



УДК 631.528.6:633.34

Н. І. Адамчук-Чала, В. О. Яценко,
член-кореспондент НАН України Г. О. Іутинська

Вплив інокуляції *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 на фотосинтетичний апарат сої

Досліджували архітекtonіку мікробного ценозу кореневої зони інокульованої бульбочковими бактеріями трансгенної сої, вирощеної в польових умовах, із паралельним моніторингом морфофункціонального стану фотосинтетичного апарату рослин методами електронної мікроскопії та дистанційної спектрофотометрії. Визначено збільшення кількості бактерій на поверхні головного кореня і в ризосфері інокульованої сої в порівнянні з рослинами без бактеризації. Морфометричні дослідження палисадного мезофілу інокульованих рослин виявили статистично значуще збільшення ширини мезофілу, площі клітин мезофілу, коефіцієнта палисадності, коефіцієнта пластичності, частки хлоропластів від загальної площі мезофілу порівняно з неінокульованими. Морфологічні зміни розвитку фотомембран підтверджені спектрометричними вимірюваннями головних пігментів пластинки листка.

Фіксація молекулярного азоту бульбочковими бактеріями тісно пов'язана із фіксацією діоксиду вуглецю в процесі фотосинтезу [1–4]. При відновленні молекулярного азоту мікроорганізми-азотфіксатори використовують енергію макроергічних зв'язків АТФ, джерелом яких є фотоасиміляти, синтезовані в листках рослини-живителя.

В умовах спонтанного симбіозу бобових рослин [5, 6] збільшується асиміляційна поверхня фотосинтетичного апарату, розміри клітин мезофілу та поліморфізм хлоропластів.

Відомо, що за інокуляції бульбочковими бактеріями у бобових рослин зростає вміст хлорофілів a і b [1], а також сумарний вміст хлорофілів ($a + b$) [7]. Підтверджено 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 вивчені.

Тому ми ставили за мету дослідити архітекtonіку мікробіоценозу кореневої зони та морфофункціональні показники фотосинтетичного апарату сої, інокульованої *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035.

Матеріали і методи. Дослідження проводили протягом двох років (2010–2011 рр.) на рослинному матеріалі сої лінії 40–3–2, який був відібраний з популяції трансгенної сої, що

характеризувалась ознакою толерантності до гліфосату. Польовий експеримент виконували в умовах мікростаціонарного досліду на базі Білоцерківської дослідно-селекційної станції — підрозділу Інституту біоенергетичних культур і цукрового буряка НААН України.

Для дослідження архітектоніки мікробного ценозу рослин сої, інокульованої *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035, використовували стерилізовану в етиловому спирті плівку обростання із поліетилентерефталату — біосумісного полімеру. Ця плівка є сучасною модифікацією скелець Холодного. Її розташовували вздовж головного кореня сої і досліджували на ділянках: поверхня кореня, а також прикоренева зона та в ризосфері на відстані 1 і 5 мм від кореня відповідно. Після експозиції плівки в кореневій зоні протягом 22 діб на її поверхні формувалась біоплівка обростання. Для мікроскопічних досліджень плівку обережно виймали з ґрунту і обробляли галактозоспецифічним лектином, міченим пероксидазою згідно з методикою виробника (кафедра зоології і ембріології Львівського національного медичного університету) [8]. Біоплівку фотографували у світлових мікроскопах (NU-2 та МТ 5300Н, Японія). Ідентифікація бактеріальної компоненти мікробіоценозу проводилася завдяки зв'язуванню на поверхні бактерій гранул мічених пероксидазою лектинів сої. При цьому бактерії набували темно-бурого відтінку, що відрізняло їх з-поміж інших механічних і рослинних компонентів ґрунту.

Ультраструктурну будову рослинних клітин вивчали на 10 непошкоджених, повністю розтягнутих зрілих листках 4-го ярусу з 5 рослин для кожного варіанта; висічки (2–3 мм) брали з середньої частини листків справа від центральної жилки.

