

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 579.26: 631.461.5

ГРУНТОВИЙ САПРОФІТНИЙ ГРИБ *CHAETOMIUM COCHLIODES* PALLISER ЯК БІОТИЧНИЙ ЧИННИК ФОРМУВАННЯ ЕФЕКТИВНИХ АСОЦІАЦІЙ АЗОСПІРИЛ З РОСЛИНАМИ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ

© 2010 р. Є. П. Копилов¹, С. П. Надкерничний¹,
Н. І. Адамчук-Чала²

¹Інститут сільськогосподарської мікробіології
Національної академії аграрних наук України
(Чернігів, Україна)

²Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)

За умов стерильного лабораторного дослідження показано здатність азотфіксуєючих бактерій *Azospirillum brasilense* 102 приживатися на поверхні коренів рослин пшениці ярої і проникати у внутрішні тканини коренів. Під впливом ґрунтового сапрофітного гриба *Chaetomium cochliodes* 3250 чисельність азоспірил у внутрішніх тканинах кореня різко зростала з $9,1 \times 10^2$ до $9,8 \times 10^6$ бактеріальних клітин на 1 г сухих коренів. Приживаність і взаємодія зазначених мікроорганізмів на поверхні коренів підтверджені також електронно-мікроскопічними дослідженнями. Результати польового дослідження засвідчили, що комбіноване застосування *A. brasilense* 102 і *C. cochliodes* 3250 для передпосівної обробки насіння пшениці ярої забезпечило значне обмеження розвитку кореневих гнилей, підвищення інтенсивності біосинтезу хлорофілів *a* і *b* і суттєвий приріст урожайності культури – на 25,3%.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Azospirillum brasilense*, *Chaetomium cochliodes*, діазотрофи, ураженість, кореневі гнилі, урожайність

Біологічна фіксація молекулярного азоту, яка здійснюється ґрунтовими мікроорганізмами, протягом багатьох років є однією з найважливіших проблем біології. Здатність відновлювати N_2 до NH_4^+ виявлена у представників усіх основних груп прокариот, на відміну від еукаріотичних організмів (грибів, рослин, тварин), які неспроможні засвоювати азот атмосфери.

Вищі рослини в ході еволюції пристосувалися до співіснування з бактеріями-

діазотрофами, щоб отримувати відновлені сполуки азоту. Таке співіснування рослин з мікроорганізмами варіюється від слабких асоціацій (колонізація діазотрофами ризосфери рослин) до тісних симбіотичних відносин, коли мікроорганізм проникає всередину тканин рослини (симбіоз бобових і бульбочкових бактерій).

Серед активних ризосферних діазотрофів, які заселяють кореневу зону небобових рослин, існують і такі, що здатні до ендofітії, тобто вони за певних умов проникають у внутрішні рослинні тканини, не викликаючи при цьому, на відміну від фітопатогенних організмів, ознак захворювання. Ендofіти-діазотрофи використовують органічні речовини, що продукує рос-

Адреса для кореспонденції: Копилов Євген Павлович, Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України, вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна;
e-mail: evhenyukopilov@rambler.ru

лина. Крім того, вони позбавлені негативного впливу навколишнього середовища. Рослина, в свою чергу, може повністю залучати до метаболізму азот, що фіксується діазотрофами. Ендофітні діазотрофи чинять на рослину значно більший позитивний вплив, ніж мікроорганізми, що не здатні проникати всередину кореня (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Вступаючи в тісні взаємодії з ендофітними діазотрофами, рослини розширюють свої екологічні можливості і набувають нових метаболічних функцій (Проворов, 1991).

Серед ризосферних діазотрофів, здатних до ендофітії, найбільшою нітрогеназною активністю і позитивним впливом на ріст і розвиток рослин характеризуються бактерії роду *Azospirillum* (Мікробні препарати..., 2006).

Азоспірили, інтродуковані в агробіоценоз, вступають в складні взаємовідносини як з рослиною, так і з мікрофлорою ризосфери. Від їхньої здатності утворювати ефективні ендофітні асоціації з сільськогосподарськими культурами залежить покращення азотного живлення, стимуляція росту і розвитку рослин, збільшення продуктивності, підвищення стійкості рослин до фітопатогенних організмів.

Умови ефективного формування і функціонування ендофітних асоціацій бактерій роду *Azospirillum* з рослинами потребують поглибленого дослідження. Не до кінця зрозумілими, складними і недостатньо вивченими є питання проникнення бактерій-ендофітів, і зокрема азоспірил, всередину рослинної клітини. З літератури відомо, що мікоризні гриби можуть сприяти проникненню бактерій у рослини (Paula et al., 1992).

Аналіз літературних джерел останніх десятиріч свідчить про те, що симбіози грибів і рослин з утворенням мікоризи є дуже поширеними і охоплюють в середньому 85% судинних рослин на Землі. В процесі їх утворення гриби одержують доступ до продуктів фотосинтезу рослин, в свою чергу, гриби постачають рослинам необхідні мінеральні солі. В результаті поліпшується ріст і розвиток рослин, підвищується їхня життєздатність в несприятливих екологічних умовах, формується стійкість рослин до дії патогенів (Крипка и др., 2002).

Враховуючи, що більшість культурних рослин колонізовано мікоризними грибами, можна проводити добір кращих комбінацій макро- і мікросимбіонтів, які здатні утворювати високоактивні мікоризи для одержання високих урожаїв сільськогосподарських культур.

