

## ЯВИЩЕ ПАРАНОДУЛЯЦІЇ НА КОРЕНЯХ ШОВКОВИЦІ

Гончар Ю.О., Надкернична О.В., Волкова І.В.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН  
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна

*Показана можливість штучного індукування парабутьбочок на коренях рослин шовковиці з використанням абіогенного фактора нодуляції – 2,4-дихлорофеноксіяцетату (2,4-Д). Одночасна обробка проростків шовковиці *Azospirillum brasilense* 54 і 2,4-Д сприяла утворенню більшої кількості парабутьбочок та підвищенню їх нітрогеназної активності у 17,2 рази порівняно з результатами обробки тільки 2,4-Д. При цьому підвищуються біометричні показники рослин. Здатність азоспірил заселяти парабутьбочки, що утворилися на коренях шовковиці під впливом 2,4-Д, показана за допомогою стійких до стрептоміцину мутантів та імунологічних методів.*

Ключові слова: *парабутьбочки, *Azospirillum brasilense* 54, 2,4-дихлорофеноксіяцетат, проростки шовковиці.*

Відомо, що бутьбочки на коренях небобових рослин утворюються у низки культур: вільхи, обліпихи, восковника, колетії, коріарії, цеанотуса, лоха, ячменю, кукурудзи, куничника, осоки, підмаренника. Згадані бутьбочкоподібні структури виникають під впливом як біогенних [1-3], так і абіогенних [4-6] факторів нодуляції. На коренях вільхи, обліпихи, коріарії, казуарини, восковника під впливом біогенних факторів нодуляції – актиноміцетів роду *Frankia* утворюються своєрідні вирости, які отримали назву актиноризних бутьбочок [7, 8]. Біогенними факторами нодуляції куничника, осоки, підмаренника є бактеріальні асоціації [9, 10]. Показано, що бутьбочки з високою нітрогеназною активністю утворюються на коренях моркви під впливом біогенного фактора нодуляції – азотфіксувальних бактерій роду *Azospirillum* [2]. Мікроорганізми, здатні проникати в корені рослин і утворювати бутьбочкоподібні структури, як правило, адсорбуються на поверхні коренів рослин, синтезують гормоноподібні речовини і ферменти, які руйнують клітинну стінку рослини, а також проникають у внутрішні тканини кортикальної паренхіми, розповсюджуються по системі міжклітинників [11, 12].

Абіогенні фактори нодуляції (ауксини, літичні ферменти, 2,4-дихлорофеноксіоцтова кислота та її похідні) спричиняють утворення так званих парабульбочок [13, 14]. Показано, зокрема, що парабульбочки можуть утворюватись на коренях ячменю і кукурудзи під впливом 2,4-дихлорофеноксиацетату [4].

Штучне індукування на коренях небобових культур парабульбочок часто супроводжується проникненням у дані структури ендofітних мікроорганізмів, значна частина яких – це патогенні мікроорганізми [15]. Для підвищення продуктивності сільськогосподарських культур робляться спроби штучно індукувати парабульбочки, одночасно заселяючи їх азотфіксувальними бактеріями. Досліджено штучне утворення псевдобульбочок на коренях капусти і рапсу під дією різноманітних нодулюючих агентів за одночасної інокуляції азотфіксувальними мікроорганізмами [1, 6].

Мета нашої роботи – штучно індукувати утворення бульбочок на коренях рослин шовковиці та заселити їх активними штамми діазотрофів.

**Матеріали і методи.** Явище паранодуляції вивчали лабораторними методами. Стерильні життєздатні проростки шовковиці, вирощені в пробірках з напіврідким середовищем, обробляли 2,4-дихлорофеноксиацетатом в концентрації  $5 \times 10^{-6}$  г діючої речовини на 10 мл середовища та інокулювали азоспірилами. Вивчали це явище також в умовах вегетаційного досліду на нестерильному ґрунті. В ємності з проростками на стадії появи бокових коренів вносили 2,4-Д в концентрації  $5 \times 10^{-4}$  г діючої речовини на 1 кг ґрунту за одночасної інокуляції азоспірилами (бактеріальне навантаження –  $2-4 \times 10^5$  клітин на 1 рослину шовковиці). Структуру парабульбочок вивчали під світловим мікроскопом.

