

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ГСП, ДОЗ680, Україна

ВПЛИВ ІНОКУЛЯЦІЇ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* УКМ В-6035 НА МІКРОСТРУКТУРУ РИЗОСФЕРНОГО ЦЕНОЗУ І ФОТОСИНТЕТИЧНИЙ АПАРАТ СОЇ

Досліджено розвиток популяції *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 в суспензійній культурі, стерильному ґрунті і ризосфері сої за інокуляції бульбочковими бактеріями. Встановлено збільшення кількості бактерій на поверхні головного кореня і в ризосфері інокульованої сої. Фотосинтетичний апарат інокульованих рослин збільшувався за такими морфологічними показниками: площі пластинки листка і загальної товщини мезофілу за рахунок зростання розвитку палісадного і губчатого шарів. Морфологічні зміни розвитку фотосинтетичного апарату сої підтверджуються спектрометричними вимірюваннями головних пігментів пластинки листка.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035, трансгенна соя, листок, коефіцієнт відбиття, хлорофіли, каротиноїди.

Зв'язування молекулярного азоту бульбочковими бактеріями тісно пов'язано із фіксацією диоксиду вуглецю у процесі фотосинтезу [1, 5, 6, 15]. При відновленні молекулярного азоту в клітині мікроорганізми-азотфіксатори використовують енергію макроергічних зв'язків АТФ, джерелом яких є фотоасиміляти, синтезовані в листках рослини-живителя.

В умовах симбіозу у бобових рослин збільшуються асиміляційна поверхня фотосинтетичного апарату і розміри клітин мезофілу та зростає поліморфізм хлоропластів [12, 13].

Відомо, що за інокуляції бульбочковими бактеріями у бобових рослин зростає вміст хлорофілів *a* [1] і *b* [1, 2], а також сумарний вміст хлорофілів (*a+b*) [2]. Досліджено позитивний вплив інокуляції на площу фотосинтетичної поверхні листків, накопичення біомаси і врожай рослин, але морфолого-анатомічні та ультраструктурні зміни фотосинтетичного апарату інокульованих рослин на сьогодні майже не досліджені. Крім того, недостатньо вивчено просторове заселення кореневої зони сої ґрунтовими мікроорганізмами.

Тому метою нашої роботи було дослідити мікроструктуру ризосферного ценозу кореневої зони та морфо-функціональні показники фотосинтетичного апарату сої, інокульованої *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були бульбочкові бактерії *B. japonicum* УКМ В-6035 – високоефективний симбіонт сої з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН.

Для дослідження морфології клітин у суспензійній культурі штамп вирощували на рідкому манітно-дріжджевому середовищі наступного складу (г/л): маніт – 10,0; дріжджовий екстракт – 2,0; глюканат кальцію – 1,5; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,1; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 0,01; рН 7,2 на качалках 220 об./хв., за температури 26-28 °С протягом 96 год.

Морфологію клітин у рідкій культурі вивчали методом електронної трансмісійної мікроскопії. Для цього нанесену на сіточки з формваровою підложкою клітини суспензії протягом доби витримували в епіндорфах в парах 25% глютаральдегіду, півдоби – в парах 4 % тетроксиду осмію і три доби в бюксах з кубиками силікогелю для їх повітряної дегідратації.

Для дослідження морфології клітин *B. japonicum* УКМ В-6035, що існують у ґрунті використовували легкосуглинистий чорноземний ґрунт, який стерилізували за методикою [4]. У стерильний ґрунт вносили суспензії клітин *B. japonicum* УКМ В-6035, яку вирощували у рідкому середовищі протягом 96 год. Культура знаходилась у кінці експоненційної стадії росту.

Суспензійну культуру вносили за титром 10^8 на 1г ґрунту. Вологість ґрунту становила 50 % відносної вологоємності, яку підтримували на цьому рівні протягом 10-ти діб. Для дослідження бактеріальних клітин *B. japonicum* УКМ В-6035 у стерильному ґрунті за методикою [8] в ґрунт вміщували стерилізовану в етиловому спирті плівку обростання із поліетилентерефталату розміром 1см x 5 см – біосумісного гідрофобного прозорого полімеру, який впродовж 10 діб інкубувався в ґрунті. Обережно витягнуті із ґрунту плівки обробляли в парах

фіксаторів [8] та полімеризували в суміші епоксидних смол, як описано в розділі 4 монографії [4]. Тонкі зрізи (300-500 нм) виготовляли на мікротомі (LKB, Швеція) і аналізували в трансмісійному електронному мікроскопі JEOL JSM-1400.

