

... МІКРОБІОЛОГІЯ ... MICROBIOLOGY ...

УДК: 576.31.579.23.581.4+57.016.581.123

Зміни структурно-функціональної організації фотосинтетичного апарату рослин пшениці ярої під дією діазотрофів роду *Azospirillum***Н.І.Адамчук-Чала¹, Є.П.Копилов², В.О.Яценко³**¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України (Київ, Україна)²Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААНУ (Чернігів, Україна)³Інститут космічних досліджень НАНУ-ДКАУ (Київ, Україна)
m_nv@mail.ru; evhenykopilov@rambler.ru

Досліджено зміни у структурно-функціональній організації фотосинтетичного апарату пшениці ярої за бактеризації різними штамми азоспірил у порівнянні з варіантами без інокуляції. У інокульованих рослин виявлено достовірне збільшення розмірів клітин і кількості хлоропластів. Парціальний об'єм тилакоїдів гран збільшувався у варіантах інокуляції *A. brasilense* 77, *A. brasilense* 102 і *Azospirillum* Sp7 на 81%, 18% і 52% відповідно. Розташування піків в спектрах поглинання світлозбиральних пігмент-білкових комплексів (ПБК) тилакоїдів гран і положення головного «червоного» максимуму проростків пшениці ярої, інокульованих різними за активністю штамми *A. brasilense*, вказувало на варіабельність співвідношення форм хлорофілу, що входить до складу ПБК гранального комплексу фотомембран інокульованих рослин.

Ключові слова: фотосинтетичний апарат, пшениця яра, *Azospirillum brasilense*, спектри поглинання.

Изменения структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата растений яровой пшеницы под действием diazotrophов рода *Azospirillum***Н.И.Адамчук-Чалая, Е.П.Копылов, В.А.Яценко**

Исследованы изменения структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата пшеницы яровой при бактеризации разными штаммами азоспирилл в сравнении с вариантами без инокуляции. У инокулированных растений выявлено достоверное увеличение размеров клеток и количества хлоропластов. Парциальный объем тилакоидов гран увеличивался в вариантах инокуляции *A. brasilense* 77, *A. brasilense* 102 и *Azospirillum* Sp7 на 81%, 18% и 52% соответственно. Расположение пиков в спектрах поглощения светособирающих пигмент-белковых комплексов (ПБК) тилакоидов гран и положения главного «красного» максимума проростков пшеницы яровой, инокулированных разными по активности штаммами *A. brasilense*, указывало на вариабельность соотношения форм хлорофилла, который входит в состав ПБК гранального комплекса фотомембран инокулированных растений.

Ключевые слова: фотосинтетический аппарат, пшеница яровая, *Azospirillum brasilense*, спектры поглощения.

Changes in structural and functional organization of photosynthetic apparatus of spring wheat plants under influence of diazotrophic bacteria of *Azospirillum***N.I.Adamchuk-Chala, Ye.P.Kopylov, V.O.Yacenko**

Investigation of structural and functional changes of photosynthetic apparatus of spring wheat plants under bacterization by different strains of *Azospirillae* compared with the variant without inoculation has been carried out. Inoculated plants had essentially extended cell sizes and number of chloroplasts. Partial volume of granal thylakoids increased in variants with inoculation by *A. brasilense* 77, *A. brasilense* 102 and *Azospirillum* Sp7 by 81%, 18% and 52%. Picks distribution in absorption spectrum of light-harvesting pigment-protein complex (PPC) of thylakoids and topography of main "red" maximum of spring wheat seedlings, inoculated by strains of *A. brasilense* with different activity, indicate the variability of chlorophyll forms ratio in a PPC of granal complex of photomembranes of inoculated plants.

Key words: photosynthetic apparatus, spring wheat, *Azospirillum brasilense*, adsorption spectrum.

Вступ

Інокуляція діазотрофами зернових культур збільшує фотосинтетичну активність рослин, їх вегетативну масу і врожай (Волкогон та ін., 2010). В роботі авторів (Жмурко и др., 2008) було висунуто припущення, що існує опосередкований зв'язок між інтенсивністю процесу азотфіксації і складом корневих виділень, значна частина яких – це продукти фотосинтезу, що впливають на хемотаксисну відповідь і ростові реакції специфічного азотфіксатора рослин пшениці – *Azospirillum brasilense*. *A. brasilense* є типовим представником ризосферної та епіфітної мікрофлори, здатної до синтезу гормону ауксину, що регулює процеси фотосинтезу і утворення пігментів листка (Волкогон та ін., 2010; Копилов та ін., 2010).

