

with rhizobia as compared to the plants inoculated by ineffective nodule bacteria. It was shown that the TR was reduced in the plants inoculated with ineffective Tn5 mutant. As a result, the nitrogen deficiency and decline of the intensity of CO₂ absorption accompanying it, led to the decrease in grain productivity of plants in the symbiotic systems of low efficiency.

Keywords: nitrogen fixation, photosynthesis, respiration, transpiration, symbiosis, efficiency, soybean, Bradyrhizobium japonicum

Рекомендує до друку
В.П. Патика

Надійшла 16.04.2014

УДК: 581.135.5:579.262

Н.М. МЕЛЬНИКОВА

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022

ФОРМУВАННЯ БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ ЗА ДІЇ ЕКСУДАТИВ НАСІННЯ ЛЮПИНУ

Досліджували бульбочкоутворення у симбіозі люпин-*Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) 359a за дії ексудатів насіння люпину, азотфіксуючу активність бульбочок та формування надземної частини рослин в умовах дрібноділянкових експериментів. Показано, що 6-ти годинний ексудат насіння люпину сприяв збільшенню кількості корневих бульбочок у період розвитку рослин 8-10 листків, тоді як 20-ти годинний ексудат підвищував азотфіксуючу активність бобово-ризобіального симбіозу.

Ключові слова: ексудати насіння, люпин, бобово-ризобіальний симбіоз, азотфіксація, бульбочкоутворення

Бобово-ризобіальний симбіоз є одним із найбільш потужних джерел біологічного азоту, функціонування якого забезпечує рослини доступними сполуками цього елемента, що сприяє покращенню їх росту і розвитку.

Під час набухання і проростання насіння бобових виділяє в навколишнє середовище низку біологічно активних речовин, зокрема флавоноїди, які викликають експресію генів нод-факторів бульбочкових бактерій [7], лектин – гемаглютинуючий білок, який може суттєво впливати на розвиток бобово-ризобіального симбіозу [3] та інші сполуки, які сприяють розвитку симбіотичних взаємовідносин [9]. З огляду на те, що взаємодія між партнерами симбіозу розпочинається ще на доконтактному рівні, коли відбувається активізація необхідних для симбіотичного кооперування фізіологічних процесів у макро- та мікроорганізмів, ексудати, зокрема насінні, можуть мати значний вплив на формування бобово-ризобіального симбіозу. Метою роботи було дослідити спрямованість дії ексудатів насіння люпину, зібраних на різних етапах проростання, на формування бульбочок бактеріями *Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) 359a, азотфіксуючу активність останніх у симбіозі з люпином та розвиток надземної частини рослин в умовах дрібноділянкових експериментів.

Матеріал і методи досліджень

У дослідженнях використовували бульбочкові бактерії люпину *Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) 359a, надані з колекції Всеросійського НДІ сільськогосподарської мікробіології (Санкт-Петербург, Росія), які вирощували на манітно-дріжджовому середовищі, а також рослини люпину (*Lupinus luteus* L.) сорту Круглик. Насіння стерилізували 15% H₂O₂, промивали стерильною водою і пророщували в чашках Петрі з додаванням стерильної води при 24⁰С протягом 6-ти та 20-ти годин. Ексудати стерилізували за допомогою мембранного фільтру (Millipore Co., США) та вимірювали в них кількість білку за Вітакером [10]. Росту активність бактерій *Bradyrhizobium*

sp. (*Lupinus*) 359a за дії ексудатів визначали методом лунок. Досліди з вивчення впливу ексудатів насіння люпину на формування бобово-ризобіального симбіозу проводили у дрібноділянкових експериментах (сірий лісовий супіщаний ґрунт) з рендомізованим розміщенням облікових ділянок. Промите стерильною водою насіння люпину інокулювали суспензією ризобій (титр 10^7 клітин/мл) протягом години і висівали. Ризобії вирощували в рідкому живильному середовищі з додаванням ексудатів у кількості 15 мкг/мл при 28°C протягом 12-ти діб. Відбір рослин для аналізу здійснювали у період, коли сформувалися 8-10 справжніх листків. Визначали кількість і масу бульбочок, їх азотфіксувальну активність [5] на хроматографі Agilent 6850 (США), а також масу надземної частини рослин. У контрольному варіанті використовували ризобії, які не інкубували з ексудатами. Було проведено два окремих досліди з чотирикратною повторністю кожен. Одержані дані статистично обраховували [1].