Досліджували мікроструктуру мікробного угруповання ризосфери сої лінії 40-3-2, який був відібраний із популяції трансгенної сої, що характеризувалась ознакою толерантності до гліфосату. Дрібноділянковий експеримент закладався в умовах мікростаціонарного досліду на базі Білоцерківської дослідно-селекційної станції – підрозділу Інституту біоенергетичних культур і цукрового буряка НААН України. Дослідження проводили протягом двох років (2010-2011 рр.).

Для дослідження мікробного ценозу рослин інокульованої *B. japonicum* УКМ В-6035 сої використовували стерилізовану в етиловому спирті плівку обростання, її розташовували вздовж головного кореня сої. Впродовж росту рослин і кореневої системи корені щільно прикріплювались до плівки. Після 20-ти діб експозиції плівку, що обростала корінцями, виймали, препарували за методикою [8], нарізали смужками 0,5 x 1 см, на різній відстані вздовж зони всмоктування кореня і досліджували на ділянках: поверхня кореня (ризоплана), прикоренева зона (від 0,1 мм до 2 мм) та у ризосфері (2-3 мм від поверхні головного кореня), як зазначено в роботі [11]. Плівку, оброблену галактозоспецифічним лектином, міченим пероксидазою (кафедра зоології і ембріології Львівського національного медичного університету), фотографували у світлових мікроскопах (NU-2 та МТ 5300Н, Японія). Ідентифікація бактеріальної компоненти мікробценозу проводилася завдяки зв'язуванню на поверхні бактерій часток лектинів сої, мічених пероксидазою [9]. При цьому бактерії набували темно-бурий відтінок (рис. 2) за схемою (рис. 3).

Для дослідження неспецифічного зв'язування лектину у трансмісійному електронному мікроскопі за методикою [4] препарати клітин *B. japonicum* УКМ В-6035 на сіточках обробляли соєвим лектином, отриманим із Інституту біохімії і фізіології рослин і мікроорганізмів РАН (Саратов), у розведенні (1:32).

Для виявлення локалізації гранул волютину використовували барвник за методикою Раскіної: фуксин Ціля – 4 мл, насичений спиртовий розчин метиленового синього – 4 мл, оцтова кислота льодяна – 5 мл, 95 % етиловий спирт – 95 мл, дистильована вода – до 200 мл.

Ультроструктурну будову клітин вивчали на 10 непошкоджених, повністю розтягнутих зрілих листках 4-го ярусу з 5 рослин для кожного варіанта.

Дослідження фотосинтетичного апарату сої проводили за допомогою автоматизованого комплексу аналізу листових пластин SIAMS MesoPlant™ «МАКРО» (ООО «СИАМС», Кафедра фізіології рослин УРГУ, Російська Федерація).

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програм Microsoft Office Excel і Statistica 6.0. Середні морфолого-анатомічні значення порівнювали, використовуючи тест Student-Newman-Keuls.

Спектрометрія головних пігментів фотосинтезу проведена за спектрами відбиття з використанням спектрометру Asp S/N 1304 P16 (Інститут космічних досліджень НАНУ і ДКАУ) за методикою, описаною в статті [14].

Результати та їх обговорення. Вивчення морфології суспензійних культур дослідженого штаму показало, що ознаки клітин повільно рослих бульбочкових бактерій *B. japonicum* УКМ В-6035 (рис. 1а) відповідали наведеним у паспорті культури для 5–7-добової культури штаму, культивованого на агаризованому поживному середовищі. Представлене в табл. 1 варіювання розмірів бактерій обчислювали за 10-ма електроннограмами по 50 клітин в полі зору. Більшість популяції складала бактерії середньої величини. Клітини бактерій суспензійної культури *B. japonicum* УКМ В-6035 як і в паспорті культури клітин *B. japonicum* УКМ В-6035 були монотрихами (рис. 1б). Мічені лектини рівномірно зв'язувались у міжклітинному просторі щільністю 45-60 одиниць на 1 μm^2 і на поверхні полі цукрової капсули бактерій (рис. 1б). В клітинах бактерій накопичувалися осміофільні ліпопротеїнові краплі.

