

УДК 581.557:582.739

## ВПЛИВ КЛІНОСТАТУВАННЯ НА СИМБІОЗ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ З РИЗОБІЯМИ

А.В. ВІТЕР,<sup>1</sup> В.А. ДОБРОСКОК,<sup>1</sup> С.М. МАЛІЧЕНКО,<sup>2</sup> П.М. МАМЕНКО,<sup>2</sup> І.Г. ХОХЛОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка Національної академії наук України  
01014 Київ, вул. Тимірязєвська, 1

<sup>2</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Досліджували вплив кліностатування на формування й функціонування симбіотичної системи люцерна посівна—*Sinorhizobium meliloti*. В умовах імітованої мікрогравітації протягом 48 діб після появи сходів ця система розвивалась і функціонувала без значних відхилень. Встановлено, що початкове пригнічення показників довжини міжвузлів, маси сухої речовини пагонів та азотфіксувальної активності в 28-добових рослин за умов кліностатування змінилося зростанням цих показників упродовж наступних 20 діб. Висловлено припущення, що інокуляція позитивно впливає на ріст і розвиток люцерни за умов кліностатування.

*Ключові слова:* *Medicago sativa* L., *Sinorhizobium meliloti*, адаптація, азотфіксація, кліностатування.

Відомо, що симбіотичні системи здатні розширювати або змінювати в потрібний бік діапазони витривалості симбіонтів до різних чинників зовнішнього середовища [10]. Найповніше вивченими симбіозами за участю вищих рослин є арбускулярна мікориза і бобово-ризобіальні системи [5, 8, 9, 13]. Вони цікаві тим, що приводять не тільки до істотних структурних і функціональних перебудов окремих ділянок кореня, а й до змін фізіологічного й алелопатичного станів макросимбіонта загалом [3, 4, 13, 14].

Зміну впливу сили тяжіння на організми, у тім числі й на рослини, розглядають як один із фізичних стресорів, що спричинює низку специфічних і неспецифічних відповідей — структурних і функціональних змін. Зміни в роботі геному викликають відхилення в розвитку окремих клітин і цілого рослинного організму [15]. Дані, отримані в гравітаційно-біологічних дослідженнях, далеко не завжди дають підстави для узагальнень щодо ролі гравітаційного чинника в розвитку рослин. Саме тому ми вважаємо, що залучення в дослідження якомога більшої кількості таксономічних і екологічних груп видів дасть змогу вдосконалити теорію гравітаційної біології.

На сьогодні проведено чимало досліджень із вивчення впливу мікрогравітації на прокариотів [11], деякі модельні види грибів, представників численних відділів рослин, але переважно на тих, які належать до кількох найпоширеніших родин покритонасінних [2]. А от відомості щодо представників родини бобових майже відсутні.

Метою наших досліджень було з'ясування дії кліностакування на формування і функціонування симбіозу люцерни посівної з високоефективним штамом ризобій.

### Методика

Експерименти проводили з люцерною посівною (*Medicago sativa* L.) сорту Ярославна (насіння із селекційного розсадника Національного наукового центру «Інститут землеробства НААН України») та бульбочковими бактеріями *Sinorhizobium meliloti* штаму 441 із музейної колекції ІФРГ НАН України.

Насіння стерилізували протягом 30 хв у 70 %-му етанолі, 3—4 рази промивали стерильною водою, пророщували упродовж 2 діб у термостаті за 24—26 °С й інокулювали суспензією 7-добової бактеріальної культури, закладаючи одночасно варіанти з неінокульованим пророщеним насінням. Відкаліброване пророщене насіння розкладали по 25 у скляні контейнери, заповнені базальтовим волокном марки «Grodan» (Нідерланди), на глибину 1 см і вміщували їх ще на 2 доби у термостат — до появи сходів. Протягом наступної доби проростки адаптували до умов кліноставної кімнати (за цей час сім'ядольні листки етіюльованих проростків зеленіли). Половину контейнерів з неінокульованими й інокульованими рослинами люцерни залишали в умовах нерухомого контролю (стаціонару), решту — встановлювали на кліностати (обертання навколо двох осей з частотами 0,11 і 0,48 об/хв). Рівень освітлення становив близько 2,5 клк, температура — 22—25 °С, тривалість кліностакування — 47 діб. Під час висівання насіння й вирощування рослин їх поливали безазотним поживним середовищем [12], періодично доводячи вологість мінерального субстрату до 60 % за масою.

