

УДК 58.036:577.112.152.1.19:582.542.11

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОГО ПРАЙМИРОВАНИЯ N-ГЕКСАНОИЛ-L-ГОМОСЕРИНЛАКТОНОМ НА ФОРМИРОВАНИЕ РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ И СТРУКТУРУ УРОЖАЙНОСТИ *TRITICUM AESTIVUM* L.

© 2017 г. Л. М. Бабенко¹, Е. В. Мошинец², С. П. Рогальский³,
Н. Н. Щербатюк¹, О. С. Суслова⁴, И. В. Косаковская¹

¹Институт ботаники им. М.Г. Холодного Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)

²Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)

³Институт биоорганической химии и нефтехимии Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)

⁴Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)

N-ацилгомосеринлактоны (АГЛ) относятся к классу молекул медиаторов бактериального происхождения, задействованных в дистанционной трансдукции сигналов между бактериями-колонизаторами фитосферы и непосредственно между бактериями и растением. Задачей данной работы было оценить эффекты праймирования семян озимой пшеницы раствором короткоцепочечного N-ацилгомосеринлактона на формирование ризосферной микрофлоры растения и структуру урожайности. В связи с этим нами был осуществлен химический синтез молекул АГЛ среднего размера – N-гексаноил-L-гомосеринлактона (ГГЛ), подобрана система растворения препарата для приготовления стоковых водных растворов, определена эффективная рабочая концентрация. Полученным водным раствором ГГЛ были праймированы семена новых генотипов *Triticum aestivum* L. украинской селекции: жароустойчивый сорт Ятрань 60 и морозоустойчивый Володарка. В результате проведенных исследований выявлены прямой (на растения пшеницы) и косвенный (на ризосферную микрофлору) эффекты праймирования. Зафиксированы увеличение продуктивного кущения, количества и массы зерен в одном колосе, общей биомассы растений, надземной вегетативной массы и массы зерна, а также массы 1000 зерен. Исследование косвенного эффекта праймирования в условиях реальной экосистемы выявило качественные и количественные изменения в составе экологических групп ризосферной микрофлоры. Непредвиденным эффектом праймирования оказалось уменьшение количества азотфиксирующих бактерий, что, тем не менее, наблюдалось на фоне увеличения продуктивности растений. Этот феномен требует дальнейшего исследования. Поскольку праймирование семян озимой пшеницы в целом оказало положительное воздействие на растения пшеницы, ГГЛ можно рассматривать как перспективный экологический фитостимулятор и фитомодулятор.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, N-ацилгомосеринлактоны, N-гексаноил-L-гомосеринлактон, фитостимуляторы, фитомодуляторы, праймирование, quorum sensing

Негативное влияние антропогенных факторов на окружающую среду ставит перед

Адрес для корреспонденции: Бабенко Лилия Михайловна,
Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина;
e-mail: lilia.babenko@gmail.com

учеными и аграриями задачу сократить или вовсе избежать использования синтетических регуляторов роста. Однако проблема эффективного повышения урожайности аграрных культур при этом остается открытой. Для обеспечения растущих потребностей в продуктах пита-

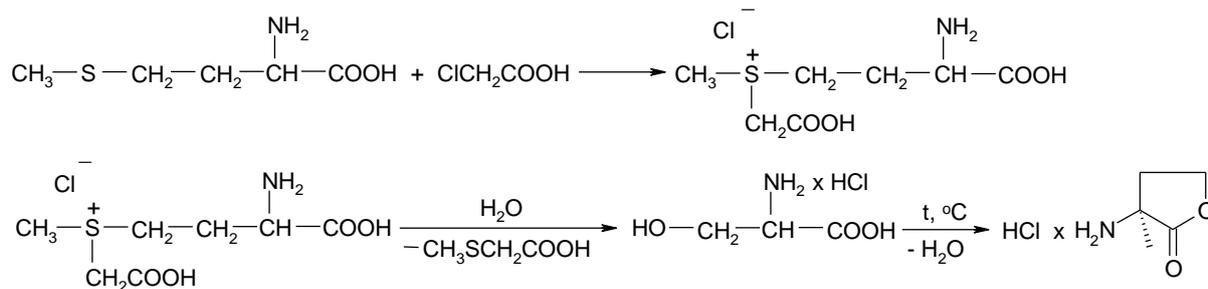


Рис. 1. Схема синтеза L-гомосеринлактон гидрохлорида.

