2012. — Т. 74 — № 5. — С. 92–98.

83. Самойлов А. М. Ефекти кореневих виділень проростків ізогенних за генами *Vrn* ліній пшениці на динаміку росту, трофічний хемотаксис та синтез індолил-3-оцтової кислоти у специфічного діазотрофа *Azospirillum brasilense* 410 / А. М. Самойлов, В. В. Жмурко // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. — 2014 — № 1129. — Вип. 23 — С. 73–80.

84. Свойства полисахаридных комплексов, продуцируемых *Azospirillum brasilense*, и получаемых из них полисахаридов / С. А. Коннова, И. М. Скворцов, О. Е. Макаров, В. В. Игнатов // Микробиология. — 1994. — Т. 63, № 6 — С. 1020–1030.

85. Сечняк Л. К. Тритикале / Л. К. Сечняк, Ю. Г. Сулима. — М. : Колос, 1984. — 320 с.

86. Симочко Л. Ю. Біоценотична діяльність домінуючих бактерій ризосфери озимої пшениці : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.16 "Екологія" / Симочко Л. Ю. — Київ, 2003. — 19 с.

87. Скорик В. В. Вивчення генетичної детермінації ознаки азот фіксуючої активності в кореневій зоні озимого жита / В. В. Скорик, О. В. Надкернична, В. П. Сальник // Цитология и генетика. — 1994. — Т. 28, № 6. — С. 61–65.

88. Смирнов В. В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В. В. Смирнов, Е. А. Киприанова. — Киев: Наукова думка, 1990. — 264 с.

89. Степаненко И. Л. Азотфиксирующий потенциал ризоценозов мутантных форм ячменя / И. Л. Степаненко, И. С. Родынюк, В. К. Шумный // Изв. Сиб. отд. АН СССР. — 1989. — №1. — С.6–11.

90. Танцова О. И., Черемисов Б. М. Межсортовая и внутрисортовая изменчивость активности азотфиксации у ярового ячменя / О. И. Танцова, Б. М. Черемисов // Доклады РАСН. — 1993. — № 6. — С. 6.

91. Танцова О. И., Черемисов Б. М. Оценка коллекций ячменя и тритикале по активности азотфиксации / О. И. Танцова, Б. М. Черемисов // Докл. ВАСХНИЛ. — 1992. — №1. — С. 9–12.

92. Тараріко Ю. О. Енергетична оцінка систем землеробства і технології вирощування сільськогосподарських культур : методичні рекомендації / Ю. О. Тараріко, О. Ю. Несмашна, Л. Д. Глущенко. — К. : Нора-прінт, 2001 — 60 с.

93. Технохімічний контроль продукції рослинництва : навч. посіб. / [Н. Т. Савчук, Г. І. Подпрятов, Л. Ф. Скалецька та ін.]. — К. : Арістей, 2005. — 256 с.

94. Тритикале – ценная зернофуражная культура / С. И. Гриб, Т. М. Булавина, В. Н. Буштевич, Ю. Ф. Хатетовский // Вестник семеноводства в СНГ. — 2002. — № 1. — С. 17–19.

95. Умаров М. М. Азотфиксация в ассоциациях организмов / М. М. Умаров // Проблемы агрохимии и экологии. — 2009. — № 2. — С. 22–26.

96. Умаров М. М. Ассоциативная азотфиксация / М. М. Умаров — М. : Изд-во МГУ, 1986. — 136 с.

97. Фенотипическая вариабельность у *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и Sp245: сопряженность с состоянием покоя и свойства диссоциантов / А. Ю. Погорелова, А. Л. Мулюкин, Л. П. Антонюк и др. // Микробиология. — 2009. — Т. 78, № 4. — С. 618–628.

98. Характеристика и интродукция новых штаммов ассоциативных ростстимулирующих бактерий, доминирующих в ризоплане проростков ячменя / [А. А. Белимов, А. Ю. Иванчиков, Л. Ю. Юдкин и др.]. // Микробиология. — 1999. — С. 392–397.

99. Ціноутворення та нормативні витрати в сільському господарстві: теорія, методологія, практика : Т. 1. Теорія ціноутворення та технологічні карти вирощування с.льськогосподарських культур / за ред. П. Т. Саблука, Ю. Ф. Мельника, М. В. Зубця, В. Я. Месель-Веселяка. — К., 2008. — 698 с.

100. Ціноутворення та нормативні витрати в сільському господарстві: теорія, методологія, практика : Т. 2. Нормативна собівартість і ціни на сільськогосподарську продукцію / за ред. П. Т. Саблука, Ю. Ф. Мельника, М. В. Зубця, В. Я. Месель-Веселяка. – К., 2008. – 650 с.

101. Черемисов Б. М. Усиление азотфиксации – новое направление в селекции пшеницы и других небобовых полевых культур / Б. М. Черемисов // С.-х. биология. — 1988. — № 6. — С. 43–49.

102. Чумаков М. И. Роль генотипа пшеницы в формировании азотфиксирующей ассоциации бактерий в прикорневой зоне / М. И. Чумаков // Изв. ТСХА. — 1988. — № 4. — С. 60–65.

103. Чучвага І. Г. Використання критеріїв екологічноЇ доцільності для оцінки мінерального удобрення сільськогосподарських культур / Чучвага І. Г., Волкогон В. В. // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві : матеріали X наукової конференції молодих вчених (м. Чернігів, 22-24 жовтня 2014 р.). — 2014. — С. 48–53.

104. Чучвага І. Г. Процеси біологічної трансформації азоту за дії біотичних та абіотичних факторів / .І. Г. Чучвага, К. І. Волкогон // Наукові

Записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія. — 2014. — № 3. — С. 175–179.

105. 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.

106. 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.

107. 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.

108. Шаховніна О. О. 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.

109. Шаховніна О. О. Міжсортова 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.

110. Шаховніна О. О. Міжсортова 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.

111. 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.

112. 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.

