

РОЛЬ БІЛКІВ У АДАПТАЦІЇ РОСЛИН КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. TRIFOLII*, ДО УМОВ НАФТОЗАБРУДНЕНОГО ҐРУНТУ

Встановлено, що можливими елементами адаптивної відповіді рослин конюшини лучної на умови нафтозабрудненого ґрунту є зниження інтенсивності білкового синтезу та деградація білкових молекул, а також – посилення синтезу захисних білків. Виявлено існування альтернативних шляхів адаптації до умов нафтозабрудненого ґрунту у рослин, інокульованих різними штамми *Rh. leguminosarum bv. trifolii*.

Ключові слова: білковий спектр, *Trifolii pratense L.*, нафтозабруднений ґрунт, інокуляція, *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*

Вирощування бобових рослин у нафтозабрудненому ґрунті – ефективний спосіб його відновлення. Деструкторами нафти є, зазвичай, бактерії. Проте окремі вуглеводні важко засвоюються мікроорганізмами і тому затримуються у ґрунті надовго. Наявність вуглеводнів спричинює склеювання ґрунтових часток та закупорення пор ґрунту. У наслідок цього, в ґрунті виникає дефіцит вологи й кисню [5, 6]. Анаеробність є причиною кардинальних змін мікробіологічних процесів у забрудненому ґрунті, насамперед, це – пригнічення життєдіяльності аеробних амоніфікаторів й нітрифікаторів та активування анаеробних денітрифікаторів [3]. Водночас у ґрунті інтенсивно розмножуються мікроорганізми, які використовують вуглеводні як джерело живлення, а вони, крім С потребують також N [2, 5]. У наслідок цього, в ґрунті виникає винятковий дефіцит нітрогену. У цих умовах покращити азотний режим забрудненого ґрунту можна шляхом вирощування рослин, здатних нагромаджувати нітроген (завдяки фіксації N атмосфери у симбіозах з бульбочковими бактеріями). Попередніми дослідженнями встановлено, що толерантними до умов нафтозабрудненого ґрунту є бобові рослини – соя, люцерна й конюшина. Проте, нафтове забруднення ґрунту спричиняє негативний вплив на процеси формування бобово-ризобіальних симбіозів. З метою покращити нодуляційну здатність у забрудненому ґрунті здійснювали інокуляцію насіння конюшини лучної активними штамми *R. leguminosarum bv. trifolii*. Досліджували особливості білкового спектру інокульованих рослин за умов нафтозабрудненого ґрунту.

Матеріал і методи досліджень

Насіння конюшини лучної (*T. pratense L.*) сорту Передкарпатська 6 знезаражували 70% спиртом та відмивали водопровідною водою. Для інокуляції використали штам-стандарт 348а та активні штамми BN9 та A91 *Rh. leguminosarum bv. trifolii* з колекції *Rhizobium* Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Особливістю цих штамів є менша чутливість до несприятливих екологічних чинників, зокрема – нестачі вологи [4]. Інокуляцію насіння здійснювали упродовж 1 год. безпосередньо перед посівом у ґрунт. Використовували дерново-підзолистий ґрунт з околиць м. Борислава Львівської обл. Повітряно-сухий ґрунт вимішували з нафтою та наповнювали ним горщики. Кількість нафти у ґрунті становила 5% (така концентрація нафти має виражену інгібувальну дію на ріст багатьох рослин). Контролем вважали ґрунт без нафти. Перед посівом насіння ґрунт зволожували. Рослини вирощували у лабораторних умовах. Вміст білкового і небілкового нітрогену визначали хлораміновим методом [7]. Спектр білків визначали методом електрофорезу [1].

Результати досліджень та їх обговорення

Утворення необхідних для захисту рослинної клітини сполук, зокрема – білків, є однією з первинних неспецифічних відповідей на стрес. Встановлено, що за нафтозабрудненого ґрунту

ЕКОЛОГІЯ

кількість білкових сполук у коренях та пагонах конюшини лучної практично не змінювалися, водночас у пагонах збільшувався вміст небілкового нітрогену (таблиця).

