

Н.І. Адамчук-Чала¹, Є.П. Копилов²

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, ДОЗ680, Україна, e-mail: m_nv@mail.ru

² Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна,
e-mail: evhenykopilov@rambler.ru

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ПІД ДІЄЮ ІНОКУЛЯЦІЇ БАКТЕРІЯМИ ШТАМУ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 102

*Метою роботи було дослідити ультраструктурну організацію клітин апікальних меристем рослин пшениці ярої, інокульованих діазотрофними бактеріями роду *Azospirillum*. Методи. Вивчення формування ендоситної асоціації *A. brasilense* 102 з рослинами пшениці ярої (*Triticum aestivum* L. (T. *Vulgare* Vill)) сорту Ранія 93 проводили у лабораторних дослідках за стерильних умов. Електронно-мікроскопічні дослідження клітин апікальних меристем проводили в трансмісійному електронному мікроскопі Jeol JSM 1200-EX. Обрахунок вівся за 50-ти зразками електроннограм клітин 5-ти апексів пагону для кожного із варіантів. Результати. В ході електронно-мікроскопічного дослідження апікальних меристем пагону пшениці ярої, вирощеної на стерильному субстраті із інокульованих бактеріями *Azospirillum brasilense* 102 зернівок, досліджено ультраструктурну організацію ізодіаметричних клітин ініціальної зони апексу. Під дією інокуляції збільшувався пул меристем, зменшувалося ядерно-цитоплазматичне співвідношення, збільшувалися розміри пластид і мітохондрій, кількість мітохондрій меристематичних клітин, крист в мітохондріях. У клітинах меристем рослин, інокульованих *A. brasilense* 102, виявлено збільшення числа і розмірів пластид, мітохондрій і пероксисом, порівняно з контролем, спостерігався більший розвиток системи крист в мітохондріях. Висновки. Збільшення числа і розмірів пластид, мітохондрій і пероксисом, в дослідних варіантах вказує на високий рівень клітинного дихання у рослин, інокульованих штамом *A. brasilense* 102. Крайній розвиток системи крист в мітохондріях може свідчити про високу енергетичну активність органел інокульованих рослин.*

*Ключові слова: ультраструктура клітин, *Azospirillum brasilense* 102, меристема, пластиди, пшениця яра.*

Біологічна фіксація молекулярного азоту здійснюється ґрунтовими мікроорганізмами, що активно накопичуються в ризосфері [5] і здатні колонізувати тканини і органи рослин [8, 6, 11]. Ризосферні бактерії роду *Azospirillum*



продукують біологічно активні речовини, під впливом яких активізується хлоропластогенез [4], поліпшується ріст і розвиток рослин [3]. У нашій попередній роботі було досліджено дію інокуляції різними штамами бактерій роду *Azospirillum* на структурно-функціональну організацію клітин меристеми проростків пшениці ярої [1]. У клітинах меристеми рослин, інокульованих *Azospirillum brasilense* 102, виявлено збільшення числа хлоропластів, мітохондрій і пероксисом, порівняно з іншими варіантами, що вказує на високий рівень клітинного дихання у інокульованих цим штамом рослин.

Відомо, що клітини апікальних меристем першими реагують на стимулювальну дію зовнішнього чинника збільшенням кількості поділів клітин і цитоплазматичних органел, що має особливе значення в процесі росту і розвитку рослинних клітин, набутті клітинами своєї спеціалізації [2].

Метою нашої роботи було дослідити ультраструктурну організацію клітин апікальних меристем рослин пшениці ярої, інокульованих діазотрофними бактеріями роду *Azospirillum*.

Матеріали і методи

Штам *Azospirillum brasilense* 102 вирощували на картопляному агарі з малатом протягом трьох діб за температури 26–27 °С.

Вивчення формування ендоситної асоціації *A. brasilense* 102 з рослинами пшениці ярої (*Triticum aestivum* L. (*T. Vulgare* Vill)) сорту Рання 93 проводили у лабораторних дослідах за стерильних умов. Для цього насіння рослин стерилізували 0,1% розчином AgNO_3 протягом 3-х хвилин і поміщали в колби Ерленмейера ємністю 500 мл, в яких містився річковий пісок в кількості 200 г. Пісок спочатку промивали водою, висушували за температури 50–60 °С. Висушений пісок промивали концентрованою соляною кислотою, потім водою і знову висушували. Промитий сухий пісок поміщали в колби Ерленмейера, зволожували поживним розчином Кнопа (60% від повної вологоємності піску) і стерилізували в режимі – 1 атм, 20 хв.

