

Н.И. Адамчук-Чалая

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика
Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д03680, Украины*

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ЯРОВОЙ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С АЗОСПИРИЛЛАМИ

*Изучены морфо-функциональные изменения фотосинтетического аппарата пшеницы яровой при инокуляции активными штаммами diaзотрофов рода *Azospirillum*. Инокуляция приводила к увеличению размеров клеток мезофилла 3-х листьев пшеницы яровой и количества хлоропластов в них. Максимальное число гран и объём фотомембран был в хлоропластах растений, инокулированных *A. brasilense* 77, что соответствовало увеличению содержания хлорофилла *b*. В клетках мезофилла растений, инокулированных *A. brasilense* 102, выявлено большее количество хлоропластов, митохондрий и пероксисом, сравнительно с другими вариантами. Растения пшеницы яровой, инокулированные штаммами, содержали значительное количество каротиноидов.*

*Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, ризосферная микроассоциация, пшеница яровая, фотосинтетический аппарат.*

Ассимилированные в процессе фотосинтеза продукты углеводного метаболизма в агроценозах расходуются в трофических цепях при участии многочисленных почвенных микроорганизмов. Благодаря жизнедеятельности растительно-микробных микроценозов почва пополняется большим количеством метаболитов.

Среди почвенных diaзотрофов, способных к фиксации молекулярного азота из атмосферы, особое внимание привлекают ризосферные бактерии рода *Azospirillum* [5, 8]. В ризосфере зерновых культур азоспириллы формируют высокоэффективные микроассоциации, оказывающие стимулирующий эффект на рост и развитие растений [7], в частности пшеницы яровой [8].

Методами световой и электронной микроскопий с использованием флуоресцентных антител и нуклеотидных зондов было установлено, что азоспириллы располагаются в мучигеле на поверхности корней растений, а также способны проникать во внутренние слои паренхимы, стимулируя рост и развитие растений [7, 8]. Однако, на сегодняшний день недостаточно изученными остаются аспекты ответа растительного организма на действие азоспирилл, в частности зависимость ростовых и ассимиляционных процессов растений от инокуляции штаммами азоспирилл разной активности.

Материалы и методы. Изучение формирования микроассоциации *Azospirillum brasilense* с растениями пшеницы яровой (*Triticum aestivum* L.) сорта Ранняя 93 проводили в лабораторных исследованиях в асептических условиях на базе Института сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААНУ. Для этого зерновки растений стерилизовали 0,1 % раствором $AgNO_3$ в течении трех минут, промывали стерильной водопроводной водой, помещали в колбы Эрленмеера ёмкостью 50 мл с 200 г речного песка. Для проведения опытов песок сначала промывали водопроводной водой и высушивали при температуре 50-60 °С. Высушенный песок промывали концентрированной соляной кислотой, затем стерильной водой и снова высушивали. Промытый сухой песок помещали в колбы Эрленмеера, увлажняя питательным раствором Кюпа (60 % от полной влагоемкости песка) и стерилизовали в режиме 1 атм, 20 мин. Инокуляцию зерновок пшеницы яровой сорта Краса Полесья проводили трехсуточной культурой *Azospirillum brasilense* (штаммы 77, 102 и sp7 коллекции Института сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААНУ), которую выращивали на картофельном агаре с малатом. Инокуляционная нагрузка составляла 200 тыс. бактериальных клеток на одну зерновку. В контрольном варианте зерновки обрабатывали эквивалентным количеством стерильной водопроводной воды.

Приживаемость азоспирилл и локализацию в ризосфере и ризоплане пшеницы яровой оценивали с помощью методики анализа полимерных поверхностей обрастания, описанных в работе [8].

Серединные высечки 3-го листа растений фиксировали 3 часа в 3 %-м растворе глютаральдегида на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,2). После промывки идентичным буфером материал фиксировали в растворе 1 %-го тетроксид осмия в течении 3-х часов, промывали буфером и дегидратировали в растворе этилового спирта восходящей концентрации от 30 % до 100 % и ацетоне. Для исследования образцов в трансмиссионном электронном микроскопе Jeol 1200-EX (Япония) образцы помещали в молды, заливали смесью эпоксидных смол и полимеризовали при температуре 37°C первые сутки и двое суток при 65°C. Состав смол: Epon 812 – 3 мл, Araldit M – 2 мл, Epon DDSA – 5 мл, DMP – 6 капель. Нарезанные на микротоме LKB (Швеция) препараты контрастировали цитратом свинца по Рейнольду [4].