Таблиця

Вплив нафтозабрудненого ґрунту на вміст білкового і небілкового нітрогену в органах конюшини лучної на стадії 1-го трійчастого листка

Досліджуваний показник	Незабруднений ґрунт		Ґрунт з вмістом нафти (5%)	
	корінь	пагін	корінь	пагін
Довжина / висота, см	7,3±0,8	8,5±0,7	5,8±0,9	3,6±0,4
Вміст білкового нітрогену, % маси сухої речовини	2,4±0,1	3,8±0,5	2,5±0,2	3,5±0,2
Вміст небілкового нітрогену, % маси сухої речовини	0,4±0,01	0,5±0,01	0,6±0,02	1,1±0,02

Збільшення кількості низькомолекулярних нітрогеновмісних сполук свідчить або про гальмування синтезу білків, або про активацію процесів протеолізу у рослинах конюшини за дії нафтового забруднення ґрунту. У наступних дослідженнях встановлено, що під впливом нафтового забруднення відбувалося підвищення вмісту білків. Проте на тлі деградації окремих білкових молекул цього збільшення не було помітно.

Так, аналіз білкового спектру листків конюшини лучної на стадії 1-го трійчастого листка показав, що за впливу нафтозабрудненого ґрунту з'являлося більше (у 2–4 рази) білків з приблизними молекулярними масами 110, 75 і 50 кД та з'являвся високомолекулярний білок з Мг 120 кД; водночас, утричі зменшувалася кількість білка з молекулярною масою біля 56 кД (рисунок). Кількість цього білка у листках у нормі була більшою від вмісту інших білків на 2 порядки. Зважаючи на це, а також на відомості, згідно з якими до 50% усіх водорозчинних білків й до 30% загального нітрогену листків рослин з С-3 шляхом фотосинтезу припадає на фермент РУБІСКО, можна припустити, що білком з молекулярною масою 56 кД є великі субодиниці цього ферменту. Зменшення кількості білка з молекулярною масою 56 кД під впливом нафтозабрудненого ґрунту може бути наслідком його деградації, спрямованої на поповнення азотного пулу рослин. Вивільнені унаслідок деградації амінокислоти можуть транспортуватися флоемою до кореня для синтезу у ньому нових функціональних білків, тому що, у коренях рослин із забрудненого ґрунту виявлено істотне зростання (приблизно утричі) кількості білків з Мг 90 і 37 кД (мінорних) і білків з молекулярними масами 50 й 39 кД.

Отже, унаслідок впливу нафтозабрудненого ґрунту білковий склад рослин конюшини зазнавав таких змін: у листках збільшувалася кількість характерних для норми білків з Мг 50, 75 і 110 кД, з'являвся високомолекулярний білок (~120 кД) та зменшувалася кількість білка з Мг 56 кД; у коренях істотно зростає вміст білків з Мг 90, 37, 50 і 39 кД. Крім цього, вираженою ознакою впливу нафтозабрудненого ґрунту було зменшення у коренях рослин (удвічі) кількості білків з Мг 40 і 32 кД.

Існування різних стратегій адаптації до нафтозабрудненого ґрунту виявлено у результаті дослідження білкового складу рослин конюшини лучної, інокульованих різними штамми *Rh. leguminosarum* *bv. trifolii*. Так, дія нафтового забруднення індукувала збільшення кількості у листках характерних для норми білків з Мг 50, 75 і 110 кД, інокуляція ж штамом 348а викликала додаткове зростання (приблизно на 30%) вмісту двох з них (110 і 50 кД), а інокуляція штамом BN9 – лише білка з Мг 50 кД. У листках рослин із забрудненого ґрунту та інокульованих штамом A91 кількість білків з Мг 50 і 110 кД була взагалі нижчою від кількості, синтезованої під впливом нафтового забруднення (хоча й зростала відносно норми).