Інокуляцію насіння пшениці ярої штамом *A. brasilense* 102 здійснювали бактеріальною суспензією із розрахунку 200 тис. бактеріальних клітин на одну насінину.

Електронно-мікроскопічні дослідження клітин апікальних меристем проводили за методикою [7] в трансмісійному електронному мікроскопі Jeol JSM 1200-EX. Обрахунок вівся за 50-ти зразками електроннограм клітин 5-ти апексів пагону для кожного із варіантів. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення обчислювали відношенням об'єму клітини до об'єму ядра мінус об'єм вакуолей. Ступінь вакуолізації клітин оцінювали за кількістю і розмірами клітинних вакуолей. Середній об'єм пластид, мітохондрій і пероксисом визначали за формулою еліпсоїда обертання.

Статистичне опрацювання даних для визначення довірчого інтервалу співвідношення об'ємів компартментів клітин апікальної меристеми та параметрів цитоплазматичних органел здійснювали за допомогою програми STAT.



Результати та обговорення

За допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії було виявлено, що азотфіксувальні бактерії штаму *A. brasilense* 102 здатні активно колонізувати ризосферну поверхню коренів, а також проникати у внутрішні тканини пшениці ярої (рис. 1).

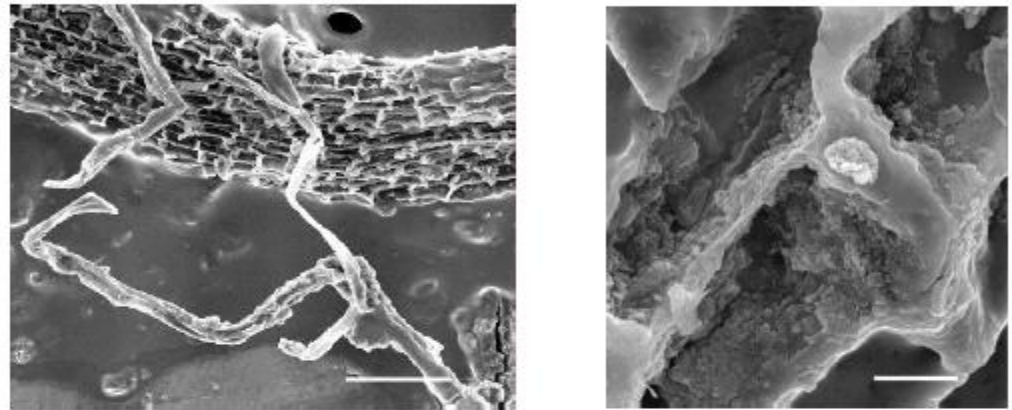


Рис. 1. Колонізація ризосферної поверхні коренів азотфіксувальними бактеріями штаму *Azospirillum brasilense* 102

Fig. 1. Colonization of the rhizospheric root surface by nitrogenfixing bacterial strain *Azospirillum brasilense* 102

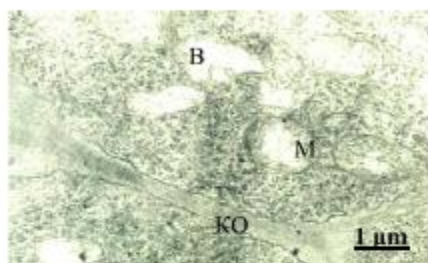
Клітини азоспірил при їх інтродукції в кореневу зону рослин були виявлені в муцигелі поверхні кореневих волосків, всередині паренхіми кореня пшениці і міжклітинному просторі всисної зони кореня [9]. Також виявлено позитивний вплив *A. brasilense* 102 на ріст і розвиток рослин.

В ході електронно-мікроскопічного дослідження апікальних меристем пагону пшениці ярої, вирощеної на стерильному субстраті із інокульованих бактеріями штаму *A. brasilense* 102 зернівок, нами було визначено, що діаметр і основні максимальні фази пластохрону склали в контролі біля 90 мкм, а в дослідному варіанті – 120 мкм. Кількість клітин при цьому залишалася незмінною. Ультраструктурна організація ізодіаметричних клітин ініціальної зони апексу пшениці була типовою для верхівкових меристем пагону (рис. 2).