Здатність бактерій проникати у внутрішні тканини коренів шовковиці визначали за допомогою методу генетичного маркування популяцій [16]. Антибіотикостійкі мутанти отримували за методом Зібальського [17], використовуючи градієнт концентрації стрептоміцину в агарі.

Дослідження взаємодії діазотрофів з рослинами шовковиці проводили також за допомогою імунологічних методів [18, 19]. Тварин імунізували відмитою фізіологічним розчином бактеріальною суспензією, яка мала оптичну густину  $D_{660\text{nm}}=1,3$ , що відповідає концентрації  $3 \times 10^{10}$  кл/мл. Як ад'ювант використовували мантид ISA 25. Нами була запропонована модифікована схема іму-

нізації, згідно з якою отримано штамоспецифічну антисироватку з титром 1:32 в реакції преципітації і  $4 \times 10^5$  – в реакції твердофазного імуноферментного аналізу [20].

**Результати та їх обговорення.** В Інституті шовківництва УААН виявлено феномен гігантизму рослини шовковиці. Було показано незвичайні зміни в кореневій системі “гігантської” шовковиці, що характеризувалися наявністю на коренях великої кількості бульбочкоподібних утворень. Встановлено, що ці структури мають високу нітрогеназну активність [21]. З бульбочок на коренях шовковиці було виділено 5 штамів азотфіксувальних бактерій: *Agrobacterium radiobacter* 51, *A. radiobacter* C7, *Azospirillum brasilense* 53, *A. brasilense* 54 і *A. brasilense* 61.

Бактерії роду *Azospirillum* привертають увагу багатьох дослідників через здатність цих бактерій розвиватися у ризоплані та ризосфері і проникати в коркові тканини коренів [22, 23]. Нами показано, що інтродукція азоспірил в кореневу зону дорослих рослин та інокуляція ними насіння шовковиці забезпечують достовірне підвищення біометричних показників сянців і дорослих рослин шовковиці [24, 25], однак не призводять до утворення бульбочкоподібних структур.

Щоб одержати парабульбочки на коренях сянців шовковиці ми використали абіогенний агент нодуляції – 2,4-дихлорофеноксиацетат. В результаті на коренях сянців шовковиці, вирощених у пробірках на стерильному середовищі, утворилися дрібні парабульбочки (рис. 1).

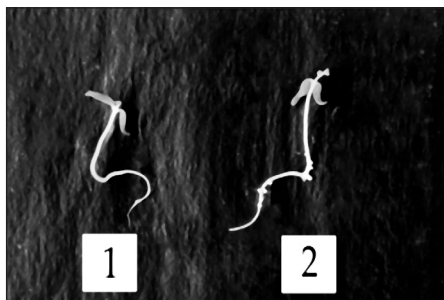


Рис. 1. Вплив 2,4-Д на проростки шовковиці  
1 – контрольна рослина, 2 – рослина шовковиці, оброблена 2,4-Д

На коренях стерильних проростків, оброблених 2,4-Д за одночасної інокуляції рослин *A. brasilense* 54, на 10 – 14 добу утво-

ривалися парабульбочки округлої форми (рис. 2), їх кількість була значно більшою, ніж за умови використання тільки 2,4-Д.

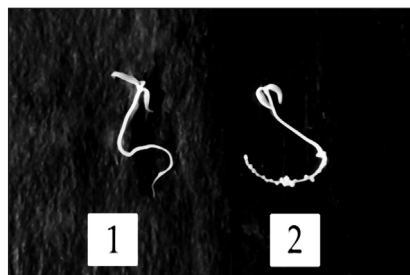


Рис. 2. Вплив 2,4-Д та інокуляції азоспірилами на проростки шовковиці

1 – контрольна рослина, 2 – рослина шовковиці, оброблена 2,4-Д за одночасної інокуляції *A. brasilense* 54

Парабульбочки діаметром 1-3 мм утворювались здебільшого нижче кореневої шийки та вздовж головного кореня, дрібніші – на нижній частині молодих коренів.

Парабульбочки діаметром 2-5 мм утворювались на кореневій системі сіянцив шовковиці в умовах вегетаційного досліді на нестерильному ґрунті (рис. 3).