Раніше нами було показано, що інтродукований у кореневу зону пшениці ярої ґрунтовой сумчастий гриб *Chaetomium cochliodes* 3250 активно розвивався на коренях культури і утворював плодові тіла на поверхні кореня і на кореневих волосках, проникав у середину клітин ризодерми і кореневих волосків, що свідчить про утворення ендофітної асоціації між *C. cochliodes* 3250 і рослинами пшениці. Той факт, що при цьому підвищувалась стійкість рослин до збудників кореневих гнилей, збільшувалась концентрація хлорофілів *a* і *b* в листках і суттєво зростала урожайність культури давало підставу вважати, що *C. cochliodes* 3250 вступає в тісні симбіотичні відносини з рослинами пшениці ярої, які мають ознаки мікоризи (Копилов, 2008a).

Крім того, нами було встановлено що *C. cochliodes* 3250, інтродукований у кореневу зону пшениці ярої, сприяв збільшенню чисельності діазотрофів та підвищенню активності процесу фіксації атмосферного азоту азотфіксуючими мікроорганізмами в 1,5-2,5 рази (Копилов, 2008б). Враховуючи те, що азотфіксуючі бактерії роду *Azospirillum* є перспективними біоагентами і використовуються для інокуляції деяких сільськогосподарських культур, було важливим показати дію *C. cochliodes* 3250 на зазначену групу діазотрофів. В умовах вегетаційного досліду зі стрептоміцинстійким мутантом *A. brasilense* 102^{str} нами було виявлено, що *C. cochliodes* 3250 сприяє кращій приживаності азоспірил в різних сферах кореневої зони пшениці ярої (Копилов, 2009).

Метою нашої роботи було з'ясувати роль *C. cochliodes* Palliser 3250 в утворенні і функціонуванні ендофітної асоціації *Triticum aestivum* L. (*T. vulgare* Vill) – *Azospirillum brasilense* 102, та вивчити вплив зазначених мікроорганізмів на ураженість рослин пшениці ярої кореневими гнилями, біосинтез хлорофілу в листках і урожайність культури.

МЕТОДИКА

Вивчення формування ендофітної асоціації *Azospirillum brasilense* 102 з рослинами пшениці ярої (*Triticum aestivum* L. (*T. vulgare* Vill) сорту Рання 93 під впливом ґрунтового сумчастого гриба *Chaetomium cochliodes* 3250 проводили у лабораторних дослідах за стерильних умов. Для цього насіння рослин стерилізували 0,1% розчином AgNO₃ протягом трьох хвилин і вмішували в колби Ерленмейера ємкістю 500 мл з 200 г річкового піску. Пісок спочатку промивали водою і висушували за температури

ГРУНТОВИЙ САПРОФІТНИЙ ГРИБ

50-60°C. Висушений пісок промивали концентрованою соляною кислотою, потім водою і знову висушували. Промитий сухий пісок поміщали в колби Ерленмейера, зволожували поживним розчином Кнопа (60% від повної вологості піску) і стерилізували в режимі 1 атм, 20 хв.

Інокуляцію насіння пшениці ярої здійснювали тридобовою культурою *A. brasilense* 102, яку вирощували на картопляному агарі з малатом, із розрахунку 200 тис. бактеріальних клітин на одну насінину.

Культуру гриба *C. cochliodes* 3250 вирощували в пробірках ПБ-21 на скошеному суслі агарі 4-5° за Балінгом протягом 14 діб за температури 26-27°C. Насіння інокулювали грибом з розрахунку 5×10^4 сумкоспор на одну насінину.

Кількість рослин у повторенні п'ять, кількість повторень 12. Тривалість досліду – 42 доби після посіву. З періодичністю в 7 діб робили посіви ризоплани (відмиті корені) і гістосфери (відмиті корені після поверхневої стерилізації) рослин пшениці ярої на поживні середовища: напіврідке Доберейнер і агаризоване Касероса з метою визначення чисельності азоспірил. Для ізоляції азоспірил з ризоплани корені рослин ретельно промивали протягом 15 хвилин під проточною водою, потім споліскували стерильною водою і розтирали в ступці зі стерильним піском. Гістосферними вважали азоспірили, що були виділені з коренів, відмитих аналогічно з подальшими їх стерилізацією 80% етиловим спиртом і розтиранням зі стерильним піском. Для посіву брали всі корені з рослин двох повторень, тобто 10 рослин. Після розтирання коренів готували серію послідовних розведень.

Підготовку матеріалу для електронно-мікроскопічних досліджень здійснювали у такий спосіб. Корені пшениці клали на чисте предметне скло у краплю 2,5% глутарового альдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,2), за кімнатної температури і витримували протягом 3 год у стакані із притертою кришкою під витяжкою. Після проведення префіксації глутаровий альдегід вибирали шприцем і промивали буфером 15 хв за кімнатної температури. Фіксували зразки в 1% OsO₄ в холодильнику протягом 12 год, використовуючи зазначений буфер. Після промивання зразків у буфері протягом 15 хв за кімнатної температури їх двічі зневоднювали у серії розчинів етанолу зростаючої концентрації (30, 50, 60 та 70%). Далі зразки висушували в ексикаторі з силікагелем (80 кулек 3-4 мм у діаметрі) протягом 48 год (Ко-

рдюм и др., 2008). Висушені зразки наклеювали на металевий столик епоксидним клеєм із алюмінієвими ошурками та піддавали напиленню шаром золота 15-20 нм, після чого їх досліджували в скануючому електронному мікроскопі Jeol JSM 6060LA.

Для дослідження тих самих зразків у трансмісійному електронному мікроскопі їх занурювали у розлиту в молди суміш епоксидних смол та ставили у термощкаф для полімеризації на добу за 37°C та 2 доби за 65°C. Склад смол: Epon 812 – 3 мл, Araldit M – 2 мл, Epon DDSA – 5 мл, DMP – 6 крапель.