113. Шелудько А. В. Генетико-физиологические аспекты социального поведения ассоциативных бактерий *Azospirillum brasilense*: автореф. дис. на соискание уч. степени доктора биол. наук: спец. 03.02.03 "Микробиология" / А. В. Шелудько. — Саратов, 2010. — 47 с.

114. Шерстобоєва О. В. Реакція мікробного угруповання кореневої зони озимої пшениці на інтродукцію діазотрофів / О. В. Шерстобоєва // Агроекологічний журнал — 2003. — № 3 — С. 42–46.

115. Шиятый Е. И. Качество зерна яровых культур и адаптация агротехнологий к почвенно-климатическим условиям / Е. И. Шиятый, Л. А. Пуалаккайнан // С.-х. биол. — 2008. — № 1 — С. 3–15.

116. Шотт П. Р. Биологическая фиксация азота в однолетних агроценозах лесостепной зоны Западной Сибири : автореф. дис. на соискание уч. степени доктора сельскохозяйственных наук : 06.01.04 "Агрохимия" / П. Р. Шотт. — Барнаул, 2007. — 39 с.

117. Шумный В. К. Полиморфизм по асоциативной азотфиксации у ячменя / В. К. Шумный, И. Л. Степаненко // Биологическая фиксация азота / В. К. Шумный, К. К. Сидорова, И. Я. Клевенская и др. — Новосибирск: Наука, 1991. — С. 163–185.

118. Эффективность предпосевной обработки семян озимой ржи азотфиксирующими бактериями / Е. В. Надкерничная, М. А. Ушакова,

А. А. Майстер, Н. К. Волынчук // Вісник аграрної науки. — 1994. — № 8. — С. 93–98.

119. Яблонская Е. К. Влияние гербицида 2,4-д и антидота фуролан на ростовые и синтетические процессы в проростках озимой пшеницы / Е. К. Яблонская, В. К. Плотников // Научный журнал КубГАУ — 2006. — № 08 (24). — С. 1–7.

120. Яре тритикале для стабільного виробництва зерна / В. К. Рябчун, В. І. Шатохін, В. А. Лісничий, Т. Б. Капустіна. — Харків: Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, 2007. — 16 с.

121. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat / S. Katupitiya, J. Millet, M. Vesk // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — Vol. 61, № 5. — P. 1987–1995.

122. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of nonleguminous crops / [S. P. Saikia, D. Bora, A. Goswami , et al.] // African J. Microbiol. Res. — 2012. — Vol. 6. — P. 1085–1102.

123. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisns / A. E. Richardson, J. M. Barea, A. M. McNeill, C. Prigent-Cobaret // Plant Soil. — 2009. — Vol. 321, № 1–2. — P. 305–339.

124. Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense:* a note / Y. Okon, L. Cakmakci, I. Nur, I. Chet // Microb. Ecol. — 1980. —Vol. 6, № 3. — P. 277–280.

125. Alexandre G. Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors / G. Alexandre // Microbiology. — 2010. — Vol. 156, № 8. — P. 2283–2293.

126. Analysis of DNA, lipopolysaccharide structure, and some cultural and morphological properties in closely related strains of *Azospirillum brasilense* / [L. P. Petrova, L. Y. Matora, G. L. Burygin, et al.] // Microbiology. 2005. — Vol. 74. — P. 188–193.

127. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil / [S.-Y. Lin, Y.-C. Liu, A. Hameed, et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2016. — Vol. 66. — P. 1453–1458.

128. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enchancement of ABA levels / [A. C. Cohen, R. Bottini, M. Pontin, et al.] // Physiol Plant. — 2015. — Vol. 153. — P. 79–90.

129. *Azospirillum brasilense* AZ39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (Glycine max L.) / [F. Cassan, D. Perrig, V. Stroy, et al.] // Eur. J. Soil Biol. — 2009. — Vol. 45. — P. 28–35.

130. *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium / P. Mora, F. Rosconi, L. F. Fraguas, S. Castro-Sowinski // Arch. Microbiol. — 2008. — Vol. 189. — P. 519–524.

131. *Azospirillum lipoferum* strain Azm5 containing 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedling under nitrogen deficiency / [R. Esquivel-Cole, R. M. Ramirez-Gama, G. Tsuzuki-Reyes, et al.] // Plant Soil. — 2010. — Vol. 337, № 1–2. — P. 65–75.

132. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil / [S.-Y. Lin, A. Hameed, Y.-C. Liu, et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2015. — № 65. — P. 1453–1458.

133. *Azospirillum* spp. metabolize [17, 17-2H2] gibberelin A20 to [17, 17-2H2] gibberelin A1 in vivo in dry rice mutant seedlings / F. D. Cassan, C. D. Lucangeli, R. Bottini, P. Piccoli // Plant Cell Physiol. — 2001. — Vol. 42, № 7. — P. 763–767.

134. Baldani V. L. D. Effects of *Azospirillum* inoculated on root infection and nitrogen incorporation in wheat / V. L. D. Baldani, J. I. Baldani, J. Dobereiner // Canad. J. Microbiol. — 1983. — Vol. 29, №8. — P.924–929.

135. Bashan Y. *Azospirillum*–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) / Yoav Bashan, Gina Holguin, Luz E. de-Bashan // Canadian Journal of Microbiology. — 2004. — Vol. 50, № 8. — P. 521–577.

136. Bashan Y. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment / Y. Bashan, L. E. De-Bashan // Adv. Agron. — 2010. — Vol. 108. — P. 77–136.

137. Beijerinck M. W. Uber ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann? / M. W. Beijerinck // Centralbl. Bakt. Parasiten. — 1925. — Abt. II, Bd. 63. — P. 353–357.

138. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture / G. Berg // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — Vol. 84, № 1. — P. 11–18.

139. Bly A. G. Foliar nitrogen application timing influence on grain yield and protein concentration of hard red winter and spring wheat / A. G. Bly, H. J. Woodard // Agronomy J. — 2003. — Vol. 95. — P. 335–338.