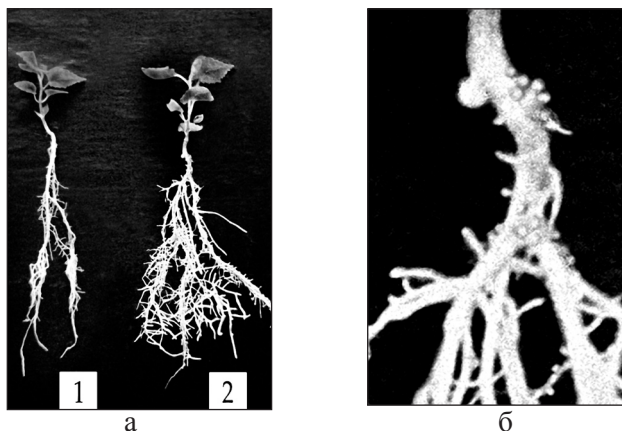


Рис. 3. Парабульбочки на корнях сіянцив шовковиці  
а: 1 – контрольна рослина, 2 – рослина шовковиці, коренева система якої була оброблена 2,4-Д за одночасної інокуляції штамом *A. brasilense* 54;

б: фрагмент кореня сіянця шовковиці з парабульбочками у збільшеному вигляді

У нестерильному ґрунті, де бактерії інокулюму конкурують з мікроорганізмами природного мікробного ценозу, до парабульбочок можуть потрапляти різні мікроорганізми. Здатність азоспірил проникати в парабульбочки шовковиці вивчали за допомогою резистентного методу, попередньо одержавши генетично марковані штами за ознакою стійкості до високих доз стрептоміцину. За культурально-морфологічними і фізіологічними ознаками стійкий до стрептоміцину штам *A. brasilense 54<sup>str</sup>* не відрізнявся від вихідного штаму. Не зазнавала змін також нітрогеназна активність мутантної культури.

Через 60 діб після інокуляції з поверхнево стерилізованого коріння були виділені реізольати *A. brasilense 54<sup>str</sup>*, що свідчить про здатність азоспірил проникати у внутрішні тканини рослин шовковиці.

Щоб підтвердити здатність досліджуваного штаму проникати в тканини коренів рослин шовковиці паралельно з методом генетичного маркування були використані імунологічні методи. Застосовуючи модифіковану нами схему імунізації кролів [20], ми отримали штамоспецифічну антисироватку з титром 1:32 в реакції преципітації і  $4 \times 10^5$  в реакції твердофазного імуоферментного аналізу, що дозволило використати її для вивчення можливості проникнення штаму *Azospirillum brasilense 54* у внутрішні тканини коренів шовковиці.

З поверхнево стерилізованих парабульбочок через 16 місяців після інокуляції було виділено 3 ізоляти. Всі вони утворювали смуги преципітації зі штамоспецифічною антисироваткою (рис. 4).

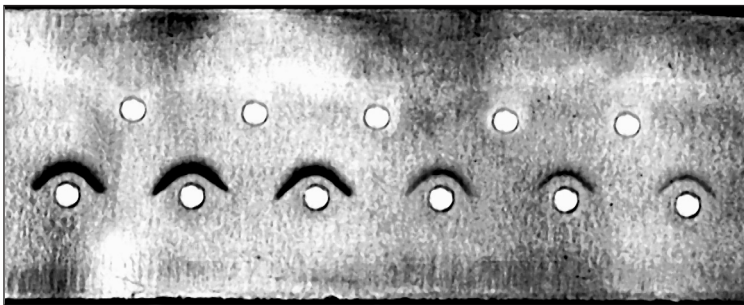


Рис. 4. Реакція подвійної імунопреципітації між сироваткою (розведення 1:16 і 1:32) та антигеном (ізолят з парабульбочок шовковиці)

Твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА) проводили на полістиролових планшетах у непрямому варіанті (табл. 1). Результати аналізу дозволяють зробити висновок, що ізоляти відповідають штаму *A. brasilense* 54. Таким чином, за використання стрептоміцинстійких мутантів, імунологічних та імунохімічних методів нами показано, що азоспірили можуть заселяти парабульбочки шовковиці, штучно утворені на коренях даної культури після обробки її 2,4-Д.