Морфометрию проводили по 50-ти медианным срезам клеток мезофилла для каждого из вариантов [4]. Статистическую обработку данных проводили по программе STAT.

Содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом [6]. Каждый образец анализировали в пятикратной повторности.

Результаты и их обсуждение. Микротестирование пленок обрастания в корневой системе пшеницы подтвердило наличие палочек азоспирилл в муцигеле на поверхности корней растений и в ризосфере. При анализе панорамных снимков архитектуры микроассоциаций пшеницы яровой с активными штаммами азоспирилл (рис. 1) просчитывали число бактерий (среднее из 50-ти) в поле зрения (табл. 1) в ризоплане растений на поверхности корней (рис. 1, фрагмент 1), в ризосфере пшеницы яровой в прикорневой области – до 2 мм от корня (рис. 1, фрагмент 2) и более 2 мм от корня (рис. 1, фрагмент 3).

Таблица 1

Численность азоспирилл в корневой зоне пшеницы яровой

Локализация бактерий	Количество клеток азоспирилл на 10 ⁴ мкм ²		
	<i>A. brasilense</i> 77	<i>A. brasilense</i> 102	<i>Azospirillum</i> Sp7
на поверхности корней	24,14±3,89	28,49±8,85	20,36±3,92
в прикорневой области	52,19±11,78	97,29±10,59	48,64±8,52
в ризосфере	47,90±2,10	44,23±0,72	44,48±4,02

Примечание: уровень значимости $p \leq 0.05$

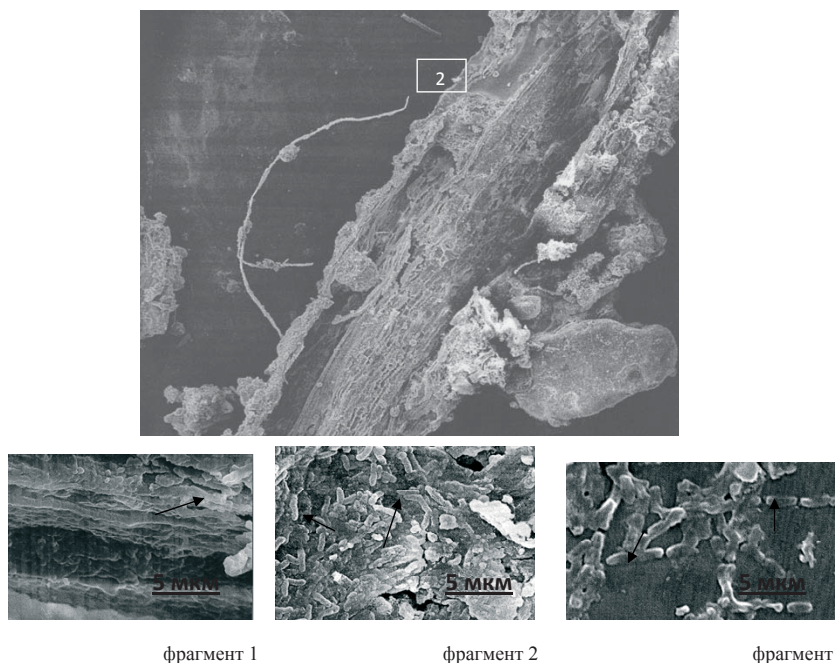


Рис. 1. Фрагмент корневой зоны пшеницы яровой: в ризоплане растений на поверхности корней (фрагмент 1), в ризосфере пшеницы яровой в прикорневой области – до 2 мм от корня (фрагмент 2) и более 2 мм от корня (фрагмент 3), стрелками указаны бактерии.

Достоверного отличия локализации азоспирилл исследованных штаммов на поверхности корней пшеницы яровой не обнаружено, но они существенно отличались от значительно больших показателей в прикорневой области и в ризосфере (табл. 2). Во всех вариантах инокуляции количество клеток азоспирилл в ризосфере вдвое превышало их число на поверхности корней. Однако наибольшая плотность расположения бактерий во всех трех вариантах инокуляции наблюдалась в прикорневой области. При инокуляции зерновок пшеницы яровой *A. brasilense* 102 число бактерий в поле зрения в прикорневой области значительно возрастало в сравнении с обработкой *A. brasilense* 77 и *Azospirillum* Sp7. Причем количество клеток азоспирилл *A. brasilense* 102 в прикорневой области почти вдвое превышало их число в ризосфере.