Рослинний матеріал аналізували в такі строки (після появи сходів/після встановлення на кліноста): 15/14 діб (поява двох справжніх листків на більшості рослин), 28/27 (поява візуальних відмін між рослинами, необробленими й обробленими бульбочковими бактеріями), 48/47 (кінцевий термін для спостереження за рослинами в умовах кліноставної кімнати). Визначали розміри пагонів, масу рослин, азотфіксувальну активність і вміст нуклеїнових кислот у листках, проводили облік кореневих бульбочок.

Азотфіксувальну активність рослин визначали ацетиленовим методом [14]. Рослини вміщували у скляні флакони об'ємом 75 см<sup>3</sup>, що герметично закривались, і створювали в них 10 %-ву концентрацію ацетилену. Після 24-годинної інкубації газову суміш аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6850 з полуменево-іонізаційним детектором. Газ розділяли на колонці (0,40 × 130 см) із Pagarac N за температури 80 °С. Газоносієм був гелій (20 мл/хв). Об'єм аналізованої проби газової суміші становив 1 см<sup>3</sup>, стандартом слугував чистий етилен.

Для визначення вмісту ДНК й РНК у листках їх фіксували рідким азотом. Нуклеїнові кислоти екстрагували методом жорсткого хімічного гідролізу. Гідролізати нуклеїнових кислот відокремлювали центрифугуванням (8000 об/хв) протягом 30 хв. Вміст нуклеїнових кислот у надосадковій рідині вимірювали на спектрофотометрі СФ-26. Препарати нуклеїнових кислот зі зразків виділяли, як описано у працях [6, 7].

Вміст фотосинтетичних пігментів у листках люцерни визначали за методом Вельбурна [17] (екстинкцію вимірювали на спектрофотометрі Spokol 11).

Біологічна повторність досліду 4-разова, аналітична 3-разова. Для статистичної обробки даних використовували програмний додаток Microsoft Excel.

### Результати та обговорення

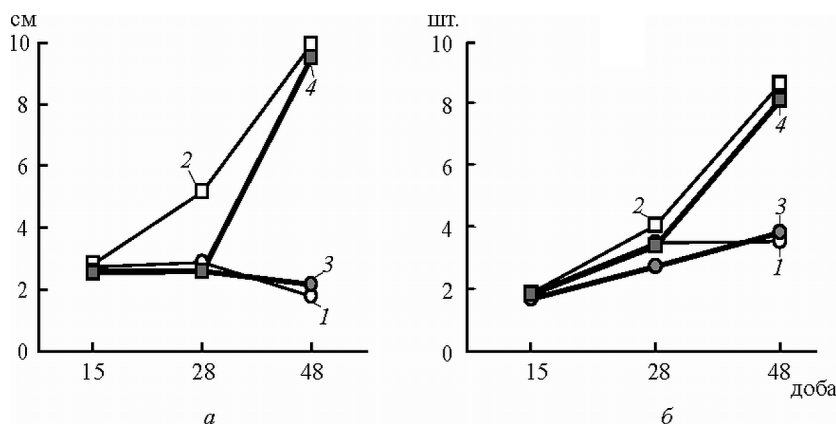
У попередніх дослідах ми встановили, що на відміну від сої (*Glycine max* (L.) Merr.) люцерна посівна (*Medicago sativa* L.) задовільно витримувала тривале кліноостатування (близько 150 діб) навіть без належного забезпечення мінеральними речовинами, хоча за цих умов росла слабо. Це можна пояснити кращими механічними властивостями стебла люцерни і здатністю до регенерації. До того ж ми переконалися, що дія імітованої мікрогравітації протягом 20 діб не заважала розвитку в чашках Петрі колоній кількох видів азотфіксувальних бактерій, зокрема *Sinorhizobium meliloti* штаму 441 [1]. В одному з наших дослідів люцерна посівна з інокульованих проростків у кліноостатованих пробірках на агаро-перлітній суміші росла понад 100 діб, не поступаючись при цьому стаціонарному контролю. Щоправда рослини формували не більш як 8 справжніх листків і були 14 см заввишки. Ці факти спонукали нас до ґрунтовнішого вивчення азотфіксувального симбіозу люцерни за дії тривалого кліноостатування.