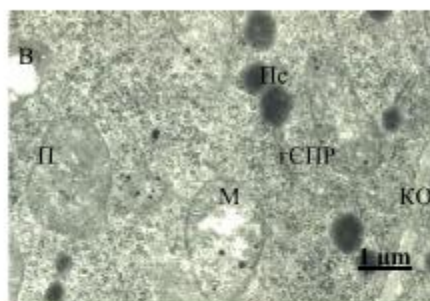
Як в контролі, так і в дослідному варіанті ядерний компартмент на серединних зрізах досліджуваних клітин займав проксимальне положення і складав чверть клітинного об'єму. Різниця між варіантами виявлялася за ступенем вакуолізації (рис. 3) та ядерно-цитоплазматичним співвідношенням. У клітин інокульованих проростків ядерно-цитоплазматичне співвідношення дорівнювало 2,4 та було меншим порівняно із контрольним значенням 3,1.

Три чверті клітинного об'єму належало цитозолю із клітинними органелами: пластидами-еопластами, кулястими мітохондріями, диктіосомами, каналцями гранулярного і агранулярного ендоплазматичного ретикулуму. В клітинах інокульованих рослин утворювалися електроннощільні пероксисоми (рис. 2Б).

Порівняльний аналіз цитоплазматичних органел виявив відмінність числа і розмірів органел (табл.) ініціальних клітин апікальної меристеми вегетативного пагону та розвитку їх субструктур.



Контроль



Інокуляція *Azospirillum brasilense* 102

Рис. 2. Фрагмент клітини апікальної меристеми пшениці ярої

А – контроль, Б – інокуляція, КО – клітинна оболонка, П – пластида, М – мітохондрія, гЕПР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, Пс – пероксисома, В – вакуоль.

Fig. 2. Detail of apical meristem cells of spring wheat

A – control, B – inoculation, CA – cell membrane, P – plastids, M – mitochondria, hEPR – granular endoplasmic reticulum, Ps – peroxisomes, V – vacuole.

Об'єм пластидому приблизно відповідав об'єму хондріому досліджуваних клітин меристем. Клітинна оболонка і поодинокі вакуолі посідали 1/10 від загального об'єму клітин. Клітинна оболонка із нерівним контуром у середньому досягала завтовшки 360 нм і була вкрита кутикулярним шаром в 30 нм.

Таблиця

Параметри цитоплазматичних органел клітин апікальної меристеми вегетативного пагону рослин пшениці ярої

Table

Measurements of cytoplasmic organelles cell apical meristem of vegetative shoots of spring wheat plants

Параметри	Контроль без інокуляції	Дія бактерій нового штаму <i>Azospirillum brasilense</i> 102
Кількість пластид у клітині	10,36 ± 1,40	12,33 ± 1,63
Об'єм пластиди, мкм ³	11,15 ± 0,30	12,30 ± 0,83
Кількість мітохондрій у клітині	17,76 ± 1,43	22,34 ± 0,76
Діаметр мітохондрій, мкм	1,70 ± 0,33	2,60 ± 0,23
Об'єм мітохондрій, мкм ³	3,50 ± 0,33	5,64 ± 0,20
Кількість крист у мітохондрії	1,50 ± 0,07	3,50 ± 0,02



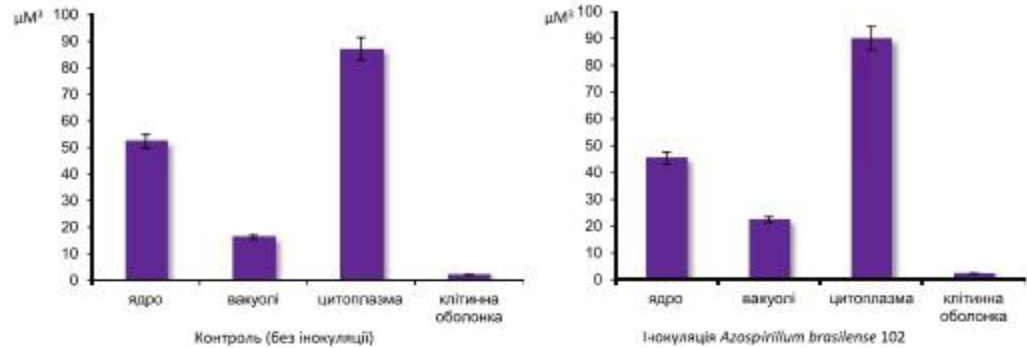


Рис. 3. Співвідношення об'ємів компартментів клітини апікальної меристеми вегетативного пагону рослини пшениці ярої