На поперечных срезах пластинки листьев пшеницы яровой между одноклеточными слоями адаксиальной и абаксиальной эпидерм располагались округленные клетки мезофилла, содержащие многочисленные эллипсоидные хлоропласты по периферии клеток. Толщина мезофилла во всех вариантах была одинаковой. Изменения структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата пшеницы яровой при бактеризации разными штаммами азоспирилл по сравнению с вариантами без инокуляции (табл. 2, 3) проявились в достоверном увеличении размеров клеток и количества цитоплазматических органелл, возрастании объёма фотомембран в хлоропластах и содержания основных пигментов листьев. Объём клеток мезофилла у бактеризованных растений был в 1,4-1,8 раз выше в сравнении с контролем (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрия клеток мезофилла растений пшеницы яровой, инокулированной азоспириллами

Параметры клеток	Контроль без инокуляции	Штаммы азоспирилл		
		<i>A. brasilense</i> 77	<i>A. brasilense</i> 102	<i>Azospirillum</i> Sp7
Толщина мезофилла, мкм	144,33±0,75	146,09±1,01	147,45±0,57	146,09±0,67
Объём клеток, мкм ³	1879±79	3445±128	2630±98	2690±128
Количество в клетке:				
Хлоропластов	15,75±1,44	26,06±1,94	41,81±1,28	36,63±1,61
Митохондрий	15,00±0,28	25,00±0,42	35,00±0,85	30,00±0,37
Пероксисом	9,00±1,68	13,00±3,47	21,00±2,18	10,00±2,25
Число гран в хлоропласте	12,00±0,32	17,00±0,98	15,00±0,27	14,00±1,23
Объём фотомембран, мкм ³	165,50±12,26	310,50±32,63	238,70±32,81	302,90±24,05

Примечание: уровень значимости $p \leq 0.05$

На усиление клеточного метаболизма, пластических и энергетических процессов в мезофилле листьев бактеризованных растений указывало возрастание числа цитоплазматических органелл: увеличение в 1,6-2,6 раза количества хлоропластов и в 1,6-2,3 раза митохондрий в мезофилле инокулированных растений. Количество пероксисом при действии штаммов 77 и 102 увеличивалось в 1,4-2,3 раза. Возрастание по сравнению с контролем в трёх экспериментальных вариантах таких ультраструктурных показателей хлоропластов как числа гран в 1,1-1,4 раза и объёма фотомембран в 1,4-1,8 раза соответствует увеличению содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях инокулированных растений пшеницы яровой.

В ходе наших исследований при инокуляции зерновок пшеницы яровой бактериями рода *Azospirillum* отмечалось достоверное увеличение содержания хлорофилла *a* и суммы хлорофиллов у инокулированных растений по сравнению с контролем (табл. 4). Это соответствует возрастанию объёма фотомембран и количества гран хлоропластов в клетках мезофилла соответствующих вариантов (табл. 3). Однако достоверное увеличение содержания хлорофилла *b*, который преимущественно сосредоточен в тилакоидах гран и состоит из пигмент-белковых комплексов фотосистемы 2 [11, 13], было отмечено только для варианта с обработкой штаммом *A. brasilense* 77, где в хлоропластах при увеличении количества гран, возрастало и число тилакоидов в гранах доходя до 25-ти в отдельных гранах. В двух других вариантах инокуляции содержание хлорофилла *b* было меньше контрольного значения, а именно в вариантах *A. brasilense* 102 и *Azospirillum* Sp7.

**Содержание хлорофиллов и каротиноидов растений пшеницы яровой,
инокулированной азоспириллами, мг/100 г листьев**

Параметры клеток	Контроль без инокуляции	Штаммы азоспирилл		
		<i>A. brasilense</i> 77	<i>A. brasilense</i> 102	<i>Azospirillum</i> Sp7
Хлорофилл <i>a</i>	122,57±3,32	228,26±3,88	137,86±3,49	165,27±3,58
Хлорофилл <i>b</i>	44,93±0,60	54,97±0,72	43,42±0,57	39,70±0,51
Сумма хлорофиллов <i>a+b</i>	167,50±5,90	232,14±15,24	181,28±6,39	204,97±6,78
Каротиноиды	45,00±1,61	76,05±2,95	60,30±2,78	66,70±2,79

Примечание: уровень значимости $p \leq 0.05$

Микроорганизмы ризосферы, стимулирующие рост растений, формируют популяции высокой плотности в прикорневой области, как это было показано в опытах с пшеницей яровой, сахарной свёклой, картофелем, томатами, горохом [17]. От азотфиксирующих бактерий в надземную часть растений поступают продукты жизнедеятельности, способствующие увеличению интенсивности фотосинтеза в растении-хозяине за счет накопления хлорофиллов в листьях и развития листовой массы [10].