Важливими показниками росту люцерни є довжина стебла і міжвузлів, а розвитку — кількість справжніх листків та формування на рослинах бічних гілок. На початку вегетації (15 діб після появи сходів) відмін у габітусі рослин різних варіантів експерименту не виявлено. У 28-добових рослин за стаціонарних умов з інокуляцією середня довжина стебла була на 79—102 % більшою. Середня кількість справжніх листків на рослину збільшувалась у такому порядку: неінокульовані кліноостатовані ( $2,71 \pm 0,50$ ) — неінокульовані контрольні ( $3,31 \pm 0,68$ ) — інокульовані кліноостатовані ( $3,37 \pm 0,58$ ) — інокульовані контрольні ( $4,05 \pm 0,05$ ) рослини. Через 48 діб після появи сходів стебла бактеризованих рослин були набагато довшими порівняно з необробленими: в контролі — в 5,6, на кліноостаті — в 4,5 рази. Аналогічна закономірність спостерігалась і щодо кількості справжніх листків: цей показник був вищим відповідно в 2,1 і 2,4 рази. Не зафіксовано також істотних відмін зазначених показників як у небактеризованих, так і бактеризованих рослин між варіантами стаціонару і кліноостатування (рисунок).

За результатами аналізу (таблиця) виявлено, що від 28- до 48-ї доби після появи сходів більшість параметрів розвитку рослин люцерни змінювалась. Так, в усіх варіантах зменшувався вміст фотосинтетичних пігментів за винятком хлорофілів *a* і *b* в рослинах люцерни, вирощених із обробленого ризобіями насіння за стаціонарних умов. В інокульованих рослин стаціонару зменшувалось співвідношення між масою абсолютно сухої речовини надземних частин і коренів. Спостерігалася тенденція до зниження відношення сумарного вмісту хлорофілів *a* і *b* до каротиноїдів у стаціонарі без обробки насіння бактеріями, а також довжини міжвузлів неінокульованих рослин усіх варіантів.

Кліноостатування призводило до зменшення кількості бульбочок у 28-добових небактеризованих рослин, які спонтанно заражувались ризобіями (на 62 %), у них збільшувалось співвідношення між масами сухих речовин пагонів і коренів (в 1,65 рази), вміст каротиноїдів (на 44 %) та РНК (на 8 %) у листках порівняно з контролем. У разі інокуляції про-

ВЛИЯНИЕ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ НА СИМБИОЗ



Динаміка розвитку рослин люцерни:

*a* — висота рослин, см; *b* — кількість справжніх листків (шт.); 1, 2 — контроль відповідно без інокуляції та з інокуляцією; 3, 4 — кліностакування відповідно без інокуляції та з інокуляцією

прощеного насіння в цей період за кліностакування підвищувався лише вміст РНК у листках (на 14 %), решта ж показників залишалися незмінними або ж знижувались: довжина міжвузлів та маса абсолютно сухої речовини пагонів — на 40 %, вміст РНК в листках — на 5, ДНК і хлорофілу *a* — на 14, співвідношення вмісту хлорофілів *a* і *b* — на 9 %.