Нарізані на мікротомі LKB (Швеція) препарати контрастували двокомпонентним контрастером цитрату свинцю за Рейнольдом. Препарати аналізували в трансмісійному електронному мікроскопі JSM 1200 EX (Японія).

Польовий дослід проводили у 2009 р. на чорноземі вилугованому слабogleюватому легкосуглинковому на лесі (дослідне поле Інституту сільськогосподарської мікробіології), який характеризувався такими агрохімічними показниками: вміст гумусу в орному шарі – 3,5%; рН сольової витяжки – 5,2-5,5; сума ввібраних основ – 12,5-14,0 мг-екв. на 100 г ґрунту; азот, що легко гідролізується (за Корнфільдом) – 95-100 мг; рухомих форм фосфору (за Кірсановим) – 251-256 мг P₂O₅, обмінного калію (за Кірсановим) – 108-111 мг K₂O на 1 кг ґрунту. Площа облікової ділянки – 15 м², повторність досліду 4-разова. У досліді використано сорт пшениці ярої Рассвет («Рассвет»). Норма висіву насіння становила 5 млн. зерен на 1 га. Агротехніка вирощування загальноприйнята для зони Полісся. Під пшеницю яру перед посівом вносили мінеральні добрива в дозі N₄₅P₃₀K₄₅. Досліди заклали за схемою: 1 – без внесення хімічних і мікробних препаратів (контроль); 2 – передпосівна обробка насіння *C. cochliodes* 3250 із розрахунку 50 тисяч сумкоспор гриба на одну насінину; 3 – інокуляція насіння *A. brasilense* 102 із розрахунку 200 тисяч бактеріальних клітин на одну насінину; 4 – комбіноване використання *C. cochliodes* 3250 + *A. brasilense* 102 в зазначених кількостях.

У дослідних варіантах визначали вміст хлорофілів *a* і *b* у листках рослин, ураженість рослин за фазами розвитку кореневими гнилями, структуру врожаю та урожайність.

Вміст хлорофілів *a* і *b* у листках пшениці ярої визначали спектрофотометричним методом (Гродзинский, 1973). Для цього відбирали зразки листків з верхнього ярусу рослини у п'я-

тиразовому повторенні під час цвітіння. Кожен зразок аналізували у чотириразових аналітичних повтореннях.

Для обліку ураженості рослин кореневи-ми гнилями використовували бальну оцінку за розробленою шкалою і відповідні формули (Коршунова і др., 1976).

Планування, проведення польових дослідів, спостереження і обліки здійснювали за класичними методиками польового дослідження (Доспехов, 1985).

Статистичну обробку отриманих експе-

риментальних даних здійснювали методом дисперсійного аналізу (Доспехов, 1985).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Динаміку чисельності азоспірил визначали в ризоплані і гістосфері рослин, які вирощували в стерильному досліді.

Одержані результати свідчать про те, що інтродуковані азоспірили здатні не тільки приживатися у ризоплані, а й проникати у внутрішні тканини рослин пшениці ярої (рис. 1-4). Більш активно азоспірили приживалися на поверхні коренів рослин, де їхня чисельність на

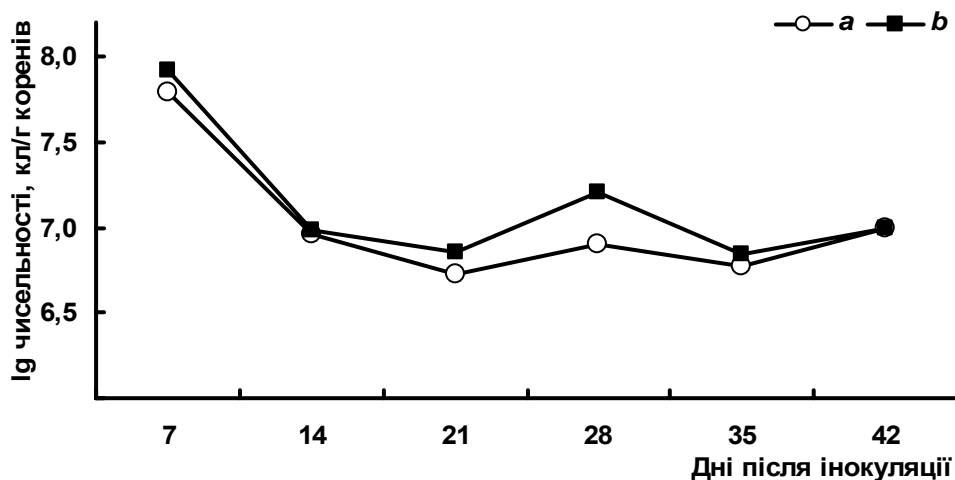


Рис. 1. Вплив ґрунтового гриба *C. cochlodetes* 3250 на колонізацію ризоплани рослин пшениці ярої діазотрофом *A. brasilense* 102 (стерильний дослід).

a – обробка насіння *A. brasilense* 102 ($НІР_{05} = 0,68$); b – обробка насіння *A. brasilense* 102 + *C. cochlodetes* 3250 ($НІР_{05} = 0,72$)