140. Bottini R. Gibberelin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase / R. Bottini, F. Cassan, P. Piccoli // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — Vol. 65, № 5. — P. 497–503.

141. Bouton J. H. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation / J. H. Bouton, S. L. Albrecht, D. A. Zuberer // Field Crops Research. — 1985. — Vol. 11, №2–3. — P. 131–140.

142. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation / [F. Cassan, S. Maiale, O. Masciarelli, et al.] // Eur. J. Soil. Biol. — 2009. — № 45. — P. 12–19.

143. Caseras S. A. R. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. / S. A. R. Caseras // Appl. Environ. Microbiol. — 1982. — V. 44., №4. — P. 990–991.

144. Cassan F. Physiological and agronomical aspects of phytogormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to

the genus *Azospirillum* / F. Cassan, J. Vanderleyden, S. Spaepen // J. Plant Growth Regul. — 2014. — Vol. 33, № 2. — P. 440–459.

145. Changes in motility of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* in the presence of plant lectins / [A. V. Shelud'ko, K. V. Burygin, Y. A. Filip'echeva, et al.] // Microbiol. Res. — 2009. — Vol. 164 — P. 149–156.

146. Characterization of chsA, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7 / [R. Carreno-Lopez, R. Sanchez, N. Camargo, et al.] // Arch. Microbiol. — 2009. — Vol. 191, № 6. — P. 501–507.

147. Characterization of the lipopolysaccharides of serogroup II *Azospirillum* strains / [E. N. Sigida, Y. P. Fedonenko, E. L. Zdorovenko, et al.] // Microbiology. — 2014. — Vol. 83, № 4. — P. 326–334.

148. Chemical and serological studies of lipopolysaccharides of bacteria of the genus *Azospirillum* / [O. N. Konnova, A. S. Boyko, G. L. Burygin, et al.] // Microbiology. — 2008. — Vol. 77, № 3. — P. 305–312.

149. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of laf1, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7 / [S. Moens, K. Michiels, V. Keijers, et al.] // J. Bacteriol. — 1995. — Vol. 177, № 19. — P. 5419–5426.

150. Cohen A. C. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produses ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants / A. C. Cohen, R. Bottini, P. N. Piccoli // Plant Growth Regul. — 2008. — Vol. 54 № 2. — P. 97–103.

151. Comparative assessment of inductive effects of *Azospirillum* lectins with different antigenic properties on the signal systems of wheat seedlings roots / [S. A. Alen'kina, L. P. Petrova, M. K. Sokolova, et al.] // Microbiology. — 2014. — Vol. 83, № 3. — P. 262–269.

152. Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum–Pseudomonas–Glomus* consortia for promotion of maise growth / [O. Couillerot,

A. Ramirez-Trujillo, V. Walker, et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97. — P. 4639–4649.

153. Costacurta A. Syntesys of phytohormones by plant-associated bacteria // A. Costacurta, J. Vanderleyden // Crit. Revs. Microbiol. — 1995. — Vol. 21, № 1. — P 1–18.

154. Day J. M. Physiological aspects of N_2-fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots / J. M. Day, J. Dobereiner. — 1976. — Vol. 8, № 1. — P. 45–50.

155. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov / [S. Y. Lin, A. Hameed, F. T. Shen , et al.] // Antonie Van Leeuwen-hoek. — 2014. — Vol. 105. — P. 1149–1162.

156. Dobereiner J. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants / J. Dobereiner, F. O. Pedrosa / Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer-Verlag, 1987. — P. 155.

157. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells / [N. V. Evseeva, L. Y. Matora, G. L. Burygin, et al.] // Plant Soil. — 2011. — Vol. 346. — P. 181–188.

158. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat / R. M. Boddey, V. L. D. Baldani, J. I. Baldani, J. Dobereiner // Plant and Soil. — 1986. — Vol. 95, № 1. — P. 109–121.

159. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants / S. Spaepen, S. Dobbelaere, A. Croonenborghs, J. Vanderleyden // Plant Soil. — 2008. — Vol. 312. — P. 1–23.

160. Elmerich C. Historical perspective: From bacterization to endophytes. // Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cianobacterial Associations / C. Elmerich, W. E. Newton, eds. — Dordrecht: Springer, 2007. — P. 1-20.

161. Fenglerova W. Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples / W. Fenglerova // Acta microbiol. Pol. — 1965. — Vol. 14, № 2. — P. 203–206.

162. Fibach-Paldi S. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Apospirillum brasilense* / S. Fibach-Paldi, S. Burdman, Y. Okon // FEEMS Microbiol. Lett. — 2012. — Vol. 326. — P. 99–108.

163. Fulchieri M. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberelin status of corn seedling roots / M. Fulchieri, C. Lucangeli, R. Bottini // Plant Cell Physiol. — 1993. — Vol. 34. — P. 1305–1309.

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

165. Genetic diversity in plant / J. Dobereiner, A. Muhammed, R. Askel, von R. C. Borstel. — N.Y.: Plenum Press. — 1977. — P. 325–341.

166. Genome structure of the genus *Azospirillum* / C. C. Martin-Didonet, L. S. Chubatsu, E. M. Souza // J. Bacteriol. — 2000. — Vol. 182, № 14. — P. 4113–4116.

167. Genus II. *Azospirillum* / J. I. Baldani, N. R. Krieg, V. L. D. Baldani, et al. // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. — Vol. 2, eds. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. — Springer-Verlag, New York, 2005. — P. 7–26.

168. Gupta K. Plant polyamines in abiotic stress responses / K. Gupta, A. Dey, B. Gupta // Acta Physiol. Plant. — 2013. — Vol. 35, №7. — P. 2015–2036.

169. Hardy R. W. F. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation / R. W. F. Hardy // Soil Biol. Biochem. — 1973. — Vol. 5, № 1. — P. 41–83.