Через 48 діб після появи сходів в умовах імітованої мікрогравітації ми виявили зниження в листках рослин, інокульованих *S. meliloti*, вмісту хлорофілу *a* (на 26 %), каротиноїдів (на 29 %), підвищення вмісту хлорофілів *a* (на 97 %) і *b* (на 106 %) у варіанті без інокуляції та збільшення кількості бульбочок на бактеризованих коренях (на 104 %). Співвідношення мас сухої речовини надземних частин і коренів під дією кліностакування збільшувалось у 2,2 раза незалежно від обробки пророщеного насіння ризобіями, вмісту суми хлорофілів *a+b* й каротиноїдів у неінокульованих рослин — на 147, в інокульованих — на 74 %.

Слід наголосити, що за імітації мікрогравітації у 28-добових (після появи сходів) рослин ацетиленвідновлювальна активність була у 3,3 раза нижчою, а в 48-добових, навпаки — в 1,4 раза вищою порівняно з контролем. Це дає підстави вважати, що кліностакування істотно пригнічує формування симбіотичної системи протягом першого місяця вегетації; в наступні дві декади відбувається адаптація корневих бульбочок й азотфіксувальна активність посилюється.

Обробка пророщеного насіння суспензією *S. meliloti* штаму 441 позитивно впливала на більшість показників росту і розвитку люцерни незалежно від того, піддавалися чи не піддавалися рослини кліноставанню. Здебільшого ефект стимулювання виявлявся вже через 1 міс після посіву і ставав візуально помітним до кінця 4-ї декади вирощування рослин. Втім зафіксовано й окремі винятки: листки інокульованих 28-добових (після появи сходів) рослин містили значно менше ДНК (у контролі — на 26, на кліностаті — на 33 %) і каротиноїдів (на кліностаті — на 37 %). Підвищення вмісту РНК/ДНК може свідчити про активацію експресії геному рослин за умов кліностакування. Співвідношення вмісту хлорофілів *a* і *b* в листках кліностатованих рослин за обробки ризобіями було на 19 % нижчим, ніж без неї.

Отже, експериментально доведено, що в разі симбіотрофного азотного живлення можлива доволі тривала вегетація люцерни посівної за