Бактеріальні клітини *B. japonicum* УКМ В-6035, що розвивалися в стерильному ґрунті на полімерній плівці обростання, мали трохи видовжену еліптичну форму (рис. 1в). В популяції переважали великі клітини довжиною понад 2 мкм (табл. 1). У міжклітинному просторі виявлялися мікроскопічні частки ґрунту і мічені лектини щільністю 5-12 одиниць на 1 μm^2 . Мічені

лектини виявлялися на поверхні клітин бактерій (рис. 1в). Бактеріальні клітини були оточені тонким 10-20 нм електроннопрозорим шаром слизу (рис. 1г і його фрагмент). Зовнішній шар цитозолу був обмежений цитоплазматичною мембраною (рис. 1г і його фрагмент). В цитозолі середньої електронної щільності бактеріальних клітин розташовувалось 3-5 осміофільних гранул діаметром 5-70 нм (рис. 1в), які у паличкоподібних бактерій є місцем накопичення жирових включень і волютину. До складу волютинових або метахроматинових глобул також входять поліфосфати, макроергічні зв'язки яких виступають енергетичними депо бактеріальних клітин, що сприяє виживанню бактерій у ґрунті.

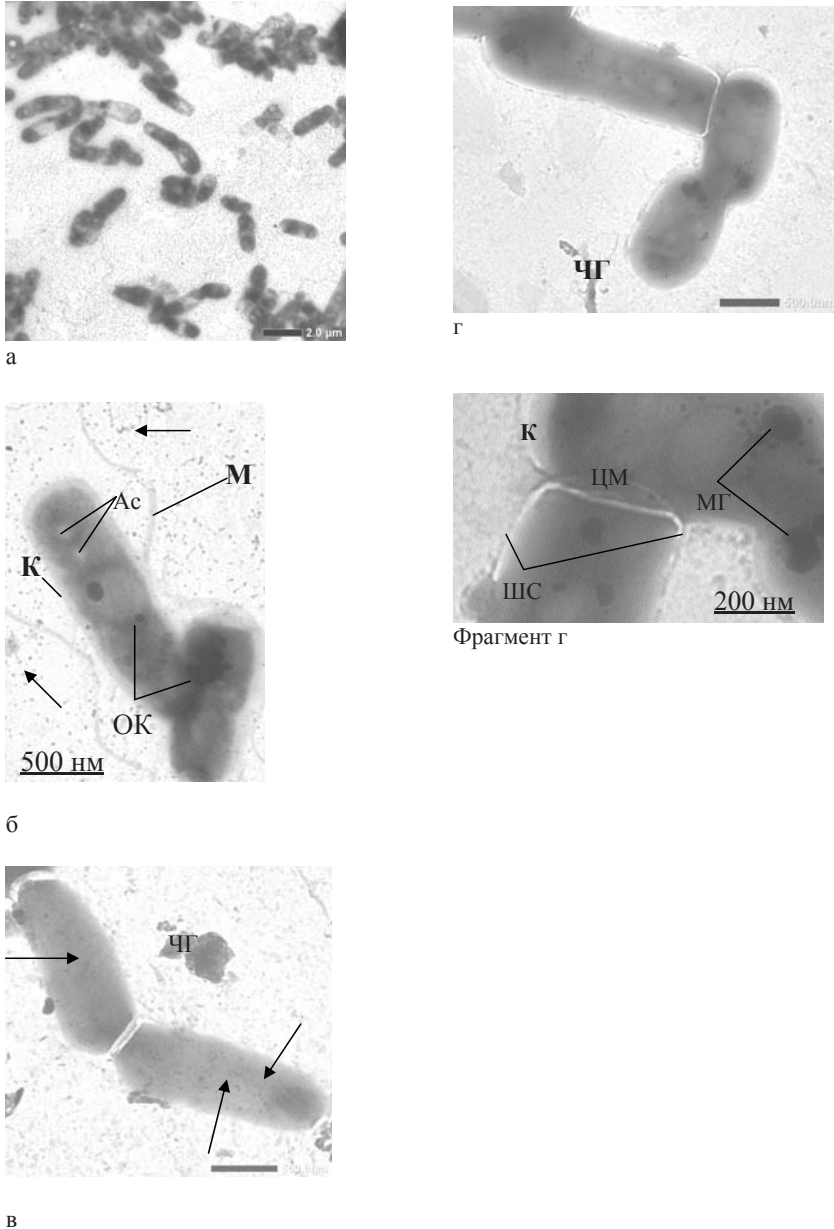


Рис. 1. Електроннограми клітин культури *B. jaronicum* УКМ В-6035: а, б – в суспензії, в, г – в стерильному ґрунті, б, в – з обробкою лектинами, стрілками вказані мітки лектинів: М – монотрих, К – капсула, Ас – аеросома, ОК – осміофільні краплі, МГ – метахроматичні (поліфосфатні) гранули, ЦМ – цитоплазматична мембрана, ШС – шар слизу, ЧГ – частки ґрунту.