**Таблиця 1. Результати імуноферментного аналізу ізолятів бактерій, виділених з парабульбочок сіянців шовковиці**

Зразки	ТІФА	
	ОГ, 492 нм	ОГзразка/ОГ(-)*
Позитивний контроль ( <i>A. brasilense</i> 54)	2,984	4,76
Негативний контроль ( <i>A. brasilense</i> Sp7)	0,627	1,0
Ізолят №1	2,791	4,45
Ізолят №2	2,847	4,54
Ізолят №3	2,096	3,34

\* – Співвідношення оптичної густини (ОГ) досліджуваного зразка до ОГ негативного контролю.

При інтродукції досліджуваного штаму в парабульбочки, отримані за допомогою абіогенного фактора нодуляції, азотфіксувальна активність азоспірил в даних структурах зберігається не завжди. Результати визначення азотфіксувальної активності парабульбочок засвідчили, що нітрогеназна активність парабульбочок, отриманих за інокуляції рослин штамами азоспірил, значно (в 17,2 рази) перевищувала активність парабульбочок, які з'явилися на коренях сіянців внаслідок обробки їх лише 2,4-Д (табл. 2).

**Таблиця 2. Нітрогеназна активність парабульбочок на коренях сіянців шовковиці в результаті обробки кореневої системи 2,4-діхлорофеноксиацетатом і азоспірилами**

Варіанти досліджу	Нітрогеназна активність парабульбочок, мкг N на 1 рослину за годину
Обробка 2,4-Д	0,22
Обробка 2,4-Д і <i>A. brasilense</i> 54	3,79
НСР <sub>05</sub>	0,58

Інтродукція азоспірил у кореневу зону сіянців шовковиці за умов вегетаційного дослідження сприяла достовірному підвищенню всіх біометричних показників рослин. Обробка рослин 2,4-Д за одночасної інокуляції *A. brasilense* 54 забезпечила утворення бульбочок та заселення їх даним штамом. Така обробка призвела до підвищення показників маси пагонів на 51, маси листя на 63 і маси коренів на 162% порівняно з контролем (рис. 5).

Структура парабульбочок шовковиці схожа зі структурою “кореневих” бульбочок актиноризних рослин, що розвиваються з примордіїв бокових коренів і провідні пучки яких розташовані в центрі парабульбочки (рис. 6).

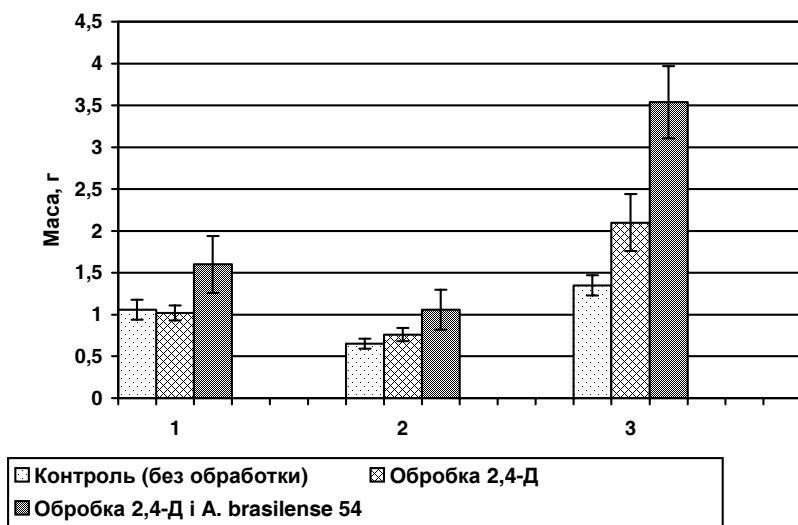


Рис. 5. Вплив обробки 2,4-Д та інокуляції азоспірилами на біометричні показники сіянців шовковиці  
1 – маса пагонів, 2 – маса листя, 3 – маса коренів