Попередню фіксацію зразків здійснювали за умов вакуумної інфільтрації в розчині 2,5% глутарового альдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,0) при кімнатній температурі протягом 4 год. Зразки промивали в 0,1 М фосфатному буфері (дві зміни по 10 хв) і фіксували в розчині 1% OsO₄ на 0,1 М фосфатному буфері протягом 6 год. Фіксований матеріал промивали в тому ж буфері та зневоднювали в серії розчинів етанолу та ацетоні висхідної концентрації, просочували та заливали в суміш смол (епон/аралдит) за загальноприйнятою в електронній мікроскопії методикою. Ультратонкі зрізи (300 нм) пластинки листків отримували на ультрамікротомі, фарбували цитратом свинцю і досліджували в трансмісійному електронному мікроскопі JEM 1200 фірми EX (Японія). Зрізи фотографували та їх зображення сканували для кількісної обробки цифрових зображень.

Лінійні розміри та площі мезофілу вимірювали з мікрофотографій, використовуючи програму UTHSCSA ImageTool 3.0. Визначали такі показники: ширина мезофілу, площа клітин мезофілу, коефіцієнт палісадності (співвідношення ширини шару стовпчастого мезофілу до ширини губчастого шару), частка хлоропластів від загальної площі мезофілу, коефіцієнт пластичності (КП) [9].

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програм Microsoft Office, Excel і Statistica 6.0. Середні морфолого-анатомічні значення порівнювали, використовуючи тест Student-Newman-Keuls [5].

Спектрометрія головних пігментів фотосинтезу проведена за спектрами відбиття з використанням лабораторного спектрометра Asp (Інституту космічних досліджень НАН України і ДКА України) за методикою, описаною в статтях [4, 10].

Результати і обговорення. На рис. 1 подано мікрофотографії плівки обростання, розташованої в кореневій зоні рослин, а також її збільшені фрагменти: 1 — прикоренева зона, 2 — поверхня кореня, 3 — ризосфера.

Результати підрахунку чисельності мікроорганізмів по окремих частинах кореневої зони наведені в табл. 1. Виявлено статистично достовірне збільшення кількості бактерій на