Мы же предполагаем возможность коррелятивных связей увеличения числа бактерий *A. brasilense* 102 в корневой зоне пшеницы и количественных морфометрических показателей фотосинтетического аппарата пшеницы яровой при обработке зерновок данным штаммом.

Фотосинтетический аппарат растений является первичным продуцентом органических веществ, поступающих в почву. По мнению авторов [14] выделения корневых экссудатов составляют около 20 % общего объема продуктов фотосинтеза. При этом органическими веществами интенсивно обогащается область ризосферы до 2 мм от поверхности корня.

Именно в прикорневой области пшеницы яровой нами выявлено увеличение числа бактерий *A. brasilense* 102 по сравнению с другими вариантами.

Поскольку для активации нитрогеназы необходимо присутствие АТФ, то в качестве дополнительного фактора регуляции процесса азотфиксации у diaзотрофов, авторы [16, 15] рассматривают путь поставки бактериям молекул АТФ из растений. Клеточными органеллами, запасаящими энергию в макроэргических связях АТФ в мезофилле растений, являются хлоропласты, митохондрии, количество которых в клетках мезофилла инокулированных растений значительно возрастало. Кроме того, под действием инокулянтов одновременно усиливалось развитие фотомембран в хлоропластах клеток мезофилла.

При обработке семян пшеницы суспензией азоспирилл увеличивается прорастание инокулированных зерновок, активизируется хлоропластогенез [3], увеличивается вегетативная масса за счет возрастания как общей листовой поверхности, так и усиления процесса формирования корневой системы [2].

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о стимулирующем влиянии азоспирилл на растения в эффективных микроассоциациях стабильной популяции diaзотрофов [5, 8], использующей для питания синтезированные растением органические вещества.

В наших исследованиях инокуляция зерновок пшеницы яровой diaзотрофами рода *Azospirillum* приводила к увеличению размеров клеток мезофилла 3-х листьев пшеницы яровой и количества хлоропластов в них. Наибольшее число гран и объем фотомембран был в хлоропластах растений, инокулированных *A. brasilense* 77, что соответствовало увеличению содержания хлорофилла *b*.

Известно, что изменение содержания хлорофилла в листьях бобовых растений влияет на динамику нитрогеназной активности клубеньков [3]. Антипчук с соавторами (1990) на примере сортов разных бобовых культур показали положительную корреляцию между интенсивностью азотфиксации в клубеньках и содержанием хлорофилла *a* в листьях. Следует подчеркнуть, что лишь хлорофилл *a* является первичным донором электронов и обеспечивает способность растений к фотосинтезу [12].

В клетках мезофилла растений, инокулированных *A. brasilense* 102, выявлено увеличение числа хлоропластов, митохондрий и пероксисом, сравнительно с другими вариантами, что

указывает на высокий уровень клеточного дыхания у инокулированных этим штаммом растений. Растения пшеницы яровой, инокулированной *A. brasilense* 77 и *Azospirillum* sp7, содержали значительное количество каротиноидов, которые, в частности, способны исполнять роль тепловых фильтров растений при избыточном температурном воздействии.

Таким образом, изучение взаимоотношений сельскохозяйственных культур с различными штаммами азотфиксирующих бактерий на уровне микроассоциаций является одним из важных направлений повышения продуктивности микробно-растительных систем.

N.I. Adamchuk-Chala

*Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ГСП, D03680, Україна*

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ПРИ ВЗАЄМОДІЇ ІЗ АЗОСПІРАМИ

Резюме

Вивчено морфо-функціональні зміни фотосинтетичного апарату пшениці ярої при інокуляції активними штамми діазотрофів роду *Azospirillum*. Інокуляція призвела до збільшення розмірів клітин мезофілу 3-х листків пшениці ярої та кількості хлоропластів в них. Найбільше число гран та об'єм фотомембран був в хлоропластах рослин, інокульованих *A. brasilense* 77, що співпадало із збільшенням вмісту хлорофілу *b*. В клітинах мезофілу рослин, інокульованих *A. brasilense* 102, виявлено більшу кількість хлоропластів, мітохондрій та пероксисом, порівняно із іншими варіантами. Рослини пшениці ярої, інокульовані штамми, містили значну кількість каротиноїдів.

Ключові слова: *Azospirillum brasilense*, ризосферна мікроасоціація, пшениця яра, фотосинтетичний апарат.