170. Hartman A. Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. / A. Hartman, H. Fu, R. H. Burris // Appl. Envinron. Microbiol. — 1988. — Vol. 54, № 1. — P. 87–93.

171. Heinrih D. Attractation of *Azospirillum lipoferum* by media from wheat – *Azospirillum* association / D. Heinrih, D. Hess // Experientia Supplementum. — 1983. — Vol. 48. — P. 95–99.

172. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum* / [V. Walker, C. Bertrand, F. Bellvert, et al.] // New Phytol. — 2011. — Vol. 189, № 2. — P. 494–506.

173. Hubbel D. H. Associative N_2 fixation with *Azospirillum* / D. H. Hubbel, M. H. Caskins // Bacterial nitrogen fixation — New York, London: Plenum Press. — 1984. — P. 201–224.

174. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Apospirillum brasilense* Sp7 / [A. Y. Belyakov, G. L. Burygin, N. P. Arbatsky, et al.] // Carbonhyd. Res. — 2012. — № 361. — P. 127–132.

175. Iizuka H. An attempt at grouping of genus *Pseudomonas* / H. Iizuka, K. Komogata // J. Gen. Microbiol. — 1963. — Vol. 9, № 1. — P. 73–83.

176. Ilyas N. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhisosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions / N. Ilyas, A. Bano // Biol. Fert. Soils. — 2010. —Vol. 46, №4. — P. 393–406.

177. Immunochemical characterization of the capsular polysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 / [Y. P. Fedonenko, G. L. Burygin, I. A. Popova et al.] // Curr. Microbiol. — 2013. — Vol. 67, № 2. — P. 234–239.

178. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy / [B. Assmus, P. Hutzler, G. Kirchhof et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — Vol. 61. — P. 1013– 1019.

179. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions / [D. Duca, J. Lorv, C. L. Patten, et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. — 2014. — Vol. 106. — P. 85–125.

180. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides

produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in Azospirillum – wheat root interaction / S. A. Konnova, O. E. Makarov, I. M. Skvortsov, V. V. Ignatov // FEMS Microbiol. Lett. — 1994. — Vol. 118. — P. 93–99.

181. Iyama S. Diallel analysis of nitrogen fixation in the rhizosphere of rice / S. Iyama, Y. Sano, T. Fujii // Plant Sci. Lett. — 1983. — Vol. 30, №2. — P.129–135.

182. James E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbioses / E. K. James // Field Crops Res. — 2000. — Vol. 65. — P. 197–209.

183. Lee K. K. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by lines composing "Park" Kentucky bluegrass / K. K. Lee, R. Sherman, P. V. Klukas // Can. J. Microbiol. — 1986. — Vol. 32, №4. — P. 348–352.

184. Living on a surface: swarming and biofilm formation / [N. Verstraeten, K. Braeken, B. Debcumari, et al.] // Trends Microbiol. — 2008. — Vol. 16, № 10. — P. 496–506.

185. Lucangeli C. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberelin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole / C. Lucangeli, R. Bottini // Symbiosis — 1997. — Vol. 23. — P. 63–72.

186. M. Bacilio Alleviation of noxious effects of cattle ranch composts on wheat seed germination by inoculation with *Azospirillum* spp. / M. Bacilio, P. Vazgues, Y. Bashan // Biol. Fertil. Soils. — 2003. — Vol. 38. — P. 261–266.

187. Malhotra M. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosinthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth / M. Malhotra, S. Srivastava // Eur. J. Soil Biol. — 2009. — Vol. 45, № 1. — P. 73–80.

188. Manga V. K. Gene action for nitrogenase activity in the roots of pearl millet / V. K. Manga, B. Vankateswarlu, M. B. L. Saxena // Indian J. Agricult. Sci. — 1985. — Vol. 55, № 6. — P. 391–392.

189. Manivannan M. Prevalence of *Azospirillum* isolates in tomato rhizosphere soils of coastal areas of Cuddalore District, Tamil Nadu /

M. Manivannan, P. Tholkappian // Int. J. Recent. Sci. Res. — 2013. — Vol. 4. — P. 1610–1613.

190. Merino S. Gram-negative flagella glycosylation // S. Merino, J. M. Tomas / Int. J. Mol. Sci. — 2014. — Vol. 15. — P. 2840–2857.

191. Michiels K. Two different modes of attachment of *Apospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots / K. Michiels, C. Croes, J. Vanderleyden // J. Gen. Microbiol. — 1991. — Vol. 37. — P. 2241–2246.

192. Moens S. Functions of Bacterial Flagella / S. Moens, J. Vanderleyden // Crit. Rev. Microbiol. — 1996. — Vol. 22, № 2. — P. 67–100.

193. Nitric oxide and plant growth promoting rhizobacteria: common features influencing root growth and development / [C. Molina-Favero, C. M. Creus, M. L. Lantery et al.] // Adv. Bot. Res. — 2007. — Vol. 46. — P. 1–33.

194. Nitrogen-fixing (acetylene reduction) activity and population of aerobic-heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland rice / I. Watanabe, W. L. Baraquio, M. R. De Guaman, D. A. Bactera // Appl. Environ. Microbiol. — 1979. — Vol. 37, № 5. — P. 813–819.

195. Nosko P. The association of freeliving nitrogen-fixing bacteria with the roots of High Arctic graminoids. / P. Nosko, L. C. Bliss, F. D. Cook // Arct. Alp. Res. — 1994. — Vol. 26. — C. 180–186.

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

197. Okon Y. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields / Y. Okon, R. Itzigsohn // Biotechnol Adv. — 1995. — Vol. 13, № 3. — P. 415–424.

198. Participation of abscisic acid and gibberelins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize / A. C. Cohen, C. N. Travaglia, R. Bottini, P. N. Piccoli // Botany. — 2009. — Vol. 87. — P. 455–462.