| Показник  | Через 28 дб після появи сходів |                  |               |                  | Через 48 дб після появи сходів |                  |               |                  |
|---|--------------------------------|------------------|---------------|------------------|--------------------------------|------------------|---------------|------------------|
|   | Без інюкуляції                 |                  | З інюкуляцією |                  | Без інюкуляції                 |                  | З інюкуляцією |                  |
|   | Контроль                       | Кліноста-тування | Контроль      | Кліноста-тування | Контроль                       | Кліноста-тування | Контроль      | Кліноста-тування |
| Середня довжина міжвузлів, см                             | 0,59±0,12                      | 0,66±0,13        | 0,98±0,11     | 0,59±0,17        | 0,37±0,12                      | 0,42±0,16        | 1,05±0,15     | 1,04±0,13        |
| Маса сухої речовини, мг                                   |                                |                  |               |                  |                                |                  |               |                  |
| пагона  | 3,69±0,97                      | 3,07±0,01        | 7,36±1,00     | 4,43±1,42        | 5,28±1,03                      | 5,67±2,10        | 29,22±2,69    | 30,40±4,02       |
| коренів рослини   | 1,42±0,85                      | 0,66±0,09        | 0,92±0,28     | 1,04±0,25        | 2,47±1,06                      | 2,33±1,09        | 6,22±0,34     | 4,96±1,57        |
| Відношення мас сухої речовини пагонів і коренів           | 3,0±0,5                        | 5,0±0,1          | 8,2±1,5       | 4,5±2,2          | 2,1±0,5                        | 4,7±0,6          | 2,5±0,4       | 5,5±1,3          |
| Середня кількість бульбочок на рослині                    | 1,10±0,23                      | 0,41±0,10        | 1,62±0,20     | 2,13±0,32        | 0,41±0,10                      | 0,60±0,12        | 1,40±0,42     | 2,86±0,59        |
| Апетитивні/відновальна активність, нмоль/(рослина год)    | 0                              | 0,01             | 1,23±0,27     | 0,37±0,14        | 0                              | 0,01             | 1,23±0,13     | 1,77±0,16        |
| Загальний вміст у листках, мкг/г сухої речовини           |                                |                  |               |                  |                                |                  |               |                  |
| ДНК   | 481,1±42,1                     | 457,2±7,8        | 355,0±36,2    | 305,4±6,5        | —                              | —                | —             | —                |
| РНК   | 1419,2±59,5                    | 1537,9±19,6      | 2156,3±46,8   | 2052,1±32,7      | —                              | —                | —             | —                |
| Співвідношення вмісту РНК і ДНК у листках                 | 2,95±0,38                      | 3,36±0,10        | 6,07±0,75     | 6,72±0,25        | —                              | —                | —             | —                |
| Вміст у листках, мг/г сухої речовини                      |                                |                  |               |                  |                                |                  |               |                  |
| хлорофілу <i>a</i>  | 7,7±1,3                        | 8,6±1,0          | 10,7±1,2      | 9,2±1,0          | 2,6±0,8                        | 5,2±1,9          | 9,6±1,4       | 7,1±0,9          |
| хлорофілу <i>b</i>  | 5,1±0,9                        | 6,3±1,3          | 6,9±0,5       | 6,5±0,6          | 1,5±0,6                        | 3,1±0,2          | 6,4±2,7       | 5,3±1,2          |
| каротиноїдів  | 0,7±0,3                        | 1,1±0,1          | 0,8±0,2       | 0,7±0,2          | 0,3±0,1                        | 0,4±0,2          | 0,6±0,2       | 0,4±0,2          |
| Співвідношення хлорофілів <i>a:b</i>                      | 1,5±0,04                       | 1,4±0,11         | 1,6±0,06      | 1,4±0,06         | 1,8±0,27                       | 1,7±0,11         | 1,6±0,50      | 1,4±0,23         |
| Відношення суми хлорофілів ( <i>a+b</i> ) до каротиноїдів | 16,5±4,8                       | 12,9±3,3         | 15,3±5,0      | 14,0±2,4         | 5,3±0,6                        | 13,1±6,4         | 17,9±5,7      | 31,0±11,1        |

впливу імітованої мікрогравітації. Без інокуляції пророщеного насіння ефективним штамом бульбочкових бактерій стан рослин від 15- до 48-ї доби після появи сходів погіршувався. Виявлено, що на початку вирощування кліностакування може дещо пригнічувати морфологічні й біохімічні показники рослин люцерни посівної. В окремих випадках індукований розвиток кореневих бульбочок супроводжується відносно сильнішою депресією порівняно з варіантом без кліностакування. Очевидно, це пов'язано з певною затратою енергетичних ресурсів, необхідних для формування симбіозу. Пізніше (через 48 діб після появи сходів) відмінності між кліностакованими й некліностакованими рослинами в багатьох випадках зменшуються. Можна припустити, що у віці 1 міс і більше симбіотична система бобова рослина—ризобії бере участь в адаптаційних процесах у відповідь на дію кліностакування. Виконані дослідження дають підстави стверджувати доцільність використання ефективних штамів *S. meliloti* як засобу забезпечення живлення люцерни азотом за мікрогравітаційних умов.