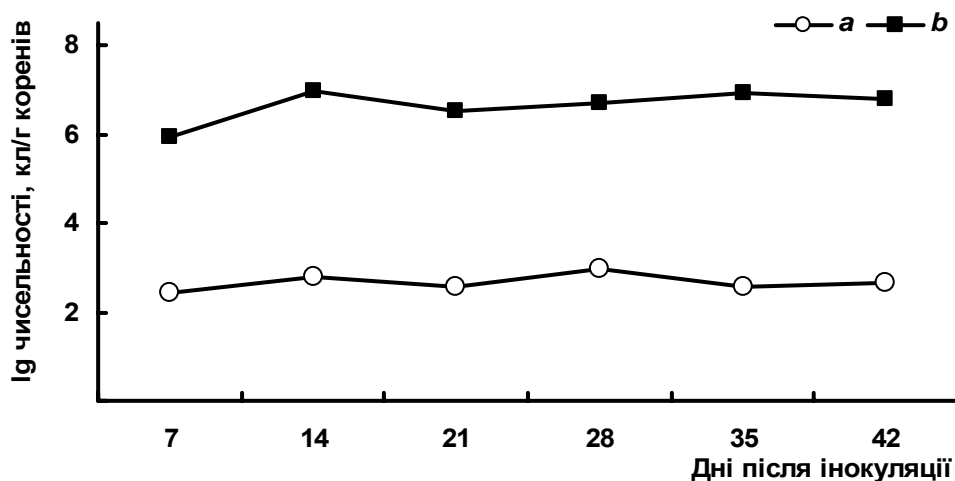


Рис. 2. Вплив ґрунтового гриба *C. cochlodetes* 3250 на колонізацію гістосфери рослин пшениці ярої діазотрофом *A. brasilense* 102 (стерильний дослід).

a – обробка насіння *A. brasilense* 102 ($НІР_{05} = 0,21$); b – обробка насіння *A. brasilense* 102 + *C. cochlodetes* 3250 ($НІР_{05} = 0,74$).

ГРУНТОВИЙ САПРОФІТНИЙ ГРИБ

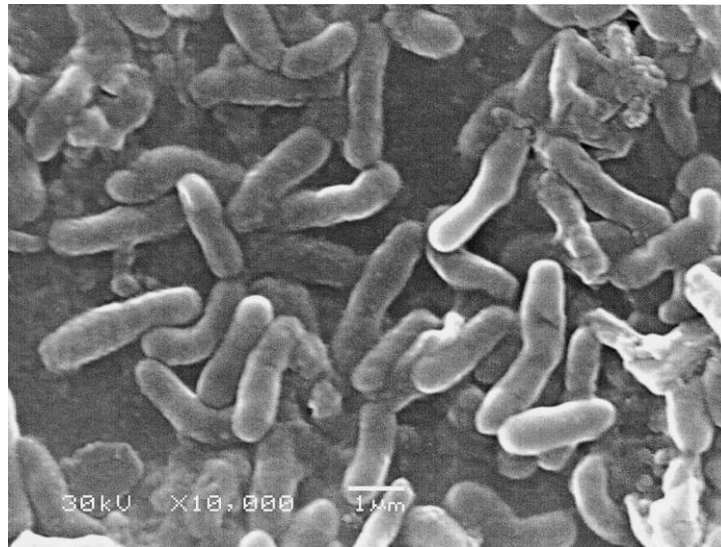


Рис. 3. Електронно-мікроскопічне зображення клітин *A. brasilense* 102.

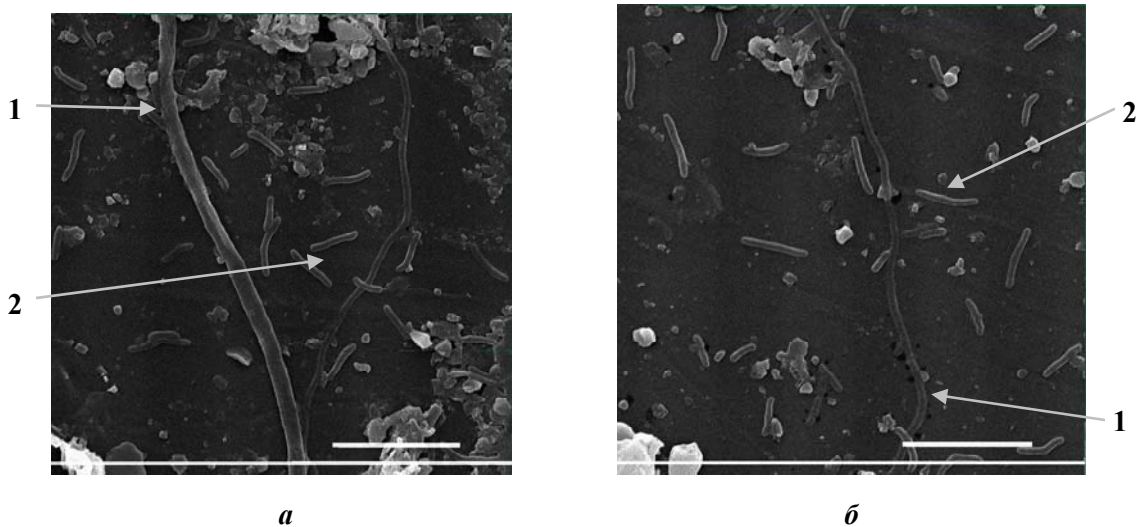


Рис. 4. Електроннограма гіфів *C. cochliodes* 3250 (а) і клітин *A. brasilense* 102 (б), виявлених на поверхні коренів рослин пшениці ярї, інокульованих зазначеними мікроорганізмами (шкала 10 мкм).

1 –гіфи гриба *C. cochliodes* 3250; 2 – клітини *A. brasilense* 102.