199. Pereg L. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants / L. Pereg, L. E. de-Bashan, Y. Bashan // Plant Soil. — 2016. — Vol. 399. — P. 389–414.

200. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation / [A. Lerner, A. Valverde, S. Castro-Sowinski, et al.] // Environ. Microbiol. Rep. — 2010. — Vol. 2, № 4. — P. 577–586.

201. Piccoli P. Gibberelin production in *Azospirillum lipoferum* cultures is enchanced by light / P. Piccoli, R. Bottini // Biocell. — 1996. — Vol. 20, № 3. — P. 185–190.

202. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning / [J. Vacheron, G. Desbrosses, M. L. Bouffaud, et al.] // Front. Plant Sci. — 2013. — № 4. — P. 356.

203. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oriza sativa* assotiation / [A. Chamam, H. Sanguin, F. Bellvert, et al.] // Phytochem. — 2013. — № 87. — P. 65–77.

204. Pour some sugar on it: the explanding world of bacterial protein O-linked glycosylation / J. A. Iwashkiw, N. F. Vozza, R. L. Kinsella, M. F. Feldman // Mol. Microbiol. — 2013. — Vol. 89. — P. 14–28.

205. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // Journal of Biological Chemistry. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.

206. Relationships among agronomic traits and grain composition in oat genotypes grown in different environments / D. M. Peterson, D. M. Wesenberg, D. E. Burrup, C. A. Erickson // Crop Sci. — 2005. — Vol. 45 — P. 1249–1255.

207. Rennie R. J. Dinitrogen fixation associated with disomic chromosome substitution lines of spring wheat / R. J. Rennie, R. I. Larson // Can. J. Bot. — 1979. — Vol. 57, №24. — P. 2771–2775.

208. Rennie R. J. N_2-fixation in cereals / R. J. Rennie // Can. Agriculture. — 1983. — Vol. 29, №3–4. — P. 4–9.

209. Rennie R. J. Potential use of induced mutation to improve symbioses

of crop plants with N_2-fixing bacteria / R. J. Rennie // Induced mutation – a tool in plant breeding. — Vienna: IAEA. — 1981. — P. 293–321.

210. Responses of agronomically importanr crops to inoculation with *Azospirillum* / [S. Dobbelaere, A. Croonenborghs, A. Thys, et al.] // Aust. J. Plant Physiol. — 2001. — Vol. 28. — P. 871–879.

211. Rhizobacterial mediation of plant gormone status / I. C. Dodd, N. Y. Zinovkina, V. I. Safronova, A. A. Belimov // Ann. Appl. Biol. — 2010. — Vol. 157, № 3. — P. 361–379.

212. Rodrigues-Navarro D. N. Attachment of bacteria to the roots of higher plants / D. N. Rodrigues-Navarro, M. S. Dardanelly, J. E. Ruiz-Sainz // FEMS Microbiol. Lett. — 2007. — Vol. 272, № (2). — P. 127–136.

213. Sadasvian L. Cyst production and brown pigment for-mation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 / L. Sadasvian, C. A. Neyra // J. Bacteriol. — 1987. — Vol. 169. — 1670–1677.

214. Schloter M. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain specific monoclonal antibodies / M. Schloter, A. Hartmann // Symbyosis. — 1998. — Vol. 25. — P. 159–179.

215. Serological relationships of azospirilla revealed by their motilty patterns in the presence of antibodies to lipopolysaccharides / [A. V. Shelud’ko, G. L. Burygin, Y. A. Filip’echeva, et al.] // Microbiology. — 2014. — Vol. 83, № 1–2. — P. 102–109.

216. Signal effects of the lectin from the assotiative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial-plant root interactions / [S. A. Alen’kina, V. A. Bogatyrev, L. Y. Matora, et al.] // Plant Soil. — 2014. — № 381 (1–2). — P. 337–349.

217. Signals involved in nodulation and nitrogen fixation / [B. J. J. Lugtenberg, G. V. Bloemberg, A. A. N. Van Brussel, et al.] // Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Proc. of the 10th Inter. Congr. on Nitr. Fixation. St. Peterburg, May 28 — June 3, 1995. — Dordrecht/Boston/London :

Kluwer Acad. Publ. — 1995. — P. 37–48.

218. Skvortsov I. M. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from Azospirillum species : properties and the possible role in interaction with plant roots / I. M. Skvortsov, V. V. Ignatov // FEMS Microbiol. Lett. — 1998. — Vol. 165. — P. 223–229.

219. Spaepen S. Plant-growth promoting actions of rhizobacteria / S. Spaepen, J. Vanderleyden, Y. Okon // Adv. Bot. Res. — 2009. — Vol. 51. — P. 283–320.

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

221. Structural anaysis of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Azospirillum brasilense* Jm6B2 containing 3-O-methyl-D-ramnose (D-acofriose) / [A. S. Boyko, A. S. Dmitrenok, Y. P. Fedonenko, et al.] // Carbonhyd. Res. — 2012. — Vol. 355. — P. 92–95.

222. Structural pecularities of the O-specific polysaccharides of *Azospirillum* bacteria of serogroup III / [Y. P. Fedonenko, A. S. Boyko, E. L. Zdorovenko, et al.] // Biochemistry (Moscow). — 2011. — Vol. 76, № 7. — P. 797–802.

223. Structural studies of the O-specicific polysaccharide (s) from the lipopolysaccharide of *Apospirillum brasilense* type strain Sp7 / [E. N. Sigida, Y. P. Fedonenko, A. S. Shashkov, et al.] // Carbonhyd. Res. — 2013. — № 380. — P. 76–80.

224. Swedrzynska D. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of maize (Zea mays ssp. Saccharata L.) under different cultivation conditions / D. Swedrzynska, A. Sawicka // Polish J. Environm. Stud. — 2000. — Vol. 9, № 6. — P. 505–509.

225. Tarrand J. J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species,

Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. / J. J. Tarrand, N. R. Krieg, J. Dobereiner // Can. J. Microbiol. — 1978. — Vol. 24, № 8. — P. 967–980.

226. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial assotiations / P. S. Bogino, M. D. L. M. Oliva, F. G. Sorroche, W. Giordano // Int. J. Mol. Sci. — 2013. — Vol. 14, № 8. — P. 15838–15859.

227. The structures of lipopolysaccharides from plant-associated Gram-negative bacteria / A. Molinaro, M. A. Newman, R. Lanzetta, M. Parrilli / Eur. J. Org. Chem. — 2009. — Vol. 34. — P. 5887–5896.

228. The use of fragments of the 85- and 120-MDa plasmids of *Azospirillum brasilense* Sp245 to study the plasmid rearrangement in this bacterium and to search for homologous sequences in plasmids of *Azospirillum brasilense* Sp7 / E. I. Katsy, I. V. Borisov, L. P. Petrova, L. Y. Matora // Russ. J. Genet. — 2002. — Vol. 38. — P. 124–131.

229. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maise plants / J. Rodrigues-Salazar, R. Suarez, J. Caballero-Mellado, G. Itturiaga // FEMS Microbiol. Lett. — 2009. — Vol. 296 , №1. — P. 52–59.

230. Vande Broek A. Bacterial chemotacyic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* / A. Vande Broek, M. Lambrecht, J. Vanderleyden // Microbiology. — 1998. — Vol. 144. — P. 2599–2606.

231. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions / V. Walker, O. Couillerot, A. von Felten // Plant Soil. — 2012. — Vol. 356. — P. 151–163.

232. Venkateswarlu B. Interactions between the root exudates of pearl millet and *Azospirillum brasilense* / B. Venkateswarlu, A. Rao // Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.). — 1985. — Vol. 95, №4. — P. 237–245.

233. Which specificity in cooperation between phytostimulating

rhizobacteria and plants? / [B. Drogue, H. Dore, S. Borland, et al.] // Res. Microbiol. — 2012. — Vol. 163, № 8. — P. 500–510.

234. Winik B. C. Colonisation of strawberry (*Fragaria ananassa*) plant tissues by *Azospirillum brasilense* // B. C. Winik, M. F. G. Molina, R. O. Pedraza / Acta Microsc. — 2009. — Vol. 18. — P. 1–6.

235. Xie C. H. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa* / C. H. Xie, A. Yokota // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2005. — Vol. 55, № 4. — P. 1435–1438.

236. Yumaguchi S. Gibberelin metabolism and its regulation / S. Yumaguchi // Ann. Rew. Plant Biol. — 2008. — № 59. — P. 225–251.

ДОДАТКИ

Додаток А

Таблиця А.1

Кореляційна матриця зв'язків між потенційною нітрогеназною активністю у ризоплані та селекційними ознаками тритикале ярого, вмістом загального азоту та білка в зерні (2007 рік)

Показник	ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Висота рослини, см	Довжина колосу, см	Кількість зерен в колосі, шт.	Маса зерен з колосу, г	Маса 1000 зерен, г	Вміст загального азоту, %	Вміст білка, %
ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	1							
Висота рослини, см	-0,50	1						
Довжина колосу, см	0,17	0,44	1					
Кількість зерен в колосі, шт.	**0,79**	**-0,83**	-0,06	1				
Маса зерен з колосу, г	**0,82**	-0,69	0,13	**0,89**	1			
Маса 1000 зерен, г	0,09	0,45	0,47	-0,34	0,09	1		
Вміст загального азоту, %	0,37	-0,49	-0,23	0,66	0,66	-0,24	1	
Вміст білка, %	0,38	-0,49	-0,22	0,66	0,66	-0,24	**0,99**	1

Примітка: коефіцієнти кореляції, вірогідні при P<0,05, виділено жирним шрифтом

159

Таблиця А.2

Кореляційна матриця зв'язків між потенційною нітрогеназною активністю у ризоплані та селекційними ознаками тритикале ярого (2008 рік)

Показник	ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Висота рослини, см	Довжина колосу, см	Кількість зерен в колосі, шт.	Маса зерен з колосу, г	Маса 1000 зерен, г	Урожайність, т/га
ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	1						
Висота рослини, см	-0,06	1					
Довжина колосу, см	-0,39	0,27	1				
Кількість зерен в колосі, шт.	-0,39	-0,67	-0,38	1			
Маса зерен з колосу, г	-0,34	-0,48	-0,29	0,59	1		
Маса 1000 зерен, г	0,18	0,44	0,38	**-0,75**	0,06	1	
Урожайність, т/га	0,08	-0,25	0,18	0,04	0,65	0,57	1

Примітка: коефіцієнти кореляції, вірогідні при $P<0,05$, виділено жирним шрифтом

160

Таблиця А.3

Кореляційна матриця зв'язків між потенційною нітрогеназною активністю у ризоплані та селекційними ознаками тритикале ярого, вмістом загального азоту та білка в зерні (2009 рік)

Показник	ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Висота рослини, см	Довжина колосу, см	Кількість зерен в колосі, шт.	Маса зерен з колосу, г	Маса 1000 зерен, г	Вміст загального азоту, %	Вміст білка, %	Урожай-ність, т/га
ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	1								
Висота рослини, см	-0,04	1							
Довжина колосу, см	-0,12	0,54	1						
Кількість зерен в колосі, шт.	-0,38	**-0,81**	-0,48	1					
Маса зерен з колосу, г	**-0,73**	-0,54	-0,36	**0,79**	1				
Маса 1000 зерен, г	-0,21	**0,76**	0,25	**-0,72**	-0,19	1			
Вміст загального азоту, %	0,36	-0,39	-0,20	0,10	-0,34	-0,52	1		
Вміст білка, %	0,42	-0,40	-0,33	0,14	-0,33	-0,58	**0,97**	1	
Урожайність, т/га	-0,69	-0,42	-0,08	0,61	**0,86**	-0,02	-0,39	-0,51	1