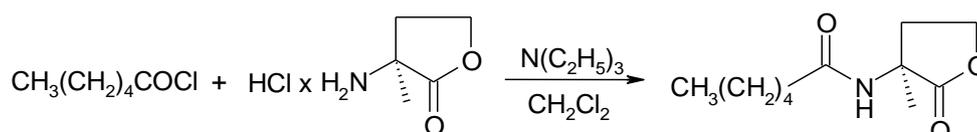


Рис. 2. Схема синтеза N-гексаноил-L-гомосеринлактона (ГГЛ).

ния необходимы агробиотехнологии, позволяющие безопасным путем повысить количество и качество сельскохозяйственной продукции (Бубряк та ін., 2013). В последние десятилетие внимание исследователей, изучающих микроорганизмы, направлено на анализ феномена, получившего название *quorum sensing* (QS), суть которого состоит в особом, зависящем от плотности бактериальной популяции, способе регуляции экспрессии генов бактерий. QS-системы включают сигнальные легкодиффундирующие из клеток в среду и обратно молекулы аутоиндукторов (Олексин и др., 2000; Miller, Bassler, 2001; Bassler, 2002). QS-регуляция обнаружена более чем у 500 видов бактерий (Крестецька, Нестеренко, 2007). Показано, что системам QS принадлежит ключевая роль в регуляции большинства метаболических и физиологических процессов в бактериальной клетке (Крестецька, Нестеренко, 2007; Гостев, Сидоренко, 2010). Благодаря им осуществляется взаимодействие между бактериями и растениями (Schenk, Schikora, 2015; Бабенко и др., 2016), происходящее в фитосфере, которая объединяет ризо-, эндо и филосферу (Copley 2000; Мошинец и др., 2010а; 2010б). Рост и развитие растения, ассимиляция питательных веществ, стрессоустойчивость во многом определяются характером такого взаимодействия (Van Peer 1999; Normander, Prosser, 2000; Van Elsas 2003). Известно несколько видов молекул медиаторов дистанционной QS-трандукции сигналов (Bassler, 2002). Наиболее исследована сигнальная система грамм-отрицательных бактерий, в которой задействованы молекулы группы ацил-гомосеринлактонов (Faran et al., 2005; Rendi et al., 2009), составляющие самую многочислен-

ную группу веществ, участвующих в передаче сигналов от микро- к макроорганизмам (Mathesius et. al., 2003; Schenk, Schikora; 2015; Бабенко и др., 2016).

Пшеница является одной из ведущих зерновых культур, составляющих основу пищевого рациона во многих странах, поэтому увеличение её продуктивности крайне актуально. Такое увеличение должно происходить преимущественно за счёт интенсификации сельскохозяйственного производства, а не расширения посевных площадей, которые во многих регионах достигли или уже превысили пределы экологической безопасности (Reynolds et. al., 2001). Изменения условий окружающей среды вызывают у растений дополнительные затраты энергии для адаптации, что, в свою очередь, негативно влияет на урожайность. Повышение адаптационного потенциала растений рассматривается как один из основных факторов, способствующих стабильности урожайности. Таким образом, молекулы природы АГЛ могут стать теми веществами, которые будут отвечать требованиям интенсивного органического земледелия и будут способны повысить урожайность, защитные реакции и устойчивость растений. Поэтому целью исследования стало изучение влияния праймирования семян N-гексаноил-L-гомосеринлактоном (ГГЛ) на формирование ризосферной микрофлоры и структуру урожайности *Triticum aestivum* L.

МЕТОДИКА

Исследования проводили с растениями озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. новых генотипов украинской селекции. Были отобраны

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОГО ПРАЙМИРОВАНИЯ

сорта Володарка и Ятрань 60. Экологически пластичный сорт Володарка отличается морозо- и засухоустойчивостью, выращивается в Лесостепи и Полесье. Сорт Ятрань 60 характеризуется высокой жаро- и засухоустойчивостью, выращивается в Лесостепи, Полесье и Степной зоне Украины (Моргун и др., 2008).

Синтез L-гомосеринлактон гидрохлорида осуществляли согласно методу (Natelson, Natelson, 1989) с некоторыми модификациями (рис. 1).

Взаимодействием базисного соединения L-гомосеринлактон гидрохлорида с гексаноилхлоридом был получен N-гексаноил-L-гомосеринлактон (ГГЛ) по методике, описанной Chhabra et al. (2003) (рис. 2).