Співвідношення бактерій *B. japonicum* УКМ В-6035 за розмірами залежно від умов вирощування

Середовище існування	Відносний вміст, % від загальної кількості дослідних клітин бактерій різних розмірів у популяції		
	Мілки ширина до 0,3 μm довжина до 1,5 μm	Середні ширина 0,3- 0,8 μm довжина 1,5- 2 μm	Великі ширина понад 0,8 μm довжина понад 2 μm
Суспензія клітин у рідкому поживному середовищі	18,58	65,06	16,35
У стерильному ґрунті	9,15	36,73	54,12

Щільність заселення мікроорганізмами кореневої зони сої була визначена їх чисельністю на фрагментах плівки обростання, розташованій у певних зонах кореня. На рис. 2 представлені збільшені фрагменти фото: 1 – поверхні кореня, 2 – прикореневої зони і 3 – ризосфери. За умови взаємодії з лектинами бактерій набували темно-бурого кольору, що вирізняло їх з поміж інших механічних і рослинних компонентів ґрунту.

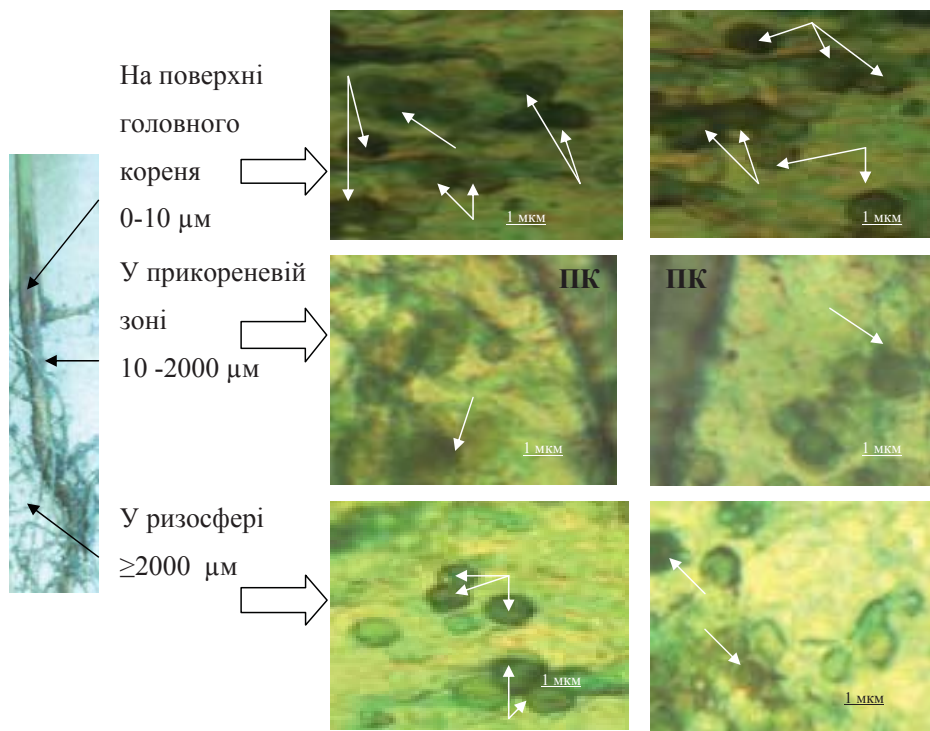


Рис. 2. Схема відображення та розташування мікроорганізмів мікробіологічного ценозу ризосфери сої, інюльованої *B. japonicum* УКМ В-6035 в умовах поля, ПК – поверхня кореня. Білими стрілками вказані бактерії, де відбулася реакція утворення бурих відкладень продукту полімеризації діамінобензидину.