Примітка: коефіцієнти кореляції, вірогідні при $P<0,05$, виділено жирним шрифтом

161

Таблиця А.4

Кореляційна матриця зв'язків між потенційною нітрогеназною активністю у ризоплані та селекційними ознаками тритикале ярого (2007-2009 рік)

Показник	ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Висота рослини, см	Довжина колосу, см	Кількість зерен в колосі, шт.	Маса зерен з колосу, г	Маса 1000 зерен, г
ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	1					
Висота рослини, см	-0,38	1				
Довжина колосу, см	0,31	-0,21	1			
Кількість зерен в колосі, шт.	-0,38	-0,28	**-0,48**	1		
Маса зерен з колосу, г	**-0,49**	0,27	**-0,77**	**0,72**	1	
Маса 1000 зерен, г	-0,35	**0,64**	**-0,62**	0,06	**0,73**	1

Примітка: коефіцієнти кореляції, вірогідні при P<0,05, виділено жирним шрифтом

162

Таблиця А.5

Кореляційна матриця зв'язків між потенційною нітрогеназною активністю у ризоплані та селекційними ознаками, вмістом загального азоту та білка в зерні тритикале ярого (2007 та 2009 роки)

Показник	ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	Висота рослини, см	Довжина колосу, см	Кількість зерен в колосі, шт.	Маса зерен з колосу, г	Маса 1000 зерен, г	Вміст загального азоту, %	Вміст білка, %
ПНА, нмоль етилену на 1 г коренів за год	1							
Висота рослини, см	-0,21	1						
Довжина колосу, см	-0,19	0,47	1					
Кількість зерен в колосі, шт.	-0,11	**-0,73**	-0,09	1				
Маса зерен з колосу, г	-0,09	**-0,56**	0,061	**0,85**	1			
Маса 1000 зерен, г	0,03	**0,58**	0,16	**-0,60**	-0,12	1		
Вміст загального азоту, %	-0,07	-0,27	0,15	**0,57**	0,54	-0,41	1	
Вміст білка, %	-0,11	-0,23	0,17	**0,57**	0,52	-0,48	**0,99**	1

Примітка: коефіцієнти кореляції, вірогідні при $P<0,05$, виділено жирним шрифтом

163

Додаток Б

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Директор ПП «Аграрна компанія 2004»
П.П. Лабазюк
“15” квітня 2015 р.

АКТ

про перевірку ефективності штаму *Azospirillum brasilense* 10/1 в посівах тритикале ярого сорту Оберіг харківський

У 2010-2012 роках на випробувально-демонстраційному полігоні ПП «Аграрана компанія 2004» була проведена виробнича перевірка ефективності використання нового штаму *Azospirillum brasilense*10/1 для підвищення урожайності тритикале ярого сорту Оберіг харківський.

Ґрунт дослідної ділянки – чорнозем опідзолений середньосуглинковий, слабозмитий, малогумусний на лесоподібному суглинку буровато-палевого забарвлення, ділянка належить до першої технологічної групи ґрунтів. Агрохімічні показники шару ґрунту 0-30 см: гумус за Тюріним – 3,2-3,6; pH (сольове) – 5,5-6,0; азот легкогідролізований – 12, рухомий фосфор – 23,0; обмінний калій – 11,0 мг на 100 г ґрунту.

Площа облікової ділянки 50 м^2. Повторність 4-кратна.

Вплив передпосівної бактеризації насіння тритикале ярого сорту Оберіг харківський на урожай наведено у таблиці.

Таблиця

Варіант	Урожай, ц/га			
	2010 р.	2011 р.	2012 р.	середнє
Без мікробних препаратів – контроль	36,7	37,9	41,1	38,6
Обробка насіння*Azospirillum brasilense* 10/1	39,8	41,3	43,9	41,7
НІР $_{05}$	1,1	0,9	0,8	-

Встановлено, що застосування штаму азотфіксувальних бактерій*Azospirillum brasilense* 10/1 в посівах тритикале ярого сорту Оберіг харківський на чорноземі опідзоленому середньосуглинковому сприяє підвищенню врожаю у середньому від 38,6 до 41,7 ц/га (на 3,1 ц/га або на 8,03 %).

Завідувач відділу насінництва
старший науковий співробітник – консультант з агрономії,
кандидат с.-г. наук М.М. Сучек

Додаток В

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Директор ПП «Аграрна компанія 2004»
П.П. Лабазюк
"15" квітня 2015 р.

АКТ
про перевірку ефективності штаму *Azospirillum brasilense* 10/1 в посівах тритикале ярого сорту Легінь харківський

У 2010-2012 роках на випробувально-демонстраційному полігоні ПП «Аграрана компанія 2004» була проведена виробнича перевірка ефективності використання нового штаму *Azospirillum brasilense*10/1 для підвищення урожайності тритикале ярого сорту Легінь харківський.

Ґрунт дослідної ділянки – чорнозем опідзолений середньосуглинковий, слабозмитий, малогумусний на лесоподібному суглинку буровато-палевого забарвлення, ділянка належить до першої технологічної групи ґрунтів. Агрохімічні показники шару ґрунту 0-30 см: гумус за Тюріним – 3,2-3,6; pH (сольове) – 5,5-6,0; азот легкогідролізований – 12, рухомий фосфор – 23,0; обмінний калій – 11,0 мг на 100 г ґрунту.

Площа облікової ділянки 50 м^2. Повторність 4-кратна.

Вплив передпосівної бактеризації насіння тритикале ярого сорту Легінь харківський на урожай наведено у таблиці.

Таблиця

Варіант	Урожай, ц/га			
	2010 р.	2011 р.	2012 р.	середнє
Без мікробних препаратів – контроль	38,4	39,2	44,2	40,6
Обробка насіння*Azospirillum brasilense* 10/1	41,7	42,9	46,8	43,8
НІР $_{05}$	0,8	0,9	1,0	-

Встановлено, що застосування штаму азотфіксувальних бактерій*Azospirillum brasilense* 10/1 в посівах тритикале ярого сорту Легінь харківський на чорноземі опідзоленому середньосуглинковому сприяє підвищенню врожаю у середньому від 40,6 до 43,8 ц/га (на 3,2 ц/га або на 7,88 %).