Структура синтезированного ГГЛ подтверждена данными ЯМР спектроскопии.

Влияние праймирования ГГЛ на прорастание семян исследовали следующим образом. Семена выкладывали на фильтровальную бумагу в чашки Петри, куда вносили по 20 мл водного раствора ГГЛ (50, 100, 150 нг/мл), в чашки контрольного варианта вносили соответствующее количество дистиллированной воды, после чего оставляли на 24 ч в термостате при температуре 24°C, в темноте. Прорастание семян анализировали согласно стандартам Международной ассоциации тестирования семян (ISTA), для чего проращивали по 100 семян в трех повторностях и через 24 часа регистрировали всхожесть.

Для вегетационного теста семена праймировали раствором ГГЛ (100 нг/мл) в течение 3 ч при 22-25°C, принимая во внимание, что на ранних этапах прорастания в фазе набухания семена сохраняют устойчивость к обезвоживанию и не теряют жизнеспособности после нескольких циклов гидратации–дегидратации (Бабенко та ін., 2005). После праймирования семян осуществляли их инкрустацию раствором полимерного препарата AREAL BS-05 (Украина), содержащего поверхностно-активные вещества крахмальной природы, обволакивающие семена однородной нейтральной пленкой с целью закрепления и стабилизации молекул ГГЛ на поверхности семян. Праймированные семена высушивали в течение 72 ч при температуре 24-25°C до влажности 12-14%. Семена сеяли на участках научно-исследовательской базы «Феофания» Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины. Работы проводились в 2015-2016 гг. Природные почвы базы «Феофания» представлены серыми лесными почвами легкого средне-

суглинистого механического состава со следующими показателями пахотного слоя: pH_{KCl} – 5,8, общее содержание гумуса – 3,4% (по Тюрину), подвижные соединения фосфора и калия – 128 мг/кг и 90 мг/кг почвы соответственно. Анализ данных метеорологических наблюдений показал, что гидротермические условия осени 2015 г. имели существенные отклонения от нормы и были недостаточно благоприятными для роста и развития растений. Количество осадков в сентябре и октябре 2015 было на 42% ниже средней многолетней нормы. После возобновления весенней вегетации растений на опытные участки были внесены азотные удобрения (30 кг азота/га). Анализ структуры урожая проводился по методике Государственной комиссии Украины по испытанию и охране сортов растений; учет урожайности на опытных участках проводили после сплошного обмолота (Бабаянц и др., 1988).

Анализ ризосферной микрофлоры проводили традиционным методом микробиологического посева на искусственные питательные среды, подсчет осуществляли путем регистрации колониеобразующих единиц (КОЕ) (Клоппер et al., 1980). Образцы для микробиологического посева отбирали непосредственно на опытном участке базы «Феофания» по следующей схеме: с каждого участка, представляющего один экспериментальный вариант, брали по 125 растений с корнями и прикрепленной к ним почвой, которые отбирали с пяти разных точек участка таким образом, чтобы охватить весь участок. Смыв с корней растений использовали для оценки ризосферной микрофлоры.

Выделение и учет азотфиксирующих бактерий проводили на среде Эшби с добавлением сахарозы. При выращивании азотфиксирующих бактерий на агаризованной среде Эшби была выделена также группа олигонитрофилов, способных расти при следовых количествах соединений азота. Поскольку азот в малых концентрациях присутствует в агаре, для определения азотфиксаторов дополнительно проводили посев на среду, не содержащую соединений азота (Егоров, 1996; Теппер и др., 1998). Микроорганизмы, не обнаруженные на среде Эшби, были отнесены к олигонитрофилам (Sivaramkrishtan et al., 2006). Выделение и учет денитрифицирующих бактерий проводили на среде Гильтая при pH 6,8-7,2. Рост денитрификаторов определяли по признакам защелачивания среды, изменения оптической плотности (помутнения), газообразования и отсутствия нитратов. Посев на агаризованной среде прово-

дили в анаэробных условиях в атмосфере аргона методом Хангейта с модификациям (Егоров, 1996; Теппер и др., 1998). Количественный состав газовой фазы во флаконах идентифицировали по стандартной методике, определяя теплопроводность катарометра на газовом хроматографе ЛХМ-8 МД. Концентрацию O_2 и N_2 (в %) в газовой смеси рассчитывали по площади пиков (Егоров, 1996; Теппер и др., 1998).