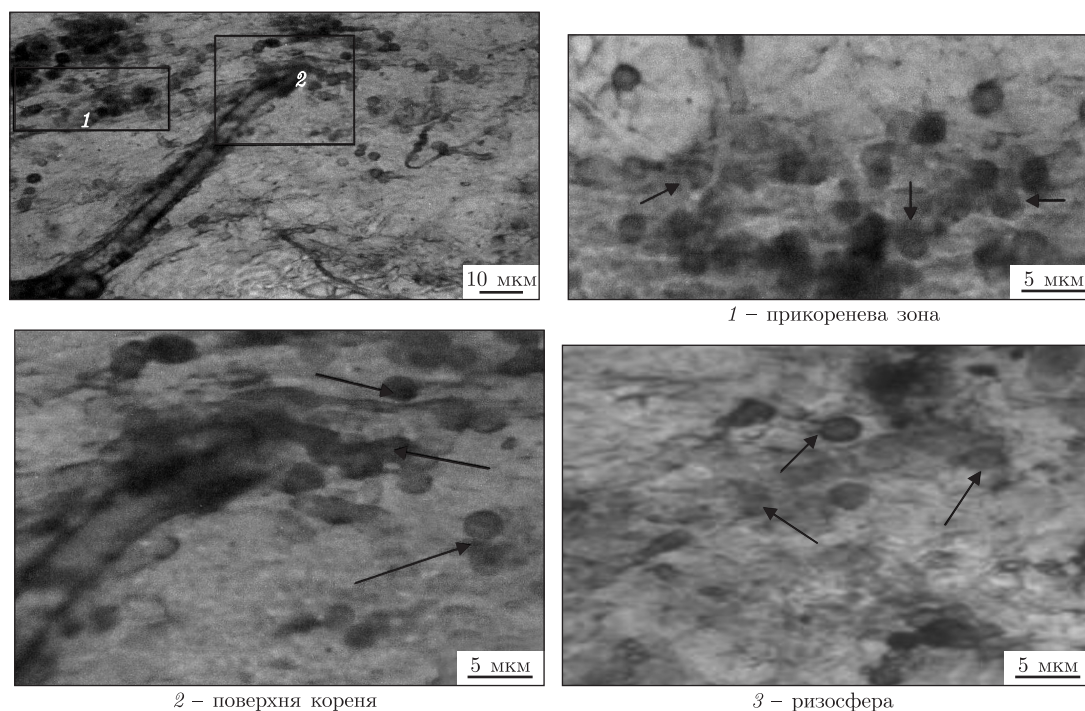


Рис. 1. Плівка обростання з фрагментом кореня сої, інокульованої *B. japonicum* УКМ В-6035. Стрілками вказані бактерії, виявлені за реакцією зв'язування мічених пероксидазою лектинів сої

поверхні головного кореня у 2,2 раза і в ризосфері в 1,7 раза в інокульованій сої порівняно з відповідними варіантами без інокуляції.

Відомо, що мікробіота є одним із головних чинників формування ефективних мікробно-рослинних систем [11], а передпосівна інокуляція насіння бактеріальними препаратами є важливим фактором, що впливає на розвиток фотосинтетичного апарату рослини [4, 5, 9].

Проведений нами аналіз поперечних зрізів листової пластинки сої показує типову організацію мезофілу, характерну для листків середньої формації дводольних рослин: 2–3 шари паралельно видовжених клітин стовпчастого або палисадного мезофілу, де переважно відбувається процес фотосинтезу, і губчастий або запасуючий мезофіл із розвиненим міжклітинним простором (рис. 2).

Інокуляція сприяла достовірному зростанню таких показників морфології мезофілу: ширини мезофілу — на 34,8%, площі клітин мезофілу — на 39,1%, коефіцієнта палисадності — на 17%. Майже на третину зростала частка хлоропластів від загальної площі мезофілу, що свідчить про більший розвиток фотосинтетичного апарату в інокульованих рослин (табл. 2).

Таблиця 1. Вплив інокуляції *B. japonicum* УКМ В-6035 на чисельність бактерій мікроценозу кореневої зони сої, кл./ 100 мкм² плівки обростання

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

Примітка. *M* — середнє арифметичне, *s* — середньоквадратичне відхилення.

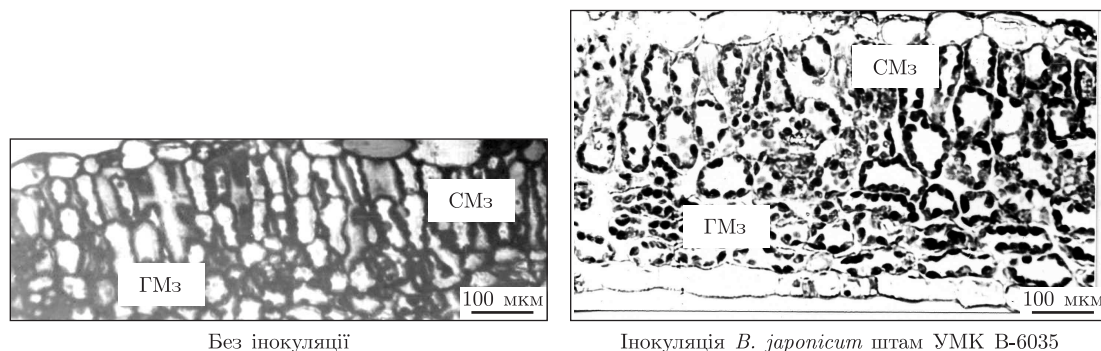


Рис. 2. Поперечний зріз пластинки листка сої.
СМз — стовчастий мезофіл, ГМз — губчастий мезофіл

Інокульовані рослини сої характеризувалися високими показниками коефіцієнта пластичності (більше 0,5) за такими морфологічними ознаками, як: ширина мезофілу, площа клітин мезофілу і коефіцієнт палісадності, що вказує на більшу адаптаційну здатність фотосинтетичного апарату цих рослин.