Вміст головних пігментів, задіяних в процесі фотосинтезу, може слугувати показником при відборі та селекції ефективних штамів азотфіксувальних бактерій (Антипчук и др., 1985). Проте, цитологічні аспекти формування фотосинтетичного апарату при створенні ефективних рослинно-мікробних систем (РМС) залишаються маловивченими.

Тому метою нашої роботи було дослідження структурно-функціональної організації фотосинтетичного апарату рослин пшениці ярої, інокульованої різними за активністю штамми діазотрофів роду *Azospirillum*.

Матеріали і методи

Зернівки рослин пшениці ярої (*Triticum aestivum* L.) сорту Рання 93 стерилізували 0,1% розчином $AgNO_3$ 3 хв., промивали стерильною водою. Інокуляцію зернівок (200 тис. бактерій на зернівку) проводили 3-добовими культурами *Azospirillum brasilense* 77, *Azospirillum brasilense* 102 та *Azospirillum* Sp7 з колекції Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААНУ, вирощеними на картопляному агарі з малатом. Зернівки висаджували в колбах Ерленмейера ємністю 500 мл після стерилізації 200 г піску, залитого середовищем Кнопа (60% від повної вологості), в режимі 1 атм. 20 хв.

Для проведення морфометричних вимірювань відбирали непошкоджені 3-і листки 20-добових рослин пшениці ярої для кожного варіанту. Серединні висічки листків фіксували і виготовляли препарати для аналізу в трансмісійному електронному мікроскопі JEOL JSM 1400 (Японія) за методикою, описаною в наших попередніх роботах (Адамчук-Чала, 2012; Копилов та ін., 2010). Дані у таблицях представлено як середні величини зі стандартними похибками, які вираховували з 50 зображень хлоропластів. Параметри клітин мезофілу і ультраструктурної організації хлоропластів визначали за допомогою програми UTHSCSA ImageTool 3.0. Інфрачервоні спектри листової пластинки рослин пшениці ярої проаналізовані за спектрами поглинання з використанням спектрометра Asp P16 (Інститут космічних досліджень НАНУ-ДКАУ) за методикою, описаною в статті (Smith et al., 2004). Статистичну обробку даних виконували за допомогою програм Microsoft Office Excel, Statistica 6.0.

Результати та обговорення

На поперечних зрізах пластинки листя пшениці ярої між одноклітинними шарами адаксіальної і абаксіальної епідерм розташовувалися округлені клітини мезофілу, що містили численні еліпсоїдні хлоропласти по периферії клітин (рис. 1).

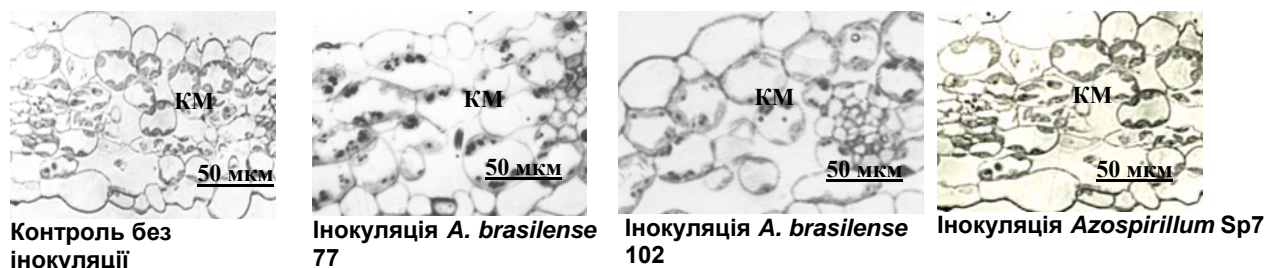


Рис. 1. Поперечний зріз мезофілу листків проростків пшениці ярої, КМ – клітини мезофілу

Зміни структурно-функціональної організації фотосинтетичного апарату пшениці за бактеризації різними штамми азоспірил, порівняно з варіантами без інокуляції, показали достовірне збільшення розмірів клітин і кількості хлоропластів, зростання об'єму фотомембран в хлоропластах