Культивирование нитрифицирующих бактерий продолжалось 20 сут на жидких средах Ватсона и Менделя при атмосферной концентрации CO_2 (0,039%). Выделение и учет амилолитиков проводили на агаризованной среде с крахмалом из расчета 20 г/л. Десятикратно разведенные микробные взвеси высевали на подготовленные чашки и культивировали при температуре 28°C в течение трех суток. После этого поверхность среды вместе с колониями микроорганизмов обрабатывали 0,1% раствором йода. Колонии, вокруг которых фиксировали светлое пространство (качественная реакция на разложение крахмала), учитывали как амилолитические (Sjofjan, Ardyati, 2011).

Повторность вегетационных и полевых опытов – трехкратная. При определении элементов структуры урожая каждая повторность насчитывала не менее 50 растений, которые выращивали на участках площадью 2 м². На рисунках и в таблицах приведены средние значения для опытных и контрольных образцов. Достоверность различий между ними оценивали по критерию Стьюдента, используя 5% уровень значимости ($P \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ГГЛ-праймирования на всхожесть семян и накопление биомассы. Для анализа влияния праймирования на всхожесть семян исследуемых сортов озимой пшеницы лабораторные опыты проводили по схеме: контроль; праймирование ГГЛ с последующим инкрустированием AREAL BS-05; праймирование ГГЛ; инкрустирование AREAL BS-05; праймирование водой. Было показано, что праймирование семян ГГЛ в концентрации 100 нг/мл увеличивало количество проросших семян (рис. 3). Праймирование семян водой и инкрустация AREAL BS-05 существенно не влияли на всхожесть семян (рис. 4). Количество проросших после праймирования и инкрустации семян на 8-12% превышало контроль (рис. 4). Разница в количестве проросших после праймирования с последующим инкрустированием и праймиро-

вания без последующего инкрустирования семян составляла 0,5-1% (рис. 4).

Праймирование семян положительно влияло на накопление биомассы. Так, сухая масса двухмесячных растений, выращенных из праймированных семян в условиях полевого опыта, в 1,3-1,6 раза превышала показатели контроля (рис. 5).

В работах других исследователей было показано, что праймирование осмотиками индуцирует репарационные процессы в клетках зародышей лука, сахарной и кормовой свеклы. После обработки были обнаружены различия в содержании ДНК в ядрах и количестве клеток, достигших G_2 фазы митоза (Бубряк та ін., 2013). Помимо регуляции жизнеспособности семян праймирование рассматривается как составная часть индуцирования стрессоустойчивости (Conrath, Pieterse, 2002). Среди индукторов устойчивости исследованы β-аминомасляная (БАК) и салициловая (СК) кислоты. Обработка растений арабидопсиса БАК активировала СК и АБК-зависимые сигнальные пути, повышала солеустойчивость, а также, при инфицировании патогенами, индуцировала образование каллозы в клеточных стенках (Ton et al., 2005). Сложность широкого использования технологии праймирования связана с тем, что для разных сортов, линий и гибридов растений оптимальные условия обработок могут значительно варьировать (Ashraf, Fooland, 2005; Paterson, Heyes, 2011). Отсутствуют также универсальные молекулярные маркеры, которые бы указывали на достижение оптимального уровня обработки семян при праймировании у разных видов сельскохозяйственных культур (Beckers, Conrath, 2007; Bruce et al., 2007). Наблюдаемые нами на двухмесячных растениях озимой пшеницы эффекты позволяют констатировать, что праймирование ГГЛ положительно влияло на всхожесть семян и накопление биомассы.

Влияние ГГЛ-праймирования на ризосферную микрофлору в условиях реальной экосистемы. Для анализа влияния праймирования на микробиологический состав ризосферы использовали двухмесячные растения озимой пшеницы, выращенные в полевых условиях на участках научно-исследовательской базы «Феофания». Исследовали следующие основные физиологические группы ризосферной микрофлоры: азотфиксирующие, олигонитрофилы, денитрифицирующие, нитрифицирующие I и II групп, амилолитики.