Наступним етапом дослідження було проведення порівняльного аналізу ультраструктурної організації хлоропластів стовчастого мезофілу листків інокульованих рослин сої.

Як видно з електронограм (рис. 3), хлоропласти інокульованих і неінокульованих рослин розташовувалися в периферійних шарах цитоплазми сильно вакуолізованих клітин палісадного мезофілу вздовж клітинної оболонки в контактах із мітохондріями. Хлоропласти інокульованих рослин містили більш розвинену систему фотомембран, яка складалася з тилакоїдів гран і об'єднуючих їх тилакоїдів строми.

Порівняльний ультраструктурний аналіз хлоропластів палісадного мезофілу (табл. 3) показав, що за умов інокуляції парціальний об'єм як тилакоїдів гран, так і тилакоїдів

Таблиця 2. Характеристики морфолого-анатомічної організації листків 4-го ярусу рослин сої

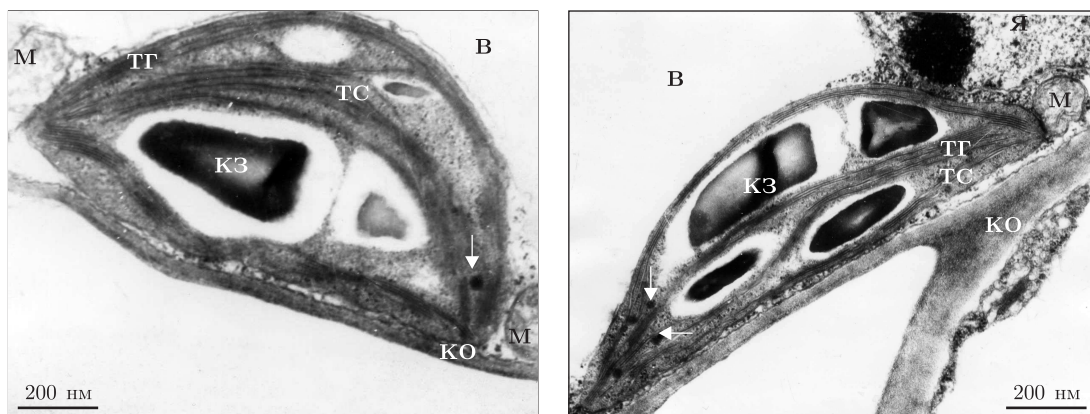
Варіант досліджу	Ширина мезофілу		Площа клітин мезофілу		Коефіцієнт палісадності		Частка хлоропластів від загальної площі мезофілу	
	мкм	КП*	мкм ²	КП	Од.	КП	%	КП
Інокуляція <i>B. japonicum</i> УМК В-6035	356 ± 11	0,68	1287 ± 33	0,87	2,29	0,52	60,57 ± 2,27	0,35
Без інокуляції	264 ± 13	0,26	925 ± 21	0,74	1,96	0,42	42,81 ± 2,78	0,30

*КП — коефіцієнт пластичності визначається як відношення різниці між максимальним і мінімальним до середнього значення.

Таблиця 3. Співвідношення парціальних об'ємів компонентів хлоропластів палісадного мезофілу рослин сої

Параметр	Інокуляція <i>B. japonicum</i> УМК В-6035	Без інокуляції
Тилакоїди гран, %	22,73 ± 1,05*	15,70 ± 0,50
Тилакоїди строми, %	12,55 ± 0,06*	10,90 ± 0,09
Крохмаль, %	20,16 ± 1,43	20,94 ± 1,81
Пластоглобули, %	0,74 ± 0,34	1,50 ± 1,03*
Строма, %	43,45 ± 1,89	50,96 ± 1,63

* $P \leq 0,05$, достовірні відмінності у порівнянні з варіантом без інокуляції.



Інокуляція *B. japonicum* штам УМК В-6035

Без інокуляції

Рис. 3. Ультраструктура хлоропластів клітин мезофілу сої: КО — клітинна оболонка, В — вакуоль, М — мітохондрія, ТГ — тилакоїди гран, ТС — тилакоїди строми, КЗ — крохмальне зерно, стрілками вказані пластоглобули

строми достовірно збільшився, що передбачає збільшення складових елементів цих фотомембран.