Результати досліджень та їх обговорення

Насіння бобових може виділяти речовини, які здатні пригнічувати ріст ризобій [8]. Як свідчать експериментальні дані 6-ти та 20-ти годинні ексудати насіння люпину не інгібували ростової активності бактерій *Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*) 359a, що вказує на можливість їх інкубування з культурою цих мікроорганізмів. Відомо, що біологічно активні речовини нерівномірно виділяються насінням на різних етапах проростання [4, 7]. Тому ексудати, зібрані у перші години проростання насіння та протягом періоду, що передує появі корінця, будуть по-різному впливати на розвиток симбіотичних азотфіксувальних систем. Як видно з таблиці 1, досліджувані нами ексудати насіння люпину стимулювали бульбочкоутворення протягом початкових етапів формування бобово-ризобіального симбіозу (період розвитку рослин 8-10 листків). При цьому ексудат насіння люпину, зібраний протягом перших 6 годин проростання, сприяв збільшенню кількості бульбочок порівняно до контролю та незначному зростанню їх маси. Азотфіксувальна активність і маса рослин у цьому варіанті не відрізнялись від показників, характерних для контрольних рослин (табл. 2). В умовах короткотривалого інкубування з ризобіями 6-ти годинний ексудат насіння люпину також покращував бульбочкоутворення [2]. У разі використання виділень, зібраних протягом 20-ти годинного проростання насіння люпину, спостерігалось підвищення азотфіксувальної активності симбіозу люпин-*Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*) 359a та збільшення кількості сформованих на коренях люпину бульбочок, хоча воно було недостовірним (табл. 2). Інтенсивний відтік фотоасимілятів до азотфіксувального апарату, ймовірно, призвів до зниження маси надземної частини рослин та сповільнення наростання маси бульбочок (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Кількість та маса бульбочок, сформованих *Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*) 359a за дії ексудатів насіння люпину

Варіант	Кількість бульбочок, шт./ рослину	Маса бульбочок, мг/ рослину
контроль	18,0 ± 1,3	81,0 ± 7,1
ЕНЛ6	23,7 ± 2,3	86,0 ± 7,8
ЕНЛ20	21,3 ± 1,5	66,1 ± 6,1

Примітка. Тут і в таблиці 2 контроль – бульбочкові бактерії не обробляли ексудатами; ЕНЛ6 – 6-ти годинний ексудат насіння люпину; ЕНЛ20 – 20-ти годинний ексудат насіння люпину.

Таблиця 2

Вплив ексудатів насіння люпину на азотфіксувальну активність (АФА) симбіозу люпин-*Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*) 359a та масу надземної частини рослин

Варіант	АФА, нмоль C ₂ H ₄ /(г бульбочок х год)	Маса надземної частини, г/рослину
контроль	27,10 ± 0,39	3,64 ± 0,25
ЕНЛ6	26,05 ± 2,67	3,71 ± 0,24
ЕНЛ20	32,82 ± 1,61	2,87 ± 0,23

Одним із механізмів стимулюючої дії насінневих ексудатів може бути наявність у їх складі лектинів та флавоноїдів, які здатні позитивно впливати на бульбочкоутворення [3]. Було показано, що у перші години набухання і проростання насіння бобових ексудати можуть містити значну кількість лектину [4] та флавоноїдів [7]. Ймовірно з цим пов'язане збільшення кількості бульбочок у варіанті з 6-ти годинним ексудатом (табл. 1). У більш пізні фази проростання насіння вміст лектину і флавоноїдів у ексудатах зменшується, а також змінюється співвідношення цих [4, 7] та інших біологічно активних сполук, що може відігравати важливу роль у здатності 20-ти годинного ексудату стимулювати процес азотфіксації у бульбочках (табл. 2). Важливим фактором, який визначає характер впливу ексудатів на формування бобово-ризобіального симбіозу, є модулююча взаємодія окремих компонентів ексудатів [6].

Висновки

Ексудати насіння люпину відіграють важливу роль у формуванні симбіозу люпину з ризобіями. Спрямованість впливу ексудатів залежить від тривалості періоду проростання насіння, протягом якого вони були зібрані. Ексудат насіння люпину, зібраний протягом 6-ти годин проростання, стимулює бульбочкоутворення у період розвитку рослин 8-10 листків, тоді як 20-ти годинний ексудат сприяє збільшенню азотфіксувальної активності симбіотичної системи люпин-*Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) 359a.

1. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. — М.: Колос, 1985. — 371 с.
2. Мельникова Н. Н. Влияние семенных экссудатов бобовых растений на формирование бобово-ризобияльного симбиоза / Н. Н. Мельникова, С. В. Омельчук // Прикл. биохим. микробиол. — 2009. — Т.45, № 3. — С. 331—337.
3. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов / [С. Я. Коць, С. К. Береговенко, Е. В. Кириченко, Н. Н. Мельникова]. — Киев: Наук. думка, 2007. — 315 с.
4. Fountain D. W. Lectin release by soybean seeds / D. W. Fountain, D. E. Foard, W. D. Replogle, W.K. Yang // Science. — 1977. — V. 197, N 4309. — P. 1185—1187.
5. Hardy R. W. F. The acetylene – ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation / R.W.F. Hardy, R. D. Holsten, E. K. Jackson, R. C. Burns // Plant Physiol. — 1968. — V. 43, N 8. — P.1185—1207.
6. Hartwig U. A. Interactions among flavonoid nod gene inducers released from alfalfa seeds and roots / U.A. Hartwig, C. A. Maxwell, C. M. Joseph, D. A. Phillips // Plant Physiol. — 1989. — V. 91, N 3. — P. 1138—1142.
7. Hartwig U. A. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti* / U. A. Hartwig, C. A. Maxwell, C. M. Joseph, D. A. Phillips // Plant Physiol. — 1990. — V. 92, N 1. — P. 116—122.
8. Materson L. A. Survival of *Rhizobium trifolii* on toxic and non-toxic arrowleaf clover seeds / L.A. Materson, R. W. Weaver // Soil Biol. Biochem. — 1984. — V. 16, N 5. — P. 533—535.
9. Ndakidemi P. A. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signal and protectants in early seedling development / P. A. Ndakidemi, F. D. Dakora // Functional Plant Biol. — 2003. — V. 30, N 7. — P. 729—745.
10. Whitaker J. R. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm / J. R. Whitaker, P. E. Granum // Anal. Biochem. — 1980. — V. 109, N 1. — P. 156—159.