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОГО ПРАЙМИРОВАНИЯ

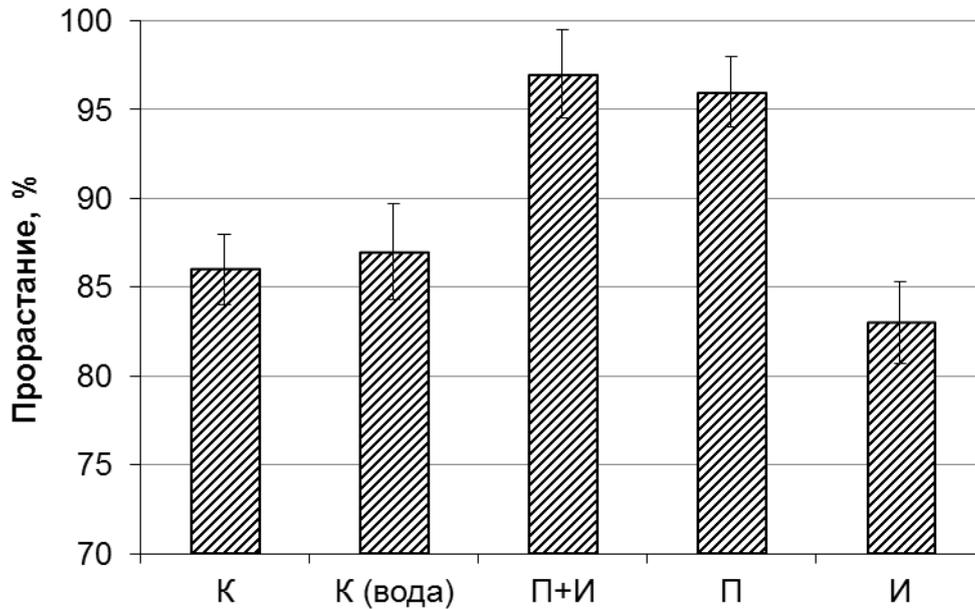


Рис. 3. Всхожесть семян *T. aestivum* сорта Ятрань 60 (24 ч). К – контроль (не праймированные ГГЛ семена), К (вода) – праймирование водой, П+И – праймирование ГГЛ в сочетании с инкрустированием; П – праймирование ГГЛ; И – инкрустирование.

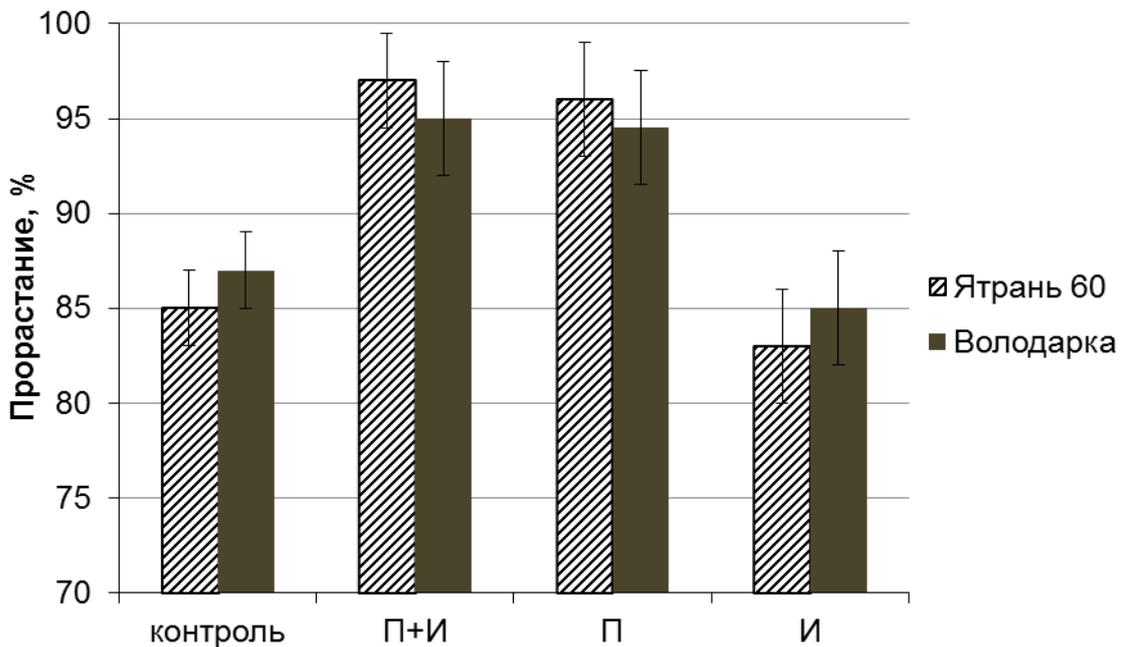


Рис. 4. Всхожесть семян *T. aestivum* сортов Ятрань 60 и Володарка (24 ч). К – контроль (не праймированные ГГЛ семена), П+И – праймирование ГГЛ в сочетании с инкрустированием; П – праймирование; И – инкрустирование.