Відповідно до уявлень, розвинених у 80-х роках минулого сторіччя [12], в тилакоїдах строми локалізовані головним чином комплекси фотосистеми I (ФСІ), тоді як в тилакоїдах гран — пігмент-білкові комплекси фотосистеми II (ФСІІ) і головного світлозбирального комплексу [12]. Базуючись на електростатичній теорії Барбера, зазначимо, що в мембранах гран розташовуються пігмент-білкові комплекси ФСІІ і світлозбиральний комплекс хлорофілів *a/b*, а також пов'язаний із ФСІІ комплекс виділення кисню. В тилакоїдах строми містяться пігмент-білкові комплекси ФСІ і не пігментовані супрамолекулярні мембранні комплекси: АТФазний і цит *b/f* білкові комплекси, а також ряд білків, що входять до електронно-транспортного ланцюга, і пов'язані із функціонуванням ФСІ.

Виходячи з цих положень, можна сказати, що виявлене нами збільшення парціальних об'ємів тилакоїдів гран і тилакоїдів строми передусім може бути наслідком збільшення за експериментальних умов біосинтезу поліфункціональних компонентів фотомембран, що залучаються в систему перебудов фотосинтетичного апарату, пов'язаних із енергетичними взаємовідносинами макро- і мікросимбіонта, які регулюються на рівні генної експресії [2, 12], фітогормональної регуляції [2, 11] та обміну вторинних метаболітів [2].

Зіставлення ультраструктурних характеристик фотомембран хлоропластів із спектрометричними вимірюваннями головних пігментів листка дає можливість отримати фактичний матеріал і розширити наші уявлення про розподіл головних пігмент-білкових комплексів по різних ділянках тилакоїдів [12]. У роботі [5] показано, що надлишок синтезу пігмент-білкових комплексів акумулюється в пластоглобулах хлоропластів. За нашими даними (див. табл. 3), об'єм пластоглобул рослин без інокуляції збільшувався порівняно з таким інокульованих рослин, що є ознакою старіння хлоропластів [5].

Характеристики фотосинтетичних пігментів визначали за оптичними властивостями листка, використовуючи методики аналізу спектрів відбиття–поглинання [4, 10], що дає можливість реєструвати на різних довжинах хвиль відбиття пігментів спектрів хлорофілів. У варіанті інокульованої сої зареєстровано зростання кривої спектра і збільшення показника хлорофілу *a* на 18,5%, а хлорофілу *b* — на 14,2% (рис. 4).

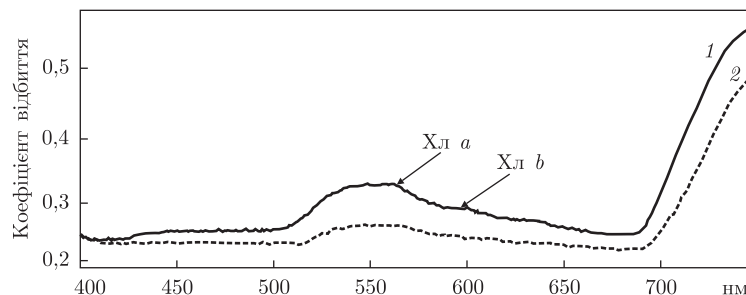


Рис. 4. Спектри відбиття поверхні листової пластинки рослин сої. 1 — інокуляція *B. japonicum* штаму УМК В-6035, 2 — без інокуляції. Стрілками показано піки проявлення хлорофілів

Таким чином, нами встановлено зростання чисельності мікрофлори на поверхні кореня і в ризосфері сої, інокульованої *B. japonicum* УМК В-6035. Морфологічна пластичність мезофілу листків інокульованих рослин виявлялася у збільшенні таких показників, як: ширина мезофілу, площа клітин мезофілу, коефіцієнт палісадності, частка хлоропластів від загальної площі мезофілу та об'єму фотомембран, що підтверджувалося підвищенням піків хлорофілів у спектрограмах поглинання-відбиття.