Відомо, що галактоза є компонентом клітинної стінки [5, 6]. Цей цукор також входить до складу екзометаболітів бактерій – полісахаридів і ліпополісахаридів [9, 15]. Локалізацію бактерій у середовищі можна визначати за специфічною реакцією зв'язування галактозо специфічних лектинів з відповідним вуглеводом, що входить до складу клітинної стінки або екзаметаболітів (рис. 3) за схемою, наведеною в роботі [9].

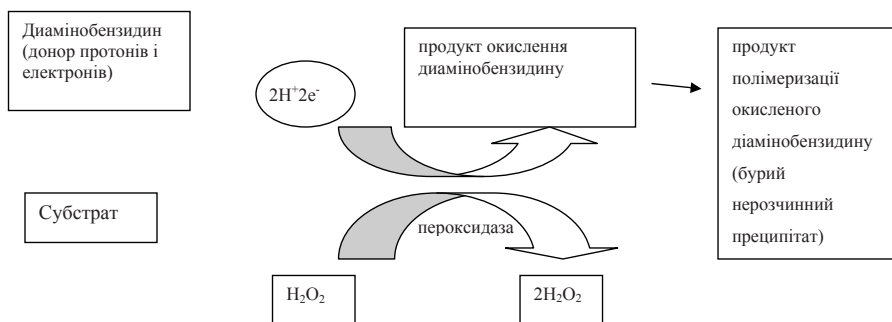


Рис. 3. Реакція зв'язування галактозо специфічних лектинів, мічених пероксидазою.

Результати підрахунку чисельності мікроорганізмів по окремих частинах кореневої зони наведені в табл. 2. Виявлено статистично достовірне збільшення кількості бактерій на поверхні головного кореня у 2,2 рази і в ризосфері у 1,7 рази у інокульованій сої, порівняно з відповідними варіантами без інокуляції.

Таблиця 2

Вплив інокуляції *B. japonicum* УКМ В-6035 на чисельність бактерій мікроченузу кореневої зони сої, (кл./ 100 μм² плівки обростання)

Варіант дослідження	Поверхня головного кореня		Прикоренева зона		Ризосфера	
	М	s	М	s	М	s
Без інокуляції	5, 67	0, 21	7, 62	0, 33	4, 26	0, 12
Інокуляція <i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	12,48	1, 65	9, 86	0, 73	7, 22	0, 58

М – середнє арифметичне, s – середньоквадратичне відхилення.

Відомо, що мікробіота є одним із головних чинників формування ефективних мікробно-рослинних систем [3], а передпосівна інокуляція насіння бактеріальними препаратами є важливим фактором, що впливає на розвиток фотосинтетичного апарату рослини [10, 12, 15].

Проведений нами аналіз поперечних зрізів листової пластинки сої показує типову організацію мезофілу, характерну для листків середньої формації дводольних рослин.

Інокуляція приводила до достовірного зростання таких показників морфології фотосинтетичного апарату сої: площі пластинки листка – на 38 %, ширини мезофілу – на 25,5 %, палісадного шару мезофілу на 18 %, губчатого – на 37 %, що забезпечувало більшу асиміляційну площу і глибину поглинання квантів сонячного світла [7].

Таблиця 3

Характеристики морфолого-анатомічної організації листків 4-го ярусу рослин сої

Варіант дослідження	Площа пластинки листка, см ²	Ширина мезофілу, μм		
		палісадного	губчатого	загальна
Інокуляція <i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	92, 53±3, 18*	208±14*	148±13*	356±11*
Без інокуляції	57, 62±3, 32	171±13	93±8	264±13

p<0, 05

Оптичні властивості листка визначали за методиками вимірювання спектрів відбиття-поглинання [14] і реєстрували на різних довжинах хвиль, що відповідають ефектам відбиття пігментів спектру каротиноїди-хлорофіли.