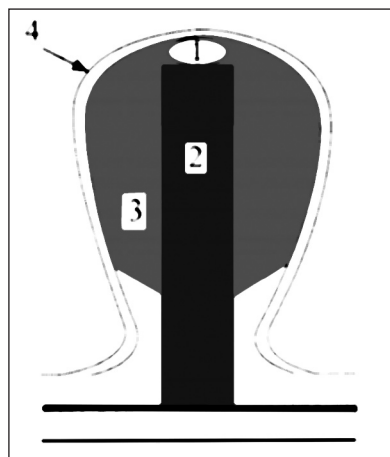


Рис. 6. Схематичне зображення структури парабульбочок шовковиці

1 – меристема; 2 – провідні пучки; 3 – паренхіма; 4 – перидерма

Таким чином, нами доведена можливість штучного індукування парабульбочок на коренях рослин шовковиці з використанням абіогенного фактора нодуляції – 2,4-діхлорофеноксиацетата. Одночасна обробка проростків *A. brasilense 54* і 2,4-Д сприяла утворенню більшої кількості парабульбочок та підвищенню їх нітрогеназної активності у 17,2 раза ніж при використанні тільки 2,4-Д. Вона сприяла також збільшенню біометричних показників рослин. Здатність азоспірил заселяти парабульбочки, що утворилися на коренях шовковиці під впливом 2,4-Д показана за допомогою стійких до стрептоміцину мутантів та імунологічних методів. Внутрішня структура парабульбочок шовковиці відповідає “кореновому” типу і найбільше подібна до структури бульбочок дерев’янистих рослин, що утворюються при інфікуванні рослин мікроорганізмами роду *Frankia*.

1. Ковальская Н.Ю., Лобакова Е.С., Умаров М.М. Формирование искусственного азотфиксирующего симбиоза у растеный рапса (*Brassica Napus Var. Napus*) в нестерильной почве // Микробиология. – 2001. – Т. 70, №5. – С. 701-708.

2. Надкерничная Е.В., Мамчур А.Е., Лохова В.И. Образование клубеньков на корнях моркови, инокулированной азоспириллами //



Микробиол. журн. – 1989. – Т. 51, №5. – С. 11-16.

3. Hu Xiaojia, Zhang Xuejiang, Cocking Edward C. et al. Yingyong shengtai xuebao // Chin. J. Appl. Ecol. – 1999. – Vol.10, № 1. – P. 127-128.

4. Krol M.J., Kobus J., Fuk B. Wiazanie azotu w parabrodawkach korzeni zbоз przez *Azospirillum lip.* i *Acin.* – like // Zezz. Nauk. Pol. / AR Szczecinie. – 1997. – № 68. – С. 153-161.

5. Nie Y.F. Nitrogen fixation in 2,4-D forced associative wheat-diazotroph system. // Int. Workshop Assoc. Interactions Nitrogen-Fix. Bact. Plants. (Saratov, June 5-8, 1995): Abstr. – Saratov, 1995. – P. 32-34.

6. Glagoleva O.B., Kovalskaya N.U., Umarov M.M. Nodule – like structures formation by nitrogen-fixing *Pseudomonas caryophylli* strain on rape roots // Int. Workshop Assoc. Interactions Nitrogen-Fix. Bact. Plants. (Saratov, June 5-8, 1995): Abstr. – Saratov, 1995. – P. 18.

7. Майстренко Г.Г. Симбиоз у небобовых древесных растений на примере облепихи // Структурные и функциональные связи высших растений и микроорганизмов. – М.: Наука, 1977. – С. 17-55.

8. Burgess D., Peterson R.I. Development of alnus japonica root nodules after inoculation with *Frankia* strain HFPArl<sub>3</sub> // Can. J. Bot. – 1987 – Vol.65, № 8. – P. 1647-1657.

9. Родынюк И.С., Клевенская И.Л. Симбиотическая фиксация азота травянистыми растениями Сибири. // Проблемы сибирского почвоведения. – 1977. – С. 200-213.

10. Родынюк И.С., Клевенская И.Л. Азотфиксирующие системы с участием клубеньковых бактерий небобовых растений. // Тез. докл. VI съезда Всесоюз. микробиол. о-ва. – Рига, 1980. – Т.5. – С. 47-48.

11. Емцев В.Т., Чумаков М.И. Критерии ассоциативности для бактерий, находящихся в diazotрофном биоценозе с небобовыми растениями. // Микробиол. журн. – 1988. – Т. 50, № 3. – С. 93-102.

12. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация: проблемы и перспективы // Бюл. ВНИИСХМ. – 1985. – №42. – С. 9-13.

13. Sekar C., Pasad N.N., Sundaram M.D. Enhancement of polygalacturonase activity during auxin induced para nodulation and endorhizosphere colonization of *Azospirillum* in rice root. // Indian J. Exp. Biol. – 2000. – Vol. 38, № 1. – P. 80-83.