Fig. 3. The relation of apical meristem cells compartment volume in vegetative shoots of spring wheat plants

Одержані результати узгоджуються з літературними даними щодо позитивної дії азоспірил на рослини. При дослідженні мікроасоціативної взаємодії було показано спосіб проникнення азотфіксувальних бактерій роду у міжклітинний простір кореня та їх існування як стабільної діазотрофної популяції [8, 9], що для живлення використовує продуковані рослиною органічні речовини [12]. Головним чином це накопичена в макроергічних зв'язках АТФ енергія, що використовується мікроорганізмами для фіксації азоту. Таким чином, відбувається тісна взаємодія мікро- і макропартнера, що уможливує обмін сигнальними молекулами та метаболітами. Так, від діазотрофів у рослину безпосередньо надходять фіксований азот і фітогормони. В свою чергу, вступаючи в тісну взаємодію з ендofітними діазотрофами, рослини значно розширюють свої екологічні можливості і завдяки комплексу морфолого-анатомічних змін рослин та ультраструктурних перебудов клітин, набувають нових метаболічних функцій [10].

Таким чином, нами встановлено, що під дією біогенного чинника збільшується пул меристем, зменшується ядерно-цитоплазматичне співвідношення на тлі зростання числа поодиноких вакуолей, збільшується розмір пластид і мітохондрій, кількість мітохондрій меристематичних клітин та крист в мітохондріях.

Н.И. Адамчук-Чалая¹, Е.П. Копылов²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, ДО3680, Украина, e-mail: m_nv@mail.ru

²Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН,
ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина,
e-mail: evhenykopilov@rambler.ru

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НОВОГО ШТАММА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 102

Реферат

Целью работы было исследовать ультраструктурную организацию клеток апикальных меристем растений яровой пшеницы, инокулированных диазотрофами рода *Azospirillum*. **Методы.** Изучение формирования эндофитной ассоциации *A. brasilense* 102 с растениями яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L. (*T. Vulgare* Vill)) сорта Ранняя 93 проводили в лабораторных опытах в стерильных условиях. Электронно-микроскопические исследования клеток апикальных меристем проводили в трансмиссионном электронном микроскопе Jeol JSM 1200-EX. Подсчёт осуществлялся в 50-ти образцах электронограмм клеток 5-ти апексов побега для каждого варианта. **Результаты.** В ходе электронно-микроскопического исследования апикальных меристем побегов яровой пшеницы, выращенной на стерильном субстрате из инокулированных бактериями *Azospirillum brasilense* 102 зерновок, мы исследовали ультраструктурную организацию изодиаметрических клеток инициальной зоны апекса. Под действием инокуляции увеличивался пул меристем, уменьшалось ядерно-цитоплазматическое отношение, увеличивались размеры пластид и митохондрий, количество митохондрий меристематических клеток и крист в митохондриях. В клетках меристем растений, инокулированных *A. brasilense* 102, обнаружено увеличение числа и размеров пластид, митохондрий и пероксисом, по сравнению с контролем, наблюдалось более интенсивное развитие систем крист в митохондриях. **Выводы.** Увеличение числа и размеров пластид, митохондрий и пероксисом, по сравнению с контролем указывает на высокий уровень клеточного дыхания у растений, инокулированных штаммом *A. brasilense* 102. Лучший уровень развития системы крист в митохондриях может свидетельствовать о высокой энергетической активности органелл инокулированных растений.

Ключевые слова: ультраструктура клеток, *Azospirillum brasilense* 102, меристема, пластиды, яровая пшеница.



N.I. Adamchuk-Chala¹, Ye.P. Kopylov²

¹Institute of Microbiology and Virusology after D.K. Zabolotny NASU, 154, str. Zabolotny, DO3680, Kyiv, Ukraine, e-mail: m_nv@mail.ru

²Institute of Agricultural Microbiology and Agricultural Production NAAS, 97, st. Shevchenko, Chernigiv, 14027, Ukraine, e-mail: evhenykopilov@rambler.ru

ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF APICAL MERISTEMS IN SPRING WHEAT SEEDLINGS UNDER INOCULATION WITH BACTERIA OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 102 NEW STRAIN

Summary

The aim of study was to investigate the ultrastructural organization of apical meristem cells of spring wheat plants inoculated by diazotrophic bacteria of *Azospirillum* genus.