В результате проведенных исследований было выявлено, что в ризосфере двухмесячных растений сорта Володарка число азотфиксирующих бактерий в контроле составило $9,5 \times 10^5$ КОЕ, тогда как в корневой системе растений, семена которых были инкрустированы –

$4,5 \times 10^6$ и $2,5 \times 10^6$ у праймированных ГГЛ и инкрустированных растений (рис. 6). У сорта Ятрань 60 были зафиксированы более высокие показатели. Так, у контрольных растений число КОЕ нитрогенфиксирующих бактерий составило $4,5 \times 10^6$, в то время как в ризосфере расте-

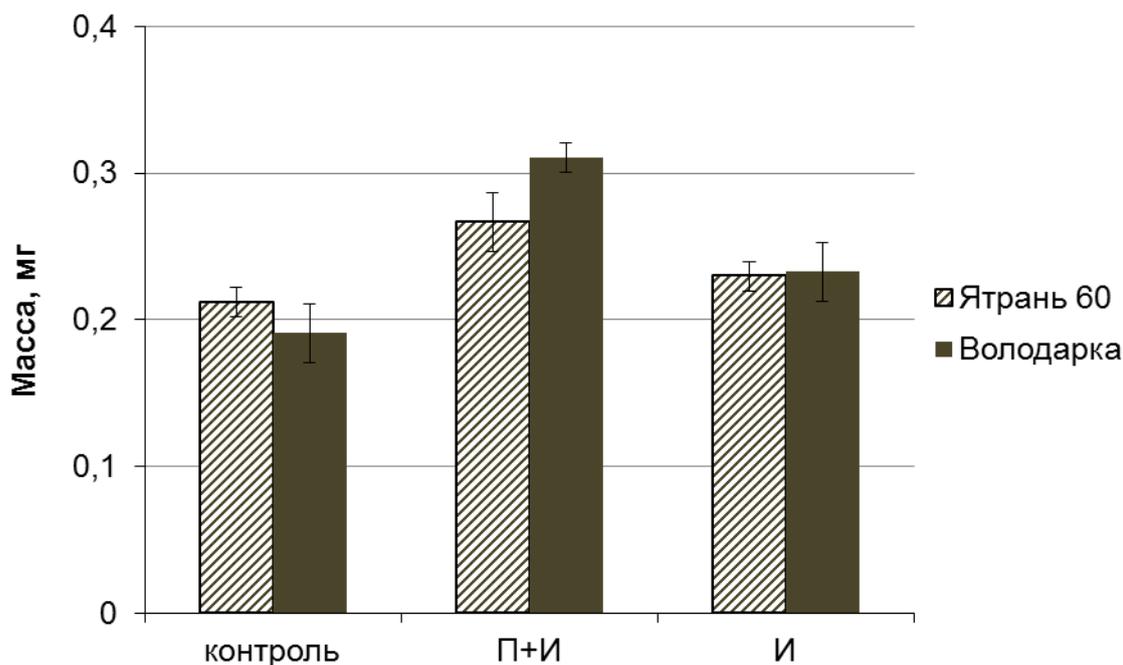


Рис. 5. Сухая биомасса (мг) двухмесячных растений *T. aestivum* сортов Ятрань 60, Володарка. К – контроль (не праймированные ГГЛ семена), П+И – праймирование ГГЛ в сочетании с инкрустированием; И – инкрустирование.