14 день після інокуляції знизилась з $6,2 \times 10^7$ до $9,1 \times 10^6$ бактеріальних клітин в 1 г сухих коренів, і майже не змінювалась до завершення досліді, залишаючись на рівні $6,0-9,8 \times 10^6$ клітин. Вплив *C. cochliodes* 3250 в цьому разі був мало помітним і кількість азоспірил у варіанті з комбінованим використанням *C. cochliodes* 3250 + *A. brasilense* 102 досягала $7,0 \times 10^6-1,8 \times 10^7$ клітин в 1 г сухих коренів (рис. 1).

Чисельність *A. brasilense* 102 у внутрішніх тканинах коренів рослин була значно меншою і складала лише $2,6-9,1 \times 10^2$ бактеріальних клітин в 1 г коренів. Під впливом *C. cochliodes* 3250 здатність *A. brasilense* 102 проникати всередину коренів суттєво посилилась і

кількість бактеріальних клітин у гістосфері рослин досягала $8,6 \times 10^5-9,8 \times 10^6$ в 1 г сухих коренів.

Отже, ґрунтовий сумчастий гриб *C. cochliodes* 3250, який здатний утворювати мікоризу з рослинами пшениці ярї, сприяє кращому проникненню азоспірил у внутрішні тканини коренів рослин.

Одержані результати дуже важливі і пояснюють те, чому не завжди інокуляція діазотрофами спричиняє позитивні наслідки. Інтродуковані в кореневу зону рослин, діазотрофи здебільшого чутливі до антибіотиків та інших несприятливих факторів навколишнього середовища і не витримують конкуренції з боку

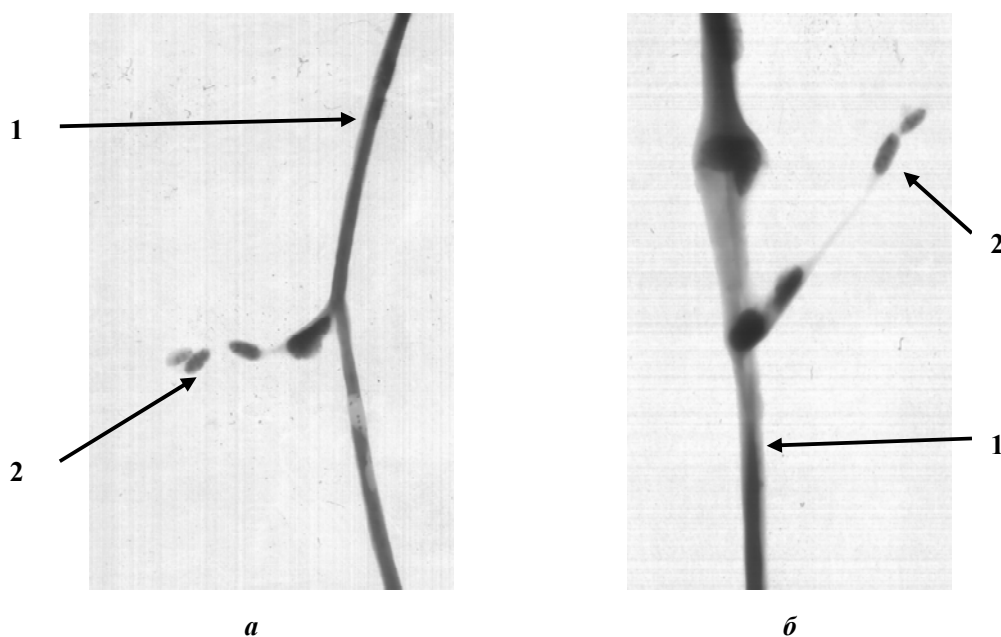


Рис. 5. Електронно-мікроскопічне зображення клітин *A. brasilense* 102 (а) і гіфів *C. cochliodes* 3250 (б), що перебувають у тісному контакті ($\times 3000$).

1 – гіфи гриба *C. cochliodes* 3250; 2 – клітини *A. brasilense* 102.

аборигенної мікрофлори. Проникнення у внутрішні тканини рослин дозволяє діазотрофам зайняти таку екологічну нішу, де вони позбавлені дії негативних чинників довкілля і мають можливість без перешкод позитивно впливати на рослини. Локалізація діазотрофів у тканинах кореня рослин сприятлива для процесу азотфіксації, оскільки в мікронах їхнього розташування забезпечується низький парціальний тиск кисню, що необхідно для активного функціонування бактеріальної нітрогенази, і доступний енергетичний матеріал для цього процесу. Крім того, відбувається тісна взаємодія мікро- і макропартнера, що робить можливим обмін сигнальними молекулами та метаболітами. Так, від діазотрофів у рослину безпосередньо надходять фіксований азот і фітогормони.

Аналіз літературних даних показав, що деякі дослідники вважають здатність азоспірил щодо ендofітії штамовою особливістю. Так, в численних експериментах не вдалося показати, що штам *Sp.7* (типовий для виду *Azospirillum brasilense*) здатний проникати всередину коренів рослин (Assmus et al., 1995; Hartmann et al., 1995). Існує точка зору, що азоспірили не мають достатньої пектолітичної і протеолітичної активності для того, щоб проникнути у внутрішні тканини рослин (Okon, Kapulnik, 1986).