У варіанті інокульованої сої зареєстровано сплеск спектру поглинання хлорофілів (рис. 4). При цьому у рослин без інокуляції відбите світло складало 2,9 % хлорофілу *a* і 3,7 % хлорофілу *b*, а у інокульованих рослин відбивалось лише 1,8 % хлорофілу *a* і 2,4 % хлорофілу *b*, тобто в умовах інокуляції пластинки листка сої поглинали більше світла, ніж рослини без бактерізації.

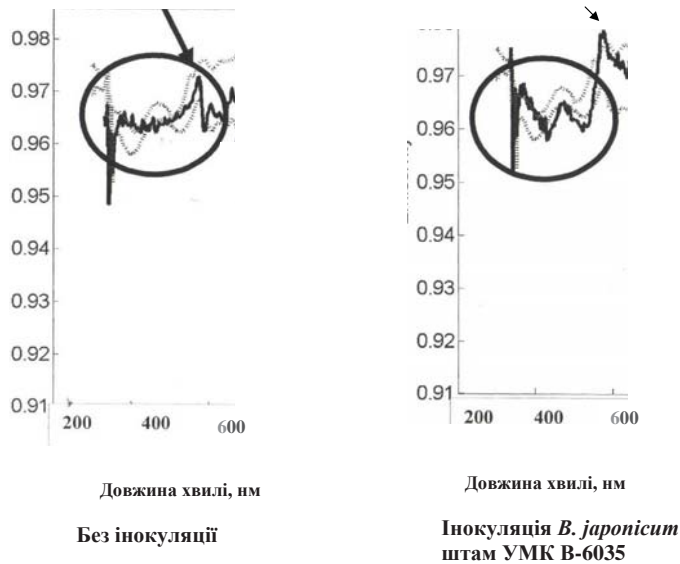


Рис. 4. Спектри відбиття-поглинання поверхні листової пластинки рослини сої. По осі ординат вказано коефіцієнт поглинання. Стрілками показано піки виявлення хлорофілів.

У рослин без інокуляції виявлялося зниження кривої в діапазоні 430-490 нм, що свідчить про інгібування синтезу каротиноїдів, які в захисних клітинних механізмах рослин відіграють роль теплових фільтрів і сприяють нівелюванню стресового впливу високих температур.

Таким чином нами виявлено морфологічні відмінності бульбочкових бактерій *B. japonicum* УМК В-6035 у суспензійній культурі і стерильному ґрунті. У популяції суспензійної культури переважали бактерії середніх розмірів, монотрихи, а в цитоплазмі містилися мілкі аеросоми і осміофільні ліпідні краплі. Щільність зв'язування лектинів в суспензійній культурі була вища, ніж у клітин, що існували в стерильному ґрунті. В популяції бактерій у стерильному ґрунті переважали великі бактерії аеросом, що утворювали шар слизу і накопичували в цитоплазмі гранули ПОМ і метахроматинові глобули.

У проведених нами польових дослідженнях встановлено зростання чисельності мікрофлори в кореневій зоні сої, інокульованої *B. japonicum* УМК В-6035. Інокуляція сої стимулювала розвиток фотосинтетичного апарату рослин за такими показниками як: площа пластинки листка, ширина мезофілу, його палисадного і губчатого шарів, що підтверджувалося підвищенням піків хлорофілів у спектрограмах поглинання.

Н.И. Адамчук-Чалая

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ВЛИЯНИЕ ИНОКУЛЯЦИИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* УМК В-6035 НА МИКРОСТРУКТУРУ РИЗОСФЕРНОГО ЦЕНОЗА И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ СОИ

Резюме

Исследовано развитие бактериальных клеток *Bradyrhizobium japonicum* УМК В-6035 в суспензионной культуре, в стерильной почве и в ризосфере сои, инокулированной клубеньковыми бактериями. Определено увеличение количества бактерий на поверхности главного корня и в ризосфере инокулированной сои. Увеличивались такие показатели фотосинтетического аппарата инокулированных растений: площадь пластинки листа и общей толщины мезофилла за счет возрастания палисадного и губчатого его слоёв. Морфологические изменения развития пластинки листа подтверждались спектрометрическими измерениями главных пигментов пластинки листа.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum* УМК В-6035, трансгенная соя, листок, коэффициент отражения, хлорофиллы, каротиноиды.