Н.Н. Мельникова

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

ФОРМИРОВАНИЕ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКССУДАТОВ СЕМЯН ЛЮПИНА

При прорастании семена бобовых выделяют в окружающую среду ряд биологически активных веществ, которые способствуют развитию бобово-ризобияльного симбиоза. В условиях мелкоделяночных экспериментов исследовали клубенькообразование в симбиозе люпин-*Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) 359a под влиянием экссудатов семян люпина, азотфиксирующую активность клубеньков и формирование надземной части растений. Показано, что экссудаты семян люпина играют важную роль в формировании бобово-ризобияльного симбиоза у растений люпина. Направленность действия экссудатов зависела от длительности периода прорастания семян, на протяжении которого они были собраны. 6-ти часовой экссудат семян люпина способствовал увеличению количества корневых клубеньков в период развития растений 8-10 листьев, тогда как 20-ти часовой экссудат незначительно стимулировал клубенькообразование и повышал азотфиксирующую активность бобово-ризобияльного симбиоза.

Ключевые слова: экссудаты семян, люпин, бобово-ризобияльный симбиоз, азотфиксация, клубенькообразование

N. M. Melnykova

Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine

FORMATION OF THE LEGUME-RHIZOBIUM SYMBIOSIS UNDER INFLUENCE OF LUPINE SEED EXUDATES

The range of biologically active substances promoting the development of the legume-Rhizobium symbiosis is released into the environment during the germination of legume seeds. The nodulation in the lupine-*Bradyrhizobium sp.*(Lupinus) 359a symbiosis under influence of lupine seed exudates, nitrogen fixation and the formation of the aboveground part of plants were studied in field experiments. It was shown that the exudates from lupine seeds played important role in the development of the legume-Rhizobium symbiosis in lupine plants. The direction of exudate acting on symbiosis establishment depended on seed germination period that gave this excretion. The exudate collected after 6 h of lupine seed germination increased root nodule number when the lupine plants had 8-10 leaves. At the same time 20 h exudate weakly stimulated the nodulation and increased nitrogen fixation activity of the legume-Rhizobium symbiosis.

Keywords: seed exudates, lupine, legume-Rhizobium symbiosis, nitrogen fixation, nodulation

Рекомендує до друку

Надійшла 29.04.2014

С.В. Пида

УДК 631.461.5:633.11

Т.М. МЕЛЬНИЧУК, Л.О. ЧАЙКОВСЬКА, І.О. КАМЕНЄВА, А.І. ЯКУБОВСЬКА,
О.А. ЛОЛОЙКО

Інститут сільського господарства Криму НААН України
вул. Київська, 150, Сімферополь, 95453, АР Крим

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ ВЗАЄМОДІЇ БІОАГЕНТІВ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА РОСЛИН

Виявлено ефективність застосування комплексу мікробних препаратів різної функціональної дії, яка виражена в підвищенні потенціальної азотфіксуючої активності ризосферного ґрунту більше, ніж в 2 рази і урожайності пшениці озимої на 38%. Встановлено, що при забрудненні ґрунту ВМ вміст сульфоліпідів у листках пшениці озимої знижувався на 16 - 31% проти контролю залежно від рівня ГДК ВМ, тоді як при бактеризації зростав до 10% порівняно з небактеризованими рослинами.

Ключові слова: азотфіксуюча активність, діазотрофи, сульфоліпіди, жирні кислоти, комплекс мікробних препаратів, пшениця озима

Відомо, що важливі для природи процеси фотосинтезу та азотфіксації забезпечують симбіози рослин та мікроорганізмів. Ризосферні бактерії забезпечують рослини азотом, використовуючи як трофічну основу кореневі виділення. На долю фіксованого азоту атмосфери вільноживучими і асоціативними діазотрофами приходиться приблизно 30% від загальної кількості біологічного азоту [3]. В природних умовах рослини зазнають впливу різноманітних несприятливих чинників: вірусної та бактеріальної інфекцій, важких металів (ВМ), посухи, засолення тощо. Відомо, що посередниками між несприятливими умовами (зокрема токсичністю ВМ) та рослинами є мікроорганізми, вони сприяють значному зростанню стійкості макросимбіоту до стресу [1].

В аграрному виробництві широко використовуються мікробні препарати, основу яких складають мікроорганізми різної функціональної дії: азотфіксація, рістстимуляція, фосфатмобілізація, антагонізм до фітопатогенів.