Отже, серед інокульованих рослин найбільшим вмістом білків у листках вирізнялися рослини, інокульовані штамом 348а. Водночас, у цих рослин спостерігався найнижчий рівень деградації білка 56 кД у листках та найменші кількості білків у коренях (білків з Мг 90, 39 та 37 кД). Обернено пропорційна залежність між вмістом у листках білка 56 кД та кількістю білків у коренях виявлена і для рослин, інокульованих штамми BN9 та A91, проте у цих випадках спостерігалася максимальна деградація білка 56 кД та максимальне збільшення кількості білків у

коренях (приблизно у 2,5 рази відносно контролю у коренях зростала кількість білків з Мг 50 і 39 кД та в 3,3 рази – білків з Мг 90 і 37 кД).

Збільшення кількості білків у коренях на тлі максимальної деградації у листках білка з Мг 56 кД і навпаки – найменші кількості білків у коренях за найнижчого рівня деградації у листках білка 56 кД свідчать, що синтез білків у коренях міг відбуватися за рахунок транспортованих з листків вивільнених амінокислот.

Загалом, зміни білкового спектру конюшини лучної, інокульованої різними штамми *Rh. leguminosarum* *bv. trifolii*, свідчать про адаптацію до умов нафтозабрудненого ґрунту, що може відбуватися або за рахунок посиленого синтезу білків у листках на тлі низького рівня деградації білка 56 кД й обмеження синтезу білків у коренях (як це відбувалося у рослин, інокульованих штамом 348а), або – шляхом деградації білків у листках, транспортування вивільнених амінокислот до коренів й посиленого синтезу у них нових потрібних білків (як це відбувалося у рослин, інокульованих штамми VN9 та A91).

Висновки

Адаптивна відповідь рослин конюшини лучної на нафтозабруднений ґрунт включає як зниження загальної інтенсивності білкового синтезу та деградацію білкових молекул, так і посилення синтезу захисних білків. Рослини конюшини лучної, інокульовані різними штамми *Rh. leguminosarum* *bv. Trifolii*, володіють альтернативними шляхами адаптації до нафтозабрудненого ґрунту.

Висловлюю щире подяку проф. Коцю С.Я. за надані для роботи штами *Rh. leguminosarum* *bv. trifolii*.

1. *Биохимические* методы в физиологии растений / под. ред. О.А. Павлиновой. — М.: Наука, 1971. — С. 113—136.
2. Зеленько Ю.В., Плахотник В.Н. Изучение процессов проникновения тяжелых нефтепродуктов сквозь почву при транспортных авариях с целью прогнозирования их экологических последствий / Ю.В. Зеленько // Межрегиональные проблемы экологической безопасности: Сб. тр. симпозиума. — Сумы: СНАУ. — 2003. — С. 507—510.
3. Исмаилов Н.М. Влияние нефтезагрязнения на круговорот азота в почве / Н.М. Исмаилов // Микробиология. — 1983. — Т. 52. — Вып. 6. — С. 1003—1007.
4. Коць С.Я. Сучасний стан досліджень біологічної фіксації азоту / С.Я. Коць // Физиология и биохимия культ. растений. — 2011. — Т. 43, № 3. — С. 212—225.
5. Мірошніченко М.М. Вплив забруднення нафтою на властивості ґрунтів різного гранулометричного складу / М.М. Мірошніченко // Агрохімія і ґрунтознавство. — Вип. 60 — Київ: Аграрна наука, 2000 — С. 91—96.
6. Пиковский Ю.И. Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах / Ю.И. Пиковский // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. — М.: Наука, 1988. — С.7—22.
7. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений / Х.Н. Починок. — К.: Наук. думка. — 1976. — С. 72—95.