(табл. 1). Об'єм клітин мезофілу у бактеризованих рослин був у 1,4–1,8 разів вище в порівнянні з контролем і характеризувався високим ступенем варіювання в інокульованих рослин. Цей показник за інокуляції штамом *A. brasilense* 77 був найбільший і перевищував значення варіанту інокуляції *Azospirillum* Sp7 в 1,3 разів, а *A. brasilense* 102 – в 1,4 рази. Хоча кількість хлоропластів в варіанті з інокуляцією *A. brasilense* 102 була найбільшою. В клітинах мезофілу інокульованих рослин кількість хлоропластів збільшувалася в 1,7–2,7 разів, число гран в хлоропласті при інокуляції *A. brasilense* 77 зростало на 42%, при інокуляції *A. brasilense* 102 – на 25%, при інокуляції *Azospirillum* sp7 – на 17%. При порівняльному ультраструктурному аналізі хлоропластів виявлено відповідність абсолютних і відносних розмірів тилакоїдів (як сума парціальних об'ємів тилакоїдів гран і тилакоїдів строми).

Проте в хлоропластах рослин, інокульованих *Azospirillum* Sp7, накопичення стромальних включень збільшувалась: крохмальних зерен – на 46,6%, пластоглобул – на 25%, що може свідчити про активніше депонування вуглеводних і ліпо-протеїнових сполук фотосинтезуючих органел.

Таблиця 1.

Морфометрія клітин мезофілу рослин пшениці ярої, інокульованої азоспірилами

Параметри	Контроль без інокуляції	Штами азоспірил		
		<i>A. brasilense</i> 77	<i>A. brasilense</i> 102	<i>Azospirillum</i> sp7
Товщина мезофілу, мкм	144,33±0,75	146,09±1,01	147,45±0,57*	146,09±0,67
Об'єм клітин, мкм ³	1879±79	3445±128*	2630±98*	2690±128*
Кількість хлоропластів в клітині	15,75±1,44	26,06±1,94*	41,81±1,28*	36,63±1,61*
Число гран в хлоропласті	12,00±0,32	17,00±0,98*	15,00±0,27*	14,00±1,23*
Об'єм фотомембран, мкм ³	165,50±12,26	310,50±32,63*	238,70±32,81*	302,90±24,05*
Парціальний об'єм, %:				
тилакоїди гран	17,26±0,20	31,24±1,36*	20,36±1,12*	16,21±2,26
тилакоїди строми	12,35±0,87	15,12±0,97	17,29±0,45*	13,24±0,91
сума об'ємів тилакоїдів	29,61±1,25	46,36±1,41*	37,65±0,87*	39,45±0,43*
крохмальні зерна	52,03±2,69	35,18±4,32*	8,21±0,30*	56,28±2,96
строма	18,20±1,44	18,33±1,43	54,05±2,71*	14,07±2,01
пластоглобули	0,16±0,01	0,13±0,02	0,09±0,01*	0,20±0,04

Примітка: *різниця істотна при $p \leq 0,05$.

В хлоропластах інокульованих рослин штамми *A. brasilense* 77 і *A. brasilense* 102 акумуляція крохмальних зерен і пластоглобул зменшувалась, вивільняючи від надлишкових метаболітів стромальний комплекс, задіяний в темнових реакціях фотосинтезу, де в циклі Кальвіна відбувається фіксація CO₂. Парціальний об'єм тилакоїдів гран зростав в варіантах інокуляції *A. brasilense* 77, *A. brasilense* 102 і *Azospirillum* Sp7 на 81%, 18% і 52% відповідно. Світлові реакції фотосинтезу проходять в тилакоїдах хлоропластів, що представляють систему тилакоїдів гран, об'єднаних тилакоїдами строми (рис. 2). Грани в варіанті інокуляції *A. brasilense* 77 складали 10–43 стикованих в стопки тилакоїдів (рис. 2Б). В варіанті інокуляції *Azospirillum* Sp7 грани склалися з меншої кількості тилакоїдів, але мали значні відрізки дестекінгу і експонування поверхні тилакоїдів в строми (рис. 2Г).

Аналіз стану хлорофілу, зв'язаного із фотосинтетичними мембранами гранального комплексу, зазвичай, проводять досліджуючи структуру «червоної смуги» поглинання хлорофілу на довжині хвилі 660–670 нм (Smith et al., 2004). Поява такої смуги обумовлена не вібронними переходами, а специфікою організації пігмент-білкових комплексів (ПБК) в мембранах (Кочубей, 2009).

Різниця між варіантами інокуляції виявлялася у положенні максимумів смуг за відсутності довгохвильових компонентів в спектрі часток фотосистеми II (ФС II) (рис. 3). В межах 10% відрізнялася ширина смуг і відносні інтенсивності головним чином за рахунок смуги 660 нм в спектрі часток ФСII. Особливо це проявлялося в варіантах інокуляції *Azospirillum* Sp7 при співставленні тонкої структури смуги поглинання.