14. Patnaik G.K., Kanungo P.K., Rajaramamohan Rao V.

Interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid with nitrogen fixing bacterial populations and nitrogen fixation associated with rice. // Microbiol. Res. – 1994. – Vol.149, № 3. – P. 291-295.

15. Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68, № 5. – P. 2198-2208.

16. Елементи регуляції в рослинництві: Зб. наук. пр. – К.: Компас, 1998. – 360 с.

17. Методы общей бактериологии / Ф. Герхардт, Р.Г.И. Мюррей, Р.Н. Костилоу и др.; Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – Т. 3. – 264 с.

18. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion // Acta pathol. et microbial. Scand. – 1953 – Vol.32, № 2. – P. 231-240.

19. Никитин В.М. Справочник методов иммунологии. – Кишинев: Штиинца, 1982. – 304 с.

20. Надкернична О.В., Гончар Ю.О., Волкова І.В. Імунологічні методи дослідження взаємодії азоспірил з рослинами шовковиці // X з'їзд Товариства мікробіологів України: Тези доп. – Одеса: Астропринт, 2004. – С. 245.

21. Пилипенко Б.Ф., Мальцева Н.Н., Надкерничная Е.В., Сальник В.П. Азотфиксирующие клубеньки на корнях шелковицы. // Мікробіол. журн. – 1996. – Т. 58, №5. – С. 93-95.

22. Bashan B.Y., Levanony H., Klein E. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots // J. Gen. Microbiol. – 1986. – Vol.132, № 11. – P. 3069-3073.

23. Magalhaes F.M.M., Patriquin D., Dobereiner J. Infection of field grown maize with *Azospirillum spp.* // Rev. Brazil. Biol. – 1979. – Vol.39, № 3. – P. 587-596.

24. Булатові Ю.О., Надкернична О.В., Ушакова М.А., Олексійченко Н.О. Вплив азотфіксуючих бактерій на біометричні показники сянців і гібридних насаджень шовковиці // Агро-екологічний журн. – 2003. – № 1. – С. 57-59.

25. Alekseychenko N.A., Galanova A.V., Ananyev P.P. et al. The increase of productivity of mulberry plantations as a result of using bacterial fertilizers // Sericologia. – 2004. – Vol. 44, № 3. – P. 387-392.

## **ЯВЛЕНИЕ ПАРАНОДУЛЯЦИИ НА КОРНЯХ ШЕЛКОВИЦЫ**

**Гончар Ю.А., Надкерничная Е.В., Волкова И.В.**

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

*Показана возможность искусственного индуцирования параклубеньков на корнях растений шелковицы при использовании абиогенного фактора нодуляции – 2,4-дихлорофеноксиацетата (2,4-Д). Одновременная обработка проростков *Azospirillum brasilense* 54 и 2,4-Д способствовала образованию большего числа параклубеньков и повышению их нитрогеназной активности в 17,2 раза в сравнении с результатами обработки только 2,4-Д. При этом повышаются биометрические показатели растений. Способность азоспирилл заселять параклубеньки, которые образовались на корнях шелковицы под влиянием 2,4-Д, показана с помощью устойчивых к стрептомицину мутантов и иммунологических методов.*

*Ключевые слова: параклубеньки, *Azospirillum brasilense* 54, 2,4-дихлорофеноксиацетат, проростки шелковицы.*

## **PHENOMENON OF PARANODULATION ON ROOTS OF THE MULBERRY**

**Gonchar Y.O., Nadkernichnaja O.V., Volkova I.V.**

Institute of agricultural microbiology UAAH, Chernihiv

*The opportunity of artificial formation of paranodules on roots of plants of a mulberry is shown at use of the abiological factor of a nodulation – is shown 2,4-D. Simultaneous processing of sprouts by *Azospirillum brasilense* 54 and 2,4-D promoted formation of the greater number paranodules and increase of their nitrogen-fixing activity in 17,2 times in comparison with use only 2,4-D. Thus biometric parameters of plants increase. Ability of *Azospirillum* to occupy paranodules which were formed on roots of a mulberry under influence 2,4-D is shown with the help of streptomycin steady mutants and enzyme-linked immunosorbent assay.*

*Key words: paranodules, *Azospirillum brasilense* 54, 2,4-D, sprouts of a mulberry.*