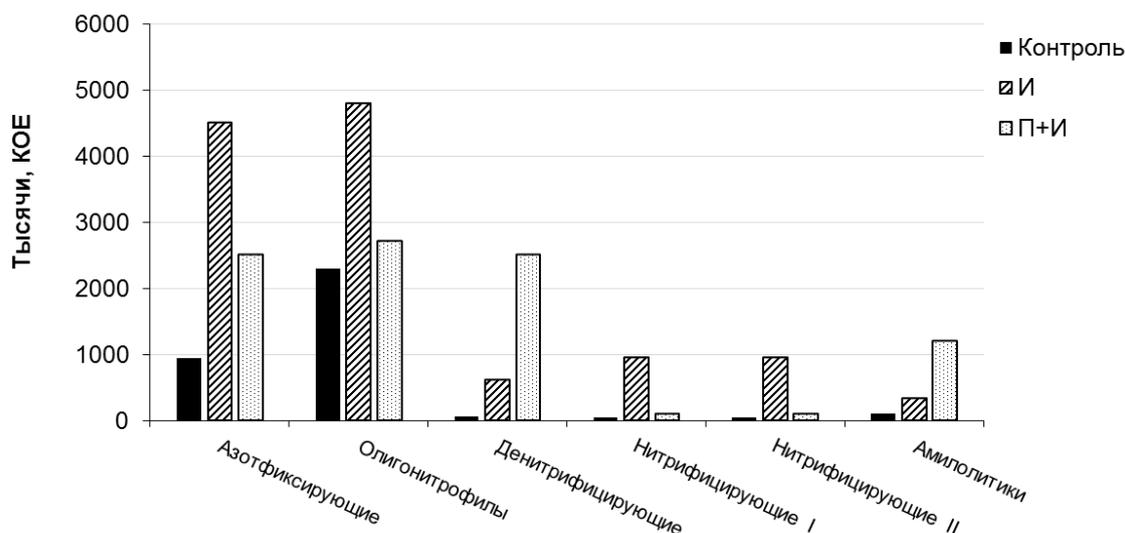


Рис. 6. Состав ризосферной микрофлоры двухмесячных растений *T. aestivum* сорта Володарка, КОЕ – колониобразующие единицы. К – контроль, П+И – праймирование ГГЛ в сочетании с инкрустированием; И – инкрустирование.

ний, семена которых инкрустировали – $1,5 \times 10^7$ КОЕ, а в варианте с прайминг-инкрустацией – $1,5 \times 10^6$ (рис. 7).

Таким образом, у исследованных сортов озимой пшеницы праймирование вызывало уменьшение количества азотфиксирующих бактерий в ризосфере. Этот эффект примечателен тем, что количество азотфиксаторов традиционно связывают с урожайностью и биомас-

сой растений (Van der Heijden et al., 2006; Bhattacharjee et al., 2008). Однако, в нашем случае снижение уровня азотфиксаторов наблюдалось на фоне увеличения биомассы двухмесячных растений (рис. 5).

Олигонитрофильные бактерии нетребовательны к питательным веществам, культивируются на обедненных питательных средах, а в богатых питательными веществами условиях