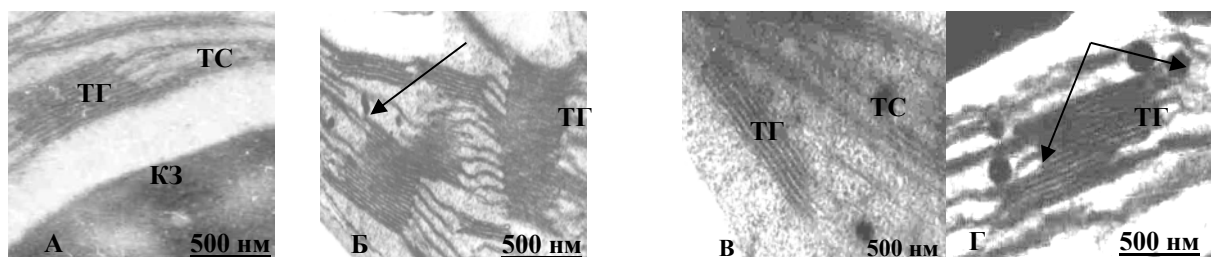
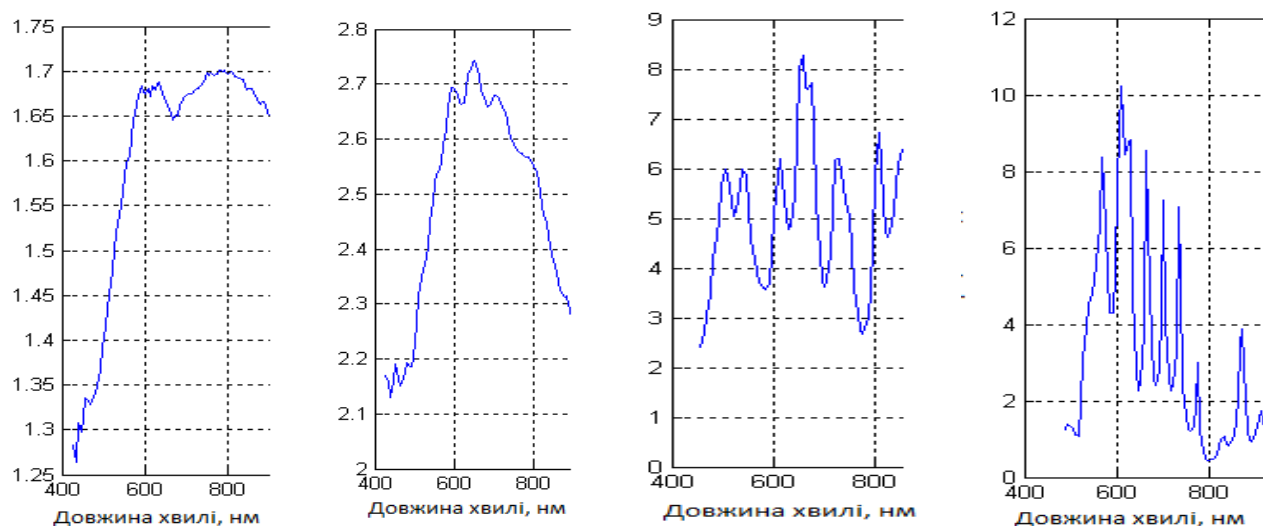


Рис. 2. Хлоропласти клітин мезофілу листків пшениці ярої

Примітки: А – контроль, Б – інокуляція *A. brasilense* 77, В – інокуляція *A. brasilense* 102, Г – інокуляція *Azospirillum* Sp7, ТГ – тилакоїди гран, ТС – тилакоїди строми, КЗ – крохмальні зерна, стрілками вказані пластоглобули.

Набір компонентів в спектрі гранальної ФСІ наступний: 660,8; 669,3; 667,8; 683,8; 668,7; 699,7 нм. Порівняння наведених нами величин показує, що чотири короткохвильові компоненти в варіантах інокуляції *A. brasilense* 102 і *Azospirillum* Sp7 мають положення, більш близьке до аналогічних компонентів в ділянці спектру ФСІ, що свідчить про кращий розвиток ПБК цієї системи за умов інокуляції вказаними штамми. Таким чином, штами *A. brasilense* 102 і *Azospirillum* Sp7 можна рекомендувати для використання у розробці сільськогосподарських мікробіологічних препаратів.