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. Коць С. Я., Маліченко С. М., Кругова О. Д. та ін. Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом. — Київ: Логос, 2001. — 271 с.
3. Коць С. Я., Береговенко С. К., Кириченко Н. В., Мельникова Н. Н. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов. — Киев: Наук. думка, 2007. — 314 с.
4. Zang H., Prithviraj B., Souleimanov A. et al. The effect of temperature and genistein concentration on lipo-chitoooligosaccharide (LCO) production by wild-type and mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum* // Soil Biol. and Biochem. — 2002. — **34**. — P. 1175–1180.
5. 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.
6. Rawsthorne E. S., Minchin F. R., Summerfield R. J. Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules // Phytochemistry. — 1980. — **19**. — P. 341–355.
7. Береговенко С. К. Інтенсивність фотосинтетичних процесів різних сортів сої залежно від інокуляції ефективними штамами *Bradyrhizobium japonicum* // Наук. зап. Тернопіль. пед. ун-ту ім. Володимира Гнатюка. Сер. Біологія. — 2003. — **2**, № 21. — С. 19–23.
8. Луцки А. Д., Дедюк Е. С., Луцкий М. Д. Лектины в гистохимии. — Львов: Выща шк., 1989. — 144 с.
9. Begna S. H., Dwyer D., Cloutier L. et al. Decoupling of light intensity effects on the growth (biomass increase) and development of C3 and C4 weed // J. Exp. Bot. — 2002. — **53**. — P. 1935–1940.
10. 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 Sens. Environ. — 2004. — **92**. — P. 207–217.
11. Иутинская Г. А., Пономаренко С. П., Андреюк Е. И. и др. Биорегуляция микробно-растительных систем / Под общей ред. Г. А. Иутинской, С. П. Пономаренко. — Киев: Ничлава, 2010. — 464 с.
12. Кочубей С. М. Организация фотосинтетического аппарата высших растений. — Киев: Альтерпрес, 2001. — 204 с.

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ
Інститут космічних досліджень НАН України
та Державного космічного агентства України, Київ

Надійшло до редакції 16.08.2013

Н. И. Адамчук-Чалая, В. А. Яценко,
член-корреспондент НАН Украины Г. А. Иутинская

Влияние инокуляции *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 на фотосинтетический аппарат сои

Исследовали архитектуру микробного ценоза корневой зоны инокулированной клубеньковыми бактериями трансгенной сои, выращенной в полевых условиях при параллельном мониторинге морфофункционального состояния фотосинтетического аппарата растений методами электронной микроскопии и дистанционной спектрофотометрии. Выявлено увеличение количества бактерий на поверхности главного корня и в ризосфере инокулированной сои по сравнению с растениями без бактериализации. Морфометрические исследования палисадного мезофилла инокулированных растений выявили статистически значимое увеличение ширины мезофилла, площади клеток мезофилла, коэффициента палисадности, коэффициента пластичности, доли хлоропластов от общей площади мезофилла сравнительно с неинокулированными. Морфологические изменения развития фотомембран подтверждались спектрометрическими измерениями главных пигментов пластинки листа.

N. I. Adamchuk-Chala, V. A. Yacenko,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine G. O. Iutynska

Influence of *Bradyrhizobium japonicum* UKM B-6035 inoculation on the soybean photosynthetic apparatus

The architectonics of microcenosis of field-grown transgenic soybean plants inoculated by nodule bacteria with parallel monitoring of the morphology and the functional organization of a plant photosynthetic apparatus by methods of electron microscopy and remote spectrophotometry is investigated. The increase of the bacteria number on the surface of main root and rhizosphere is determined in inoculated soybean plants. The palisade mesophyll morphometric investigation has confirmed the statistically essential increase of the mesophyll width the area of mesophyll cells, coefficient of palisade, coefficient of plasticity, and a part of cloroplasts in the summary mesophyll are in comparison with those of uninoculated plants. Morphological changes in photomembrane development are confirmed in spectrophotometrical estimations of main pigments in a leaf blade.