1. Вітер А.В., Еланська Н.Е., Хохлова І.Г., Юношева О.П. Вплив факторів кліностакування на ріст колоній азотфіксувальних мікроорганізмів // Наук. вісн. НУБіП. — 2009. — **140**. — С. 47—54.
2. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Белявская Н.А. и др. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии. — М.: Наука, 1994. — 294 с.
3. Коць С.Я., Береговенко С.К., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов. — Киев: Наук. думка, 2007. — 316 с.
4. Кругова Е.Д. Специфические стратегии клубеньковых и фитопатогенных бактерий при инфицировании растений // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 1. — С. 3—15.
5. Лабутова Н.М. Взаимоотношение эндомикоризных грибов с микроорганизмами ризосферы // Микология и фитопатология. — 2009. — **43**, № 1. — С. 3—19.
6. Мартыненко Е.И., Кириченко Т.К., Алхимова Е.Г. Метод выделения ДНК из растений // Доп. НАН України. — 2004. — № 7. — С. 171—174.
7. Мартыненко О.І., Кириченко Т.К., Бруйка О.П., Алхимова О.Г. Спосіб одержання ДНК у біологічних об'єктів // Деклараційний патент на корисну модель. — 2006. — Бюл. № 7.
8. Мильто Н.И. Клубеньковые бактерии и продуктивность бобовых растений. — Минск: Наука и техника, 1982. — 296 с.
9. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. — М.: Наука, 1973. — 288 с.
10. Одум Ю. Основы экологии / Пер. с англ. — М.: Мир, 1975. — 741 с.
11. Попова А.Ф. Гравічутливість одноклітинних організмів: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — Київ, 2000. — 39 с.
12. Шильникова В.К., Нестерова Н.М. Влияние кислотности среды на процесс инфицирования клевера клубеньковыми бактериями // Изв. АН СССР. Сер. биологическая. — 1969. — № 3. — С. 445—448.
13. Field B., Jordan F., Osbourn A. First encounters — deployment of defence-related natural products by plants // New Phytol. — 2006. — **172**, N 2. — P. 193—207.
14. Hardy R.W.F., Holston R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. — 1968. — **43**, N 8. — P. 1185—1207.
15. Kordyum E.L. Plant cells in microgravity and under clinostating // Intern. Rev. in Cytol. — 1997. — **171**. — P. 1—78.
16. *Rhizobiaceae*: молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайка, А. Кондорози, П. Хукаса / Пер. с англ. — СПб, 2002. — 567 с.
17. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions // J. Plant Physiol. — 1994. — **144**, N 3. — P. 307—313.

Отримано 24.09.2010

ВЛИЯНИЕ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ НА СИМБИОЗ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ  
С РИЗОБИЯМИ

А.В. Витер,<sup>1</sup> В.А. Доброскок,<sup>1</sup> С.М. Маличенко,<sup>2</sup> П.Н. Маменко,<sup>2</sup> И.Г. Хохлова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовали влияние клиноротирования на формирование и функционирование симбиотической системы люцерна посевная — *Sinorhizobium meliloti*. В условиях имитированной микрогравитации на протяжении 48 сут после появления всходов эта система развивалась и функционировала без значительных отклонений. Установлено, что начальное угнетение показателей длины междоузлий, массы сухого вещества побегов и азотфиксирующей активности у 28-суточных растений при клиноротировании сменилось возрастанием этих показателей на протяжении следующих 20 сут. Высказано предположение о положительном влиянии инокуляции на рост и развитие люцерны в условиях клиноротирования.

EFFECT OF CLINOROTATION ON SYMBIOSIS OF ALFALFA AND RHIZOBIA

A.V. Viter,<sup>1</sup> V.A. Dobroskok,<sup>1</sup> S.M. Malichenko,<sup>2</sup> P.M. Mamenko,<sup>2</sup> I.G. Khokhlova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>M.M. Gryshko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine  
1 Tymiryazevska St., Kyiv, 01014, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Effect of clinorotation on forming and functioning of symbiotic system *Medicago sativa* L. — *Sinorhizobium meliloti* was investigated. This system developed and functioned without considerable deviations under simulated microgravity during 48 days after sprouting. Initial depression of internodes length, shoot dry weight and nitrogen-fixing ability in 28-day plants under clinorotation replaced with increase of these parameters in following 20 days. Inoculation impact on growth and development of clinorotated alfalfa is suggested being favourable.

*Key words:* *Medicago sativa* L., *Sinorhizobium meliloti*, adaptation, nitrogen fixation, clinorotation.