Контроль без інокуляції Інокуляція *A. brasilense* 77 Інокуляція *A. brasilense* 102 Інокуляція *Azospirillum* Sp7

Рис. 3. Інфрчервоні спектри листової пластинки рослин пшениці ярої, по вісі ординат вказано інтенсивність поглинання у відносних одиницях

Таким чином, у інокульованих рослин пшениці ярої збільшувалися розміри клітин, кількість хлоропластів, зростав парціальний об'єм тилакоїдів гран. Розташування піків в спектрах поглинання світлозбирального ПБК тилакоїдів гран і положення головного «червоного» максимуму проростків пшениці ярої, інокульованих різними за активністю штамми *A. brasilense*, відрізняється як в ФСІ, так і в ФСІІ. Ця різниця пояснюється варіабельністю співвідношення форм хлорофілу, що входить до складу в ПБК гранального комплексу фотомембран інокульованих рослин.

Список літератури

Адамчук-Чалая Н.И. Морфо-функциональные изменения растений пшеницы яровой при взаимодействии с азоспириллами // Микробиол. журн. – 2012. – Т.74, №6. – С. 3–8. /Adamchuk-Chalaya N.I.

Morfo-funktsional'nyye izmeneniya rasteniy pshenitsy yarovoy pri vzaimodeystvii s azospirillami // Mikrobiol. zhurn. – 2012. – T.74, №6. – S. 3–8./

Антипчук А.Ф., Рангелова В.Н., Скочинская Н.Н. и др. Использование различных показателей при оценке эффективности бактерий // Микробиол. журн. – 1985. – Т.47, №4. – С. 89–90. /Antipchuk A.F., Rangelova V.N., Skochinskaya N.N. i dr. Ispol'zovaniye razlichnykh pokazateley pri otsenke effektivnosti bakteriy // Mikrobiol. zhurn. – 1985. – T.47, №4. – S. 89–90./

Волкогон В.В., Надкернична О.В., Токмакова Л.М. та ін. Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія. – К.: Аграр. наука, 2010. – 464с. /Volkogon V.V., Nadkernichna O.V., Tokmakova L.M. ta in. Eksperymental'na gruntova mikrobiologiya: monografiya. – K.: Agrar. nauka, 2010. – 464s./

Жмурко В.В., Авксентьева О.А., Самойлов А.М. Численность diazотрофов и нитрогеназная активность в ризоценозе изогенных по генам Vrn линий пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т.40, №4. – С. 346–353. /Zhmurko V.V., Avksent'yeva O.A., Samoylov A.M. Chislennost' diazotrofov i nitrogenaznaya aktivnost' v rizotsenozе izogennykh po genam Vrn liniy pshenitsy // Fiziologiya i biokhimiya kul't. rasteniy. – 2008. – T.40, №4. – S. 346–353./

Копилов Є.П., Надкерничний С.П., Адамчук-Чала Н.І. Ґрунтовий сапрофітний гриб *Chaetomium cochliodes* Palliser як біотичний чинник формування ефективних асоціацій азоспірил з рослинами пшениці ярої // Вісник Харківського національного аграрного університету, серія Біологія. – 2010. – Вип.1 (19). – С. 91–100. /Kopylov Ye.P., Nadkernichnyy S.P., Adamchuk-Chala N.I. Gruntovyy saprofitnyy gryb Chaetomium cochliodes Palliser yak biotychnyy chynnyk formuvannya efektyvnykh asotsiatsiy azospiryl z roslinamy pshenitsy yaroi // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo agrarnogo universytetu, seriya Biologiya. – 2010. – Vyp.1 (19). – S. 91–100./

Кочубей С.М. Особенности ультраструктурной организации хлоропластов высших растений // Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку. – К.: Логос, 2009. – С. 62–90. /Kochubey S.M. Osobennosti ul'trastrukturnoy organizatsii khloroplastov vysshykh rasteniy // Fiziologiya roslin: problemy ta perspektyvy rozvytku. – K.: Logos, 2009. – S. 62–90./

Smith K.L., Steven M.D., Colls J.J. Use of hyperspectral derivative ratios in the red-edge region to identify plant stress responses to gas leaks // Remote sensing of environment. – 2004. – Vol.92. – P. 207–217.

Представлено: О.І.Жук / Presented by: O.I.Zhuk

Рецензент: В.В.Жмурко / Reviewer: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 11.04.2014