Завідувач відділу насінництва
старший науковий співробітник – консультант з агрономії,
кандидат с.-г. наук М.М. Сучек

Додаток Г

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Директор ПП «Аграрна компанія 2004»
П.П. Лабазюк
"15" квітня 2015 р.

АКТ
про перевірку ефективності штаму *Azospirillum brasilense* 10/1 в посівах тритикале ярого сорту Коровай харківський

У 2010-2012 роках на випробувально-демонстраційному полігоні ПП «Аграрана компанія 2004» була проведена виробнича перевірка ефективності використання нового штаму *Azospirillum brasilense*10/1 для підвищення урожайності тритикале ярого сорту Коровай харківський.

Ґрунт дослідної ділянки – чорнозем опідзолений середньосуглинковий, слабозмитий, малогумусний на лесоподібному суглинку буровато-палевого забарвлення, ділянка належить до першої технологічної групи ґрунтів. Агрохімічні показники шару ґрунту 0-30 см: гумус за Тюріним – 3,2-3,6; pH (сольове) – 5,5-6,0; азот легкогідролізований – 12, рухомий фосфор – 23,0; обмінний калій – 11,0 мг на 100 г ґрунту.

Площа облікової ділянки 50 м^2. Повторність 4-кратна.

Вплив передпосівної бактеризації насіння тритикале ярого сорту Коровай харківський на урожай наведено у таблиці.

Таблиця

Варіант	Урожай, ц/га
Без мікробних препаратів – контроль	38,4
Обробка насіння *Azospirillum brasilense* 10/1	41,7
НІР $_{05}$	1,2

Встановлено, що застосування штаму азотфіксувальних бактерій*Azospirillum brasilense* 10/1 в посівах тритикале ярого сорту Коровай харківський на чорноземі опідзоленому середньосуглинковому сприяє підвищенню врожаю від 38,4 до 41,7 ц/га (на 3,3 ц/га або на 8,59 %).

Завідувач відділу насінництва
старший науковий співробітник – консультант з агрономії,
кандидат с.-г. наук М.М. Сучек

Додаток Д

Таблиця Д.1

Моделювання витрат на виробництво зерна тритикале ярого без інокуляції (урожайність – 3,07 т/га) із розрахунку на 1 га

Статті витрат	У натуральних показниках або відсотках		У вартісних показниках, грн.	
	одиниці виміру	на 1га	вартість одиниці ресурсу	на 1га
Оплата праці з нарахуваннями	×	×	×	204,73
Насіння	кг	200,0	3,80	760,00
Засоби захисту	л	2,2	162,00	357,0
Пальне	л	52,8	16,82	888,60
Мастило	л	2,11	43,00	90,87
Електроенергія	кВат	0,91	1,50	1,37
Усього матеріальних витрат	×	×	×	**3282,03**
Відрахування на відновлення основних засобів	×	×	×	820,51
Плата за оренду землі	×	×	×	500,00
Усього витрат	×	×	×	**4602,54**
Загальновиробничі витрати	×	×	×	230,13
Загальногосподарські витрати	×	×	×	460,25
Виробничі витрати (собівартість) - усього	×	×	×	**5292,92**
Витрати на збут	×	×	×	264,65
Повна собівартість товарної продукції	×	×	×	**5557,56**
Повна собівартість основної продукції	×	×	×	**5001,81**

Таблиця Д.2

Моделювання витрат на виробництво зерна тритикале ярого за інокуляції *A. brasilense* 10/1 (урожайність – 3,57 т/га) із розрахунку на 1 га

Статті витрат	У натуральних показниках або відсотках		У вартісних показниках, грн.	
	одиниці виміру	на 1га	вартість одиниці ресурсу	на 1га
Оплата праці з нарахуваннями	×	×	×	222,48
Насіння	кг	200,0	3,80	760,00
Засоби захисту	л	2,2	162,00	357,0
Інокулянт на основі *A. brasilense* 10/1	л	0,2	185,00	37,00
Пальне	л	56,2	16,82	944,44
Мастило	л	2,25	43,00	96,58
Електроенергія	кВат	1,13	1,50	1,70
Усього матеріальних витрат	×	×	×	**3460,22**
Відрахування на відновлення основних засобів	×	×	×	865,05
Плата за оренду землі	×	×	×	500,00
Усього витрат	×	×	×	**4825,27**
Загальновиробничі витрати	×	×	×	241,26
Загальногосподарські витрати	×	×	×	482,53
Виробничі витрати (собівартість) - усього	×	×	×	**5549,07**
Витрати на збут	×	×	×	277,45
Повна собівартість товарної продукції	×	×	×	**5826,52**
Повна собівартість основної продукції	×	×	×	**5243,87**

Таблиця Д.3

Розрахунок енергоємності технології (затрат антропогенної енергії на вирощування) та енерговмісту урожаю при виробництві зерна тритикале ярого, МДж на 1 га

Показник	Контроль	Інокуляція *A. brasilense* 10/1
Затрати праці по технології	8,5	9,5
Затрати праці на ремонтні роботи	2,6	2,7
Затрати праці на управління	0,7	0,8
Разом	11,9	12,9
Насіння	3738,0	3738,0
Інокулянт на основі *A. brasilense* 10/1	×	53,6
Засоби захисту	311	311
Пальне	2641,5	2807,5
Мастила	72,3	77,1
Трактори, комбайни, автомобілі	1825,1	1940,3
Усього витрат енергії	**8611,6**	**8953,4**
Енерговміст урожаю	**142540,1**	**165755,1**
в т.ч.: – зерно	5707,3	66366,3
– солома	85468,8	99388,8