Methods. The research of endophytic associations formation between *A. brasilense* 102 and spring wheat plants (*Triticum aestivum* L. (*T. Vulgare* Vill)) sort Rannia 93 were carried out under sterile conditions. Electron microscopic study of cells apical meristems was performed in the transmission electronic microscope Jeol JSM 1200-EX. For each variant the calculation was made among 50 samples in 5 stem apex.

Results. During the electron microscopic study of shoot apical meristematic cells of spring wheat grown on sterile substrate inoculated with bacteria *Azospirillum brasilense* 102, we have investigated the ultrastructural organization of isodiametric cells of initiative apex zone. Under the influence of inoculation the pool of meristems increased, the nuclear – cytoplasmic ratio decreased, the size of mitochondria and plastids increased, mitochondria number of meristematic cells, cristae in mitochondria increased. In cells of mesophyllous plants inoculated by *A. brasilense* 102 strain, there were revealed an increase in the number and size of plastids, mitochondria and peroxisomes compared with controls, there were indicating higher level of cellular respiration in the plants inoculated by this strain. Given the inoculation system cristae in mitochondria was more developed, which may indicate high energy activity of organelles in the inoculated plants. **Conclusions.** Increasing the number and size of the plastids, mitochondria, peroxisomes, as compared to control indicates a high level of cellular respiration in plants, inoculated by *A. brasilense* 102 strain. The best level of development of cristae in mitochondria may be evidence of high energy activity of organelles of inoculated plants.

Key words: cell ultrastructure, *Azospirillum brasilense* 102, meristems, plastids, spring wheat.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Адамчук-Чала Н.И. Морфо-функциональные изменения растений пшеницы яровой при взаимодействии с азоспириллами / Н.И. Адамчук-Чала // Микробиол. журн. – 2012, т. 74. – 6. – С. 1–8.
2. Аналіз росту і розвитку нетреби (*Xanthium*). / Р.М. Максимович Наукове товариство ім. Шевченка, Львів. – 2003, 195 с.
3. Антонюк Л.П. Почвенные ассоциативные симбиозы бактерий и злаков: от фундаментальных исследований к практическому использованию / Л.П. Антонюк, В.В. Игнатов // Фундаментальные и прикладные исследования



саратовських учених для Росії і Саратовської губернії. – Саратов Издательство Саратов. ун-та, 1999. – С. 153–155.

4. Белорукова О.К. Оценка характера взаимодействия озимой пшеницы с ассоциативными азотфиксирующими бактериями / О.К. Белорукова // Вісн. Харків. держ. аграрн. ун-ту. Сер. «Рослинництво»/ Збірн. наук. праць. – Харків 1998. – С. 32–38.

5. Биорегуляция микробно-растительных систем. / Г.А. Иутинская, С.П. Пономаренко, Е.И. Андреюк и др. – К.: Ничлава, 2010. – 464 с.

6. Біологічний азот / В.П. Патики, С.Я. Коць, В.В. Волкогон та ін.: – К.: Світ, 2003. – 424 с.

7. Васильев А.Е. Динамика клеточных компонентов листа *Populus deltoids* (Salicaceae) в ходе жизненного цикла. 1. Апикальная меристема побега / А.Е. Васильев, Л.Е. Муравник // Ботанический журнал. – 1997, т. 82, № 7, С. 1–13.

8. Волкогон В.В. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы / В.В. Волкогон // Микробиология. – 2000. – Т. 62, № 2. – С. 51–68.

9. Копилов С.П. Грунтовий сапрофітний гриб *Chaetomium cochleodes* Palliser як біотичний чинник формування ефективних асоціацій азоспірил з рослинами пшениці ярої / С.П. Копилов, С.П. Надкерничний, Н.І. Адамчук-Чала // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. – Серія Біологія. – 2010. – вип. 1(19). – С. 91–100.

10. Проваров И.А. Происхождение и эволюция бобово-ризобиального симбиоза / И.А. Проваров // Изд. Академии наук СССР. Сер. биологическая. – 1991, – № 3. – С. 77–87.

11. Ocon Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots / Y. Ocon, Y. Kapulnik // Plant and Soil. – 1986. – V. 90, № 1. – P. 3–16.

12. Steenhout O. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects / O. Steenhout, J. Venderleyden // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – V. 24, N 4. – P. 487–506.

Стаття надійшла до редакції 03.03.2014 р.