На нашу думку, при вивченні здатності діазотрофів проникати у внутрішні тканини рослин слід враховувати взаємодію ґрунтових грибів з рослинами. Адже саме гриби, проникаючи в корені рослин, можуть сприяти явищу ендofітії діазотрофів. На користь цієї думки свідчать численні літературні дані про мікоризацію бульбочок бобових рослин. Бобові рослини, які перебувають в симбіозі з бактеріями, також здатні утворювати везикулярно-арбускулярну мікоризу, тобто для них характерний потрійний симбіоз: бобові рослини – бульбочкові бактерії – гриби арбускулярної мікоризи (Борисов и др., 2004). Вивчення ендofітних мікроорганізмів, що були виділені з бульбочок «актиноризних» рослин, показало, що до їх складу поряд з франкіями входять також інші бактерії і гриби. Для різних рослин співвідношення грибів і бактерій в бульбочках істотно розрізняються (Иванушкина, 1994). Результати, отримані при вивченні лисохвосту, показали, що його бульбочки поряд з азотфіксуючими бактеріями містили мікоризоутворюючий гриб. Бактерії знаходили не тільки в тканинах бульбочок, а й всередині везикули мікоризоутворюючого гриба. Нестійкий рівень азотфіксуючої активності знайдених бульбочок протягом вегетаційного періоду може свідчити про вторинне проникнення азотфіксуючих бактерій в

ГРУНТОВИЙ САПРОФІТНИЙ ГРИБ

Таблиця 1. Вплив *A. brasilense* 102 і *C. cochliodes* 3250 на вміст хлорофілів *a* і *b* в листках рослин пшениці ярої (польовий дослід, 2009 р.)

Варіант досліду	Концентрація хлорофілу, мг/100 г листків		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
Без внесення хімічних препаратів і мікроорганізмів (контроль)	90,6 ± 4,13	25,8 ± 1,20	116,4 ± 5,24
Обробка насіння Вітаваксом 200ФФ	113,0 ± 4,06	31,7 ± 1,45	144,7 ± 5,51
Обробка насіння <i>A. brasilense</i> 102	144,2 ± 2,85	39,5 ± 1,15	183,7 ± 2,33
Обробка насіння <i>C. cochliodes</i> 3250	160,6 ± 5,13	44,9 ± 1,20	205,0 ± 6,33
Комбінована обробка насіння <i>A. brasilense</i> 102 + <i>C. cochliodes</i> 3250	170,0 ± 3,06	51,0 ± 1,20	221,3 ± 3,18

клітини бульбочок, які раніше були заселені мікоризоутворюючим грибом (Шапошников, 1995).

Результати електронної мікроскопії засвідчили, що *A. brasilense* 102 і *C. cochliodes* 3250 внесені в ґрунт разом з насінням пшениці ярої приживалися і активно розвивалися у кореневій зоні рослин. При цьому характерним було пристосування азоспірил, їхні клітини розміщувались уздовж гіфів і відростків гриба (рис. 4: *a*, *b*). Траплялися також клітини азоспірил, що перебували в тісному контакті з гіфами гриба *C. cochliodes* 3250 (рис. 5: *a*, *b*). Одержані дані дозволяють припустити можливість одночасного заселення коренів пшениці зазначеними мікроорганізмами.

Результати, отримані в польовому досліді, є переконливим свідченням того, що комбінована обробка насіння пшениці ярої азоспірилами і грибом *C. cochliodes* 3250 позитивно позначилась на процесі біосинтезу хлорофілів *a* і *b*, стійкості рослин до збудників кореневих гнилей і, зрештою, на урожайності культури. Так, у варіанті з поєднаним застосуванням *A. brasilense* 102 і *C. cochliodes* 3250 (табл. 1) вміст хлорофілу *a* в листках пшениці ярої збільшився в 1,88 раза, хлорофілу *b* – в 1,97 раза порівняно з контрольним варіантом. Істотне зростання вмісту хлорофілів *a* і *b* виявлено також у варіантах, де зазначені мікроорганізми використовували окремо: *A. brasilense* 102 сприяла збільшенню хлорофілу *a* в 1,6 раза, хлорофілу *b* – в 1,5 раза; *C. cochliodes* 3250 відповідно в 1,8 і 1,7 раза. Хімічний препарат Вітавакс 200ФФ забезпечив підвищення вмісту хлорофілів *a* і *b* тільки в 1,2 раза.

Результати вивчення видового складу грибів, виділених з уражених кореневими гнилями рослин пшениці ярої, засвідчили, що в патогенному комплексі переважали представники

роду *Fusarium*, а саме: *Fusarium culmorum* (W.G.Sm) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd.et Hans., *F. oxysporum* var. *orthoceras* (Appl.et Wr.) Bilai, *F. heterosporum* Nees, *F. sambucinum* var. *minus* Wr. Траплялися також *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (syn. *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram, *Helminthosporium sativum* Pammel, King et Bakke) і, зрідка, *Pseudocercospora herpotrichoides* (From) Deighton. Отже, пшениця яра в досліді була уражена звичайною (гельмінтоспориозною) і фузаріозною кореневими гнилями.

Облік ураженості пшениці ярої кореневими гнилями в польовому досліді здійснювали у фази колосіння і воскової стиглості. Результати (табл. 2) свідчать про високу ефективність використання *C. cochliodes* 3250 як засобу захисту пшениці ярої від фітопатогенних грибів. Так, у варіанті, де використовували цей мікроорганізм, рослини значно менше уражувалися кореневою гниллю (поширення хвороби 4,4-12,0%, розвиток хвороби 0,5-2,0 залежно від фази розвитку рослин), ніж у контрольному варіанті (поширення хвороби 20,9-35,5%, розвиток хвороби 6,7-12,3%). Тобто поширення хвороби зменшилось в середньому в 3,4 раза, а інтенсивність прояву – в 7,6 раза.

Використання азотфіксуючих бактерій *A. brasilense* 102 також сприяло обмеженню розвитку кореневих гнилей і було ефективнішим, ніж використання Вітаваксу 200ФФ. Найефективнішим виявилось поєднане застосування гриба-антагоніста і азотфіксуючих бактерій.

Значне зниження ураженості пшениці ярої кореневими гнилями та підвищення інтенсивності процесу біосинтезу хлорофілів *a* і *b*, що відбувалося при застосуванні азотфіксуючих бактерій і гриба-антагоніста, забезпечило суттєвий приріст урожаю культури – 17,2-

Таблиця 2. Ураженість рослин пшениці ярої сорту Рассвет кореневими гнилями залежно від *A. brasilense* 102 і *C. cochlidos* 3250 (польовий дослід, 2009 р.)

Варіант досліді	Поширення хвороби, %		Розвиток хвороби, %		Біологічна ефективність, %	
	Фази розвитку рослин					
	цвітіння	воскова стиглість	цвітіння	воскова стиглість	цвітіння	воскова стиглість
Без внесення хімічних препаратів і мікроорганізмів (контроль)	20,9	35,5	6,7	12,3	---	---
Обробка насіння Вітаваксом 200ФФ	13,8	23,8	4,2	5,8	37,8	52,5
Обробка насіння <i>A. brasilense</i> 102	10,8	21,4	2,3	3,4	65,0	72,0
Обробка насіння <i>C. cochlidos</i> 3250	4,4	12,0	0,5	2,0	92,1	84,0
Комбінована обробка насіння <i>A. brasilense</i> 102 + <i>C. cochlidos</i> 3250	4,4	6,4	0,6	1,0	91,6	91,5
НІР ₀₅	1,7	3,1	0,4	0,9	6,9	4,0

Таблиця 3. Вплив *A. brasilense* 102 і *C. cochlidos* 3250 на урожайність пшениці ярої сорту Рассвет (польовий дослід, 2009 р.)

Варіант досліді	Урожайність, т/га	Приріст урожаю	
		т/га	%
Без внесення хімічних препаратів і мікроорганізмів (контроль)	3,71	-	-
Обробка насіння Вітаваксом 200ФФ	3,98	0,27	7,2
Обробка насіння <i>A. brasilense</i> 102	4,35	0,64	17,2
Обробка насіння <i>C. cochlidos</i> 3250	4,54	0,83	22,4
Комбінована обробка насіння <i>A. brasilense</i> 102 + <i>C. cochlidos</i> 3250	4,65	0,94	25,3
НІР ₀₅	0,17		

25,3% (табл. 3). Використання ж хімічного препарату Вітаваксу 200ФФ сприяло збільшенню урожайності лише на 7,2%. Одержані результати узгоджуються з літературними даними щодо позитивної дії азоспірил на рослини. Так, було встановлено, що бактерії роду *Azospirillum* продукують біологічно активні речовини, під впливом яких активізується хлоропластогенез (Белорукова, 1998), поліпшується ріст і розвиток рослин (Антонюк, Ігнатов, 1999), підвищується стійкість рослин до несприятливих чинників навколишнього середовища (Белимов і др., 1998), збудників хвороб рослин (Надкерничний, Надкернична, 1999).

Отже, нами показана здатність азотфіксуючих бактерій *Azospirillum brasilense* 102 приживатися на поверхні коренів рослин пшениці ярої і проникати у внутрішні тканини коренів. Приживаність і взаємодія зазначених мікроорганізмів на поверхні коренів підтверджена також електронно-мікроскопічними дослідженнями. Результати польового досліді засві-

дчили, що спільне застосування *A. brasilense* 102 і *C. cochlidos* 3250 для передпосівної обробки насіння пшениці ярої забезпечило значне обмеження розвитку корневих гнилей, підвищення інтенсивності біосинтезу хлорофілів *a* і *b* і суттєвий приріст урожайності культури – на 25,3%.

ЛІТЕРАТУРА

- Антонюк Л.П., Ігнатов В.В. Почвенные ассоциативные симбиозы бактерий и злаков: от фундаментальных исследований к практическому использованию // Фундаментальные и прикладные исследования саратовских ученых для процветания России и Саратовской губернии. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1999. – С. 153-155.
- Белимов А.А., Кунакова А.М., Груздева Е.В. Влияние рН почвы на взаимодействие ассоциативных бактерий с ячменем // Микробиология. – 1998. – Т. 67, №.4. – С.561-568.
- Белорукова О.К. Оценка характера взаимодействия озимой пшеницы с ассоциативными азотфикси-