О.И. Величко

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

РОЛЬ БЕЛКОВ В АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО, ИНОКУЛИРОВАННОГО *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. TRIFOLII*, К УСЛОВИЯМ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

Исследование изменение общего содержания и состава белков растений клевера лугового на стадии 1-го тройчатого листа, индуцированные загрязнением почвы нефтью. Установлено, что под влиянием нефтезагрязненной почвы в листьях растений увеличивалось количество характерных для нормы белков с Мг 50, 75 і 110 кД, возникал высокомолекулярный белок (~120 кД), однако уменьшалось количество белка с Мг 56 кД; в корнях существенно возрастало содержание белков с Мг 90, 37, 50 и 39 кД, но уменьшалось количество белков с Мг 40 и 32 кД.

Обнаружено обратнопропорциональную зависимость между содержанием в листьях белка ~56 кД и количеством белков в корнях растений из нефтезагрязненной почвы и инокулированных разными штаммами *Rh. leguminosarum* *bv. trifolii*.

Адаптація к условиям нефтезагрязненной почвы растений, инокулированных штаммом 348a, происходила за счет усиленного синтеза белков в листьях на фоне низкого уровня деградации белка ~56 кД и ограниченного синтеза белков в корнях, а растений, инокулированных штаммами BN9 и A91 – путем существенной деградации белка ~56 кД в листьях и появления новых белков у корней.

Ключевые слова: белковый спектр, *Trifolii pratense L.*, нефтезагрязненная почва, инокуляция, *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*

O.I. Velychko

Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine

ROLE OF PROTEINS IN THE ADAPTATION OF RED CLOVER PLANTS INOCULATED WITH *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. TRIFOLII* TO THE CONDITION OF OIL POLLUTED SOIL

It was investigated the changes in general content and composition of proteins in the red clover plants on the point of first trifoliate leaf under the influence of oil polluted soil. In these conditions the amount of typical for the norm proteins with Mr 50, 75 and 110 kDa was increasing and a high molecular protein (~120 kDa) had appeared, however the amount of protein with Mr 56 kDa was decreasing in the leaves; the content of proteins with Mr 90, 37, 50 and 39 kDa was increasing in the roots while the amount of proteins with Mr 40 and 32 kDa was decreasing.

It was detected the inverse proportion of the amounts of protein ~56 kDa in leaves and content of proteins in plants' roots inoculated with different stains *Rh. leguminosarum bv. trifolii* in the oil polluted soil.

The adaptation to the conditions of oil polluted soil of the plants inoculated with stain 348a was conducted by the intensified protein synthesis in the leaves on the background of low level of the protein with Mr 56 kDa degradation and the limited protein synthesis in the roots while the plants inoculated with stains BN9 and A 91 were adopted by protein degradation in leaves and reinforced synthesis of new proteins in the roots.

Keywords: protein spectrum, *Trifolii pratense L.*, oil polluted soil, inoculation, *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*

Рекомендує до друку

В.В. Грубінко

Надійшла 29.04.2014

УДК 579.262:579.64

С.В. ВОЗНЮК, Л.В. ТИТОВА, Г.А. ИУТИНСКАЯ

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

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СОЕВО-РИЗОБИАЛЬНЫХ СИСТЕМ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ФУНГИЦИДОВ И КОМПЛЕКСНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ

В условиях полевых экспериментов показано, что обработка семян комплексным инокулянтom Эковитал на основе ризобий и *Bacillus megaterium* стимулировала формирование и функционирование соево-ризобияльных систем. Предварительное протравливание семян фунгицидом Витавакс 200 ФФ не приводило к угнетению симбиоза. При использовании Максим Стар 025 FS наблюдали тенденцию к снижению, а при применении Кинто дуо зафиксировано достоверное уменьшение фактической нитрогеназной активности в 1,8 раза. Установлено положительное влияние сочетанного применения исследованных фунгицидов с комплексной