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОГО ПРАЙМИРОВАНИЯ

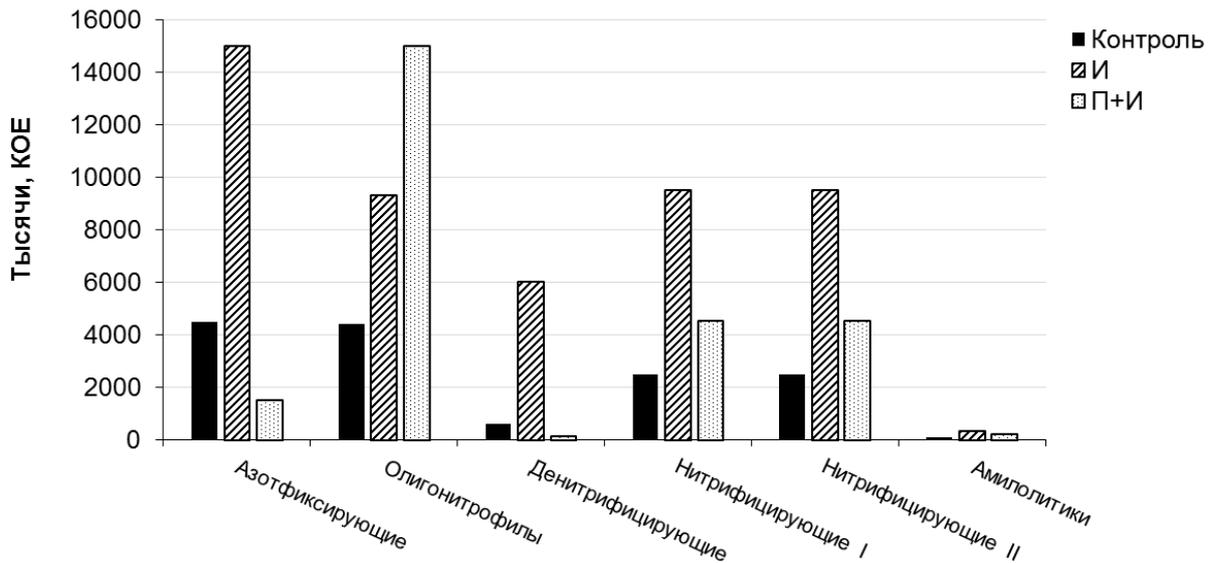


Рис. 7. Состав ризосферной микрофлоры двухмесячных растений *T. aestivum* сорта Ятрань 60, КОЕ – колониеобразующие единицы. К – контроль, П+И – праймирование ГГЛ в сочетании с инкрустированием; И – инкрустирование.



Рис. 8. Растения *T. aestivum* сорта Ятрань 60 контрольного варианта (а) и выращенные из праймированных ГГЛ семян (б).

растут крайне плохо (Sivaramakrishnan et. al., 2006). У сорта Володарка количество КОЕ олигонитрофилов в ризосфере контрольных растений составило $2,3 \times 10^6$, в ризосфере инкрустированных и праймированных-инкрустированных – $4,8 \times 10^6$ и $2,7 \times 10^6$, соответственно (рис. 6). У сорта Ятрань 60 в контроле число КОЕ олигонитрофилов в ризосфере равнялось $4,4 \times 10^6$, при инкрустировании и праймировании-инкрустировании семян растения имели $9,3 \times 10^6$ и $1,5 \times 10^7$ КОЕ, соответственно (рис. 7).

Денитрификация – процесс обратный нитрификации, заключается в восстановлении азота до молекулярной формы. У сорта Володарка число КОЕ денитрификаторов в ризосфере возрастало с 6×10^4 в контроле до 6×10^5 после инкрустации и $2,5 \times 10^6$ после инкрустации-праймирования (рис. 6). В ризосфере сорта Ятрань 60 количество КОЕ денитрификаторов в

контроле составило 6×10^5 , после инкрустации – 6×10^6 , тогда как после инкрустации-праймирования снизилось до $1,3 \times 10^4$ (рис. 7).

В процессе нитрификации (двухэтапном окислении аммония до азотистой кислоты) задействованы нитрифицирующие бактерии. У сорта Володарка число КОЕ нитрификаторов составило $4,5 \times 10^4$ в контроле, после инкрустации выросло до $9,5 \times 10^5$, а после праймирования-инкрустации составило $9,5 \times 10^4$ (рис. 6) У сорта Ятрань 60 количество КОЕ нитрификаторов равнялось $2,5 \times 10^6$ в контроле, $9,5 \times 10^6$ после инкрустации и $4,5 \times 10^6$ после праймирования-инкрустации (рис. 7).

Инкрустация и праймирование также повлияли на количество амилолитиков – бактерий, гидролизующих крахмал. У сорта Володарка количество КОЕ амилолитиков возросло

Таблица 1. Структура урожая *T. aestivum* сорта Ятрань 60 в полевых условиях

Морфометрические показатели	Варианты опыта				
	контроль	инкрустирование	Разница к контролю, %	праймирование ГГЛ + инкрустирование	Разница к контролю, %
Продуктивная кустистость, шт.	7,12±0,36	7,36±0,24	3	12,56±0,28	76
Длина колоса, см	13,78±0,18	13,8±0,19	1	13,82±0,26	2
Количество колосков в колосе, шт.	20,88±0,27	21,00±0,26	1	21,32±0,33	2
Количество зерен в колосе, шт.	45,56±1,29	46,56±1,74	2	55,44±2,54	22
Масса зерен в колосе, г	1,56±0,06	1,62±0,06	3	1,99±0,11	27

Таблица 2. Структура урожая *T. aestivum* сорта Володарка в полевых условиях

Морфометрические показатели	Варианты опыта				
	контроль	инкрустирование	Разница к контролю, %	праймирование ГГЛ + инкрустирование	Разница к контролю, %
Высота растения, см	93,48±0,61	91,92±0,49	-2	94,92±0,95	2
Продуктивная кустистость, шт.	6,88±0,27	7,08±0,30	2	11,36±0,40	67
Длина колоса, см	12,36±0,22	12,00±0,60	3	13,18±0,20	6
Количество колосков в колосе, шт