ГРУНТОВИЙ САПРОФІТНИЙ ГРИБ

- рующими бактериями // Вісн. Харків. держ. аграрн. ун-ту. Сер. «Рослинництво» / Збірн. наук. праць. – Харків, 1998. – С. 32-38.
- Борисов А.Ю., Наумкина Т.С., Штарк О.Ю. и др. Эффективность использования совместной инокуляции гороха посевного грибами арбускулярной микоризы и клубеньковыми бактериями // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. – 2004. – №2. – С. 12-14.
- Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук.думка, 1973. – 567 с.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
- Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Ступарь О.С. и др. Специфика микромицетных комплексов прикорневой зоны и клубеньков актиноризных растений // Микробиология. – 1994. – Т. 63, вып. 5. – С. 909-916.
- Копилов Є.П. Здатність аскоміцета *Chaetomium cochliodes* Palliser вступати в тісні симбіотичні взаємовідносини з рослинами пшениці ярої // Агроекологічний журнал. – 2008а. – № 2. – С. 111-114.
- Копилов Є.П. Вплив *Chaetomium cochliodes* Palliser на функціонування азотфіксувального мікробного угруповання кореневої зони пшениці ярої // Агроекологічний журнал. – 2008б. – №1. – С.80-83.
- Копилов Є.П. Вплив *Chaetomium cochliodes* 3250 на здатність азоспірил приживатися в кореневій зоні пшениці ярої // Наук. записки Тернопіль. націон. пед. ун-ту ім. В.Гнатюка. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 1-2 (39). – С. 55-58.
- Кордюм В.А., Мошинец Е.В., Цапенко М.В. и др. Микроорганизмы ризосферы – полный мониторинг // Грунтознавство. – 2008. – Т. 9, № 1-2. – С. 53-63.
- Кориунова А.Ф., Чумаков А.С., Щекочихина Р.И. Защита пшеницы от корневых гнилей. – Л.: Колос, 1976. – 184 с.
- Крипка А.В., Сорочинский Б.В., Гродзинский Д.М. Молекулярные и клеточные аспекты развития арбускулярных микоризных симбиозов и их значение в жизнедеятельности растений // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 4. – С. 72-81.
- Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика / За ред. В.В.Волкогона. – К.: Аграрна наука, 2006. – 311 с.
- Надкєрничний С.П., Надкєрнична О.В. Бактерії *Azospirillum brasilense* як фактор підвищення імунітету рослин до збудників корневих гнилей // Бюл. Інституту с.-г. мікробіології. – 1999. – №4. – С.14-17.
- Проворов Н.А. Происхождение и эволюция бобоворизобиального симбиоза // Изв. Академии наук СССР. Сер. биологическая – 1991. – №1. – С. 77-87.
- Шапошников Г.Л., Проценко М.А., Калошина Г.С. Взаимодействие бактерий, грибов и клеток растения в клубеньках лисохвоста // 9-й Бахов. коллоквиум по азотфиксации (Москва, 24-26 янв. 1996 г.): Тез. докл. – Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1995. – С.83.
- Assmus B., Hutzler P., Kirchhof G. et al. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61, № 3. – P. 1013-1019.
- Hartmann A., Baldani J.I., Kirchhof G. et al. Taxonomic and ecological studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes // *Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology* / Fendrik I., del Gallo M., Vanderleyden J., de Zamaroczy M. (eds.) – Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer-Verlag, 1995. – Series G: Ecological Sciences. – V. 37. – P. 415-427.
- Okon Y., Kapulnik Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots // Plant and Soil. – 1986. – V. 90, № 1. – P. 3-16.
- Paula M.A., Urquiaga S., Siqueira J.O., Dodereiner J. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*) // Biol. Fertil. Soils. – 1992. – V. 14. – P. 61-66.
- Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – V. 24. – P. 487-506.

Надійшла до редакції
09.10.2009 р.

**SAPROPHYTIC SOIL FUNGUS
CHAETOMIUM COCHLIODES PALLISER AS BIOTIC FACTOR OF EFFECTIVE
ASSOCIATIONS FORMING BETWEEN AZOSPIRILLUM BACTERIA
AND SPRING WHEAT PLANTS**

E. P. Kopilov¹, S. P. Nadkernichny¹, N. I. Adamchuk-Chala²

¹*The Institute of Agriculture Microbiology
of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
(Chernigiv, Ukraine)*

²*M.G. Kholodniy Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

In conditions of laboratory aseptic experiment it was obtained the ability of nitrogen fixing bacteria *Azospirillum brasilense* 102 to settle down on spring wheat root surface and penetrate into inner root tissues. Under the influence of soil saprophyte fungus *Chaetomium cochliodes* 3250 the number of *Azospirillum* cells in inner tissues sharply increased from $9,1 \times 10^2$ to $9,8 \times 10^6$ bacterial cells in 1 g of dry roots. Settling down and interaction of mentioned microorganisms on the root surface was confirmed by investigations using electronic microscopy. The results of field experiments revealed that complex usage of *A. brasilense* 102 and *C. cochliodes* 3250 for presowing processing of spring wheat seeds had provided for considerable limitation of root rot development, rising up the activation of chlorophyll *a* and *b* biosynthesis and essential addition of the culture harvest on 25,3%.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Azospirillum brasilense*, *Chaetomium cochliodes*, nitrogen fixing bacteria, prevalence, root rots, harvest

**ПОЧВЕННЫЙ САПРОФИТНЫЙ ГРИБ
CHAETOMIUM COCHLIODES PALLISER КАК БИОТИЧЕСКИЙ ФАКТОР
ФОРМИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ АССОЦИАЦИЙ АЗОСПИРИЛЛ
С РАСТЕНИЯМИ ПШЕНИЦЫ ЯРОВОЙ**

Е. П. Копылов¹, С. П. Надкерничный¹, Н. И. Адамчук-Чала²

¹*Институт сельскохозяйственной микробиологии
Национальной академии аграрных наук Украины
(Чернигов, Украина)*

²*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

В условиях стерильного лабораторного опыта показана способность азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* 102 приживаться на поверхности корней растений яровой пшеницы и проникать во внутренние ткани корней. Под влиянием почвенного сапрофитного гриба *Chaetomium cochliodes* 3250 численность азоспирилл во внутренних тканях корня резко возросла с $9,1 \times 10^2$ до $9,8 \times 10^6$ бактериальных клеток на 1 г сухих корней. Приживаемость и взаимодействие упомянутых микроорганизмов на поверхности корня подтверждены также электронно-микроскопическими исследованиями. Результаты полевого опыта показали, что совместное использование *A. brasilense* 102 и *C. cochliodes* 3250 для предпосевной обработки семян яровой пшеницы обеспечило значительное ограничение развития корневых гнилей, повышение интенсивности биосинтеза хлорофиллов *a* и *b* и существенный прирост урожайности культуры – на 25,3%.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., *Azospirillum brasilense*, *Chaetomium cochliodes*, дiazотрофы, поражённость, корневые гнили, урожайность