N.I. Adamchuk-Chala

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF SPRING WHEAT PLANTS UNDER INTERRELATION WITH DIASOTROPHS OF *AZOSPIRILLAS*

S u m m a r y

The morphological and functional changes of photosynthetic apparatus of spring wheat at inoculation by active strains of *Azospirillum* genus diazotrophs were studied. Inoculation resulted in an increase of mesophyll cell size of 3 spring wheat leaves and chloroplasts in them. The largest number of grains and volume of photomembranes were presented in the chloroplasts of plants inoculated by *A. brasilense* 77, which coincided with an increase in chlorophyll *b* content. In the mesophyll cells of plants inoculated by *A. brasilense* 102 a greater number of chloroplasts, mitochondria and peroxysomes was found as compared to other options. The spring wheat plants inoculated by the strains contained a significant amount of carotenoids.

The paper is presented in Russian.

K e y w o r d s: *Azospirillum brasilense*, microassociate of rhizosphere, spring wheat, photosynthetic apparatus.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Adamchuk-Chala N.I., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.*

1. *Антипчук А.Ф., Канцелярук Р.М., Рангелова В.М. и др.* Связь между фотоассимиляционной активностью бобовых растений и их симбиотической азотфиксацией //Микробиол. журн. – 1990. – 52, №6. – 49–53.
2. *Антонюк Л.П.* Почвенные ассоциативные симбиозы бактерий и злаков: от фундаментальных исследований к практическому использованию. Л.П. Антонюк, В.В. Игнатов // В кн. Фундаментальные и прикладные исследования саратовских ученых для процветания России и Саратовской губернии. – Изд-во Саратов. ун-та, 1999. – С. 153–155.
3. *Алисова С.М., Тихонович И.А.* Использование хлорофильных мутантов гороха в качестве модели для изучения взаимосвязи между фотосинтезом и симбиотической азотфиксацией // Генетика. – 1983. – 19, №9. – С. 1512–1517.

4. Біологічний азот / [Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін.] За ред. акад. УАН В.П. Патики. – К.: «Світ», 2003. – 422с.
5. Васильев А.Е., Муравник Л.Е. Динамика клеточных компонентов тканей листа *Populus deltoids* (*Salicaceae*) в ходе жизненного цикла // Ботан. журн. – 1997, – № 9. – С. 1–3.
6. Волкогон В.В. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы // Микробиол. журн. – 2000. – 62, №2. – С. 51–68.
7. Гродзинский А.М. Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук. Думка, 1973. – 567 с.
8. Козар С.Ф. Мікробні комплекси за участю азоспірил як регуляторів росту рослин // Агроекол. журн. – 2008. – Спец. вип. – С. 109–111.
9. Копылов Е.П. Селекция эффективных штаммов diaзотрофов для инокуляции яровой пшеницы // Микробиология і біотехнологія. – 2007. – №1. – С. 67–73.
10. Копилов С.П., Надкерничний С.П., Адамчук-Чала Н.І. Грунтовий сапрофітний гриб *Chaetomium cochliodes* Palliser як біотичний чинник формування ефективних асоціацій азоспірил з рослинами пшениці ярої // Вісник Харківського Національного Аграрного університету, серія Біологія. – 2010. – вип. 1(19). – С. 91–100.
11. Коць С.Я., Маличенко С.М., Кругова О.Д. та ін. Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом. – К.: Логос, 2001. – 271с.
12. Кочубей С.М. Организация фотосинтетического аппарата высших растений. – Киев: «Альтерпрес», 2001. – 204с.
13. Шипман Л.Л. Электронная структура и функции хлорофиллов и их феофитинов // Фотосинтез / Под ред. ОРТ. Д. Говинджи. – М.: Мир, 1987. – Т. 1. – С. 403–410.
14. Bassi R., Dainese P. The role of light-harvesting complex II and of the minor chlorophyll a/b proteins in the organization on the photosystem II antenna system // Current Researches Photosynthesis / Ed. M. Baltscheffsky. – Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1990. – 2. – P. 209–216.
15. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. and Mol. Biol. Revs. – 2000. – 64, N4. – P. 847–867.
16. Dobreiner J., Pedrosa F.O. Nitrogen fixing bacteria in non leguminous crop plants. – Berlin; Heydelberg; N.Y.: Springer Verlag, 1987. – P. 155.
17. Gallori E. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* / E. Gallori, M. Bazzicalupo // FEMS Microbiol. Lett. – 1985. – 28. – P. 35–38.
18. Haas D., Reimmann C., Valverde C. Common mechanisms in beneficial and deleterious host-microbe interactions // Biology of Plant Microbe Interactions: New bridges between past and future: Proceeding of the 11 International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. – St. Peterburg, July 18-26, 2003. – St. Paul (Minn), 2004. – P. 537–541.

Отримано 12.09.2011