**INFLUENCE OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* UKM B-6035
INOCULATION ON THE MICROSTRUCTURE OF SOYBEAN RHIZOSPHERE
CENOSIS AND PHOTOSYNTHETIC APPARATUS**

S u m m a r y

Development of *Bradyrhizobium japonicum* UKM B-6035 bacterial cells in suspension culture, aseptic soil and rhizosphere of soybean plants inoculated by nodulate bacteria were investigated. The increase of bacteria number on the surface of main root and rhizosphere was determined in nodulated soybean plants. Photosynthetic apparatus of inoculated plants increased due to morphological characteristics: the leaf blade area and width of mezophyll palisade and spongy layers. Morphological changes in the leaf blade development were confirmed by spectrophotometric measurements of main pigments on the leaf blade.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у о р д с: *Bradyrhizobium japonicum* UKM B-6035, transgenic soybean, leaf, reflectance coefficient, chlorophylls, carotenoids.

Т 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. – С. 49–53.
2. *Береговенко С.К.* Інтенсивність фотосинтетичних процесів різних сортів сої залежно від інокуляції ефективними штамами *Bradyrhizobium japonicum* // Наук. зап. Тернопіл. Пед. Ун-ту ім. Володимира Гнатюка. Сер. Біологія. – 2003. – 2, № 21. – С. 19–23.
3. Биорегуляция микробно-растительных систем: Монография / Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андреев Е.И. и др. / Под общей ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко. – Киев: Ничлава, 2010. – 464 с.
4. *Волкогон В.В., Надкернична О.В., Токмакова Л.М., Мельничук Т.М., Чайковська Л.О., Надкерничний С.П., Шерстобов М.К., Козар С.Ф., Копилов Є.П., Крутило Д.В., Пархоменко Т.Ю., Каменєва І.О., Адамчук-Чала Н.І., Ковалевська Т.М., Дідович С.В., Волкогон К.І., Пищур І.М., Волкогон М.В., Дімова С.Б., Комок М.С.;* за наук. ред.: В.В. Волкогона. Експериментальна ґрунтова мікробіологія – Київ: Аграр. наука, 2010. – 464 с.
5. *Коць С.Я., Маліченко С.М., Кругова О.Д. та ін.* Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом. – Київ: Логос, 2001. – 271 с.
6. *Коць С.Я., Береговенко С.К., Кириченко Н.В., Мельникова Н.Н.* Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов. – Киев: Наук. думка, 2007. – 314 с.
7. *Кочубей С.М.* Организация фотосинтетического аппарата высших растений. – Киев: Альтерпрес, 2001. – 204 с.
8. *Кордюм В.А., Мошинец Е.В., Цапенко Н.В., Адамчук-Чала Н.И., Иродов Д.Н., Андриченко В.И.* Микроорганизмы ризосферы – полный мониторинг // Грунтознавство. – 2008. – С. 53–63.
9. *Луцук А.Д., Дедюк Е.С., Луцук М.Д.* Лектины в гистохимии. – Львов: Выща шк. Изд-во при Львов. ун-те, 1989. – 144 с.
10. *Begna S.H., Dwyer D., Cloutier L., Assemay A., DiTommaso X., Zhou X., Smith D.L.* Decoupling of light intensity effects on the growth (biomass increase) and development of C3 and C4 weed // J. Experimental Botany. – 2002. – 53. – P. 1935–1940.
11. *Davey M.E., O'Toole G.A.* Microbiol biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. and Mol. Biol. Revs. – 2000. – 64. – P. 847–867.
12. *Khan W.M., Prithviraj B., Smith D.L.* Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates // J. Plant Phys. – 2003. – 160. – P. 485–492.
13. *Rawsthorne E.S., Minchin F.R., Summerfield R.J.* Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules // Phytochemistry. – 1980. – 19. – P. 341–355.
14. *Smith K.L., Steven M.D., Colls J.J.* Use of hyperspectral derivative ratios in the red-edge region to identify plant stress responses to gas leaks // Remote Sensing of Environment. – 2004. – 92. – P. 207–217.
15. *Zang H., Prithviraj B., Souleimanov A., D'Aoust F., Charles T. C., Driscoll B.T., Smith D.L.* The effect of temperature and genestein concentration on lipo-chitooligosaccharide (LCO) production by wild-type and mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum* // Soil Biology and Biochemistry. – 2002. – 34. – P. 1175–1180.

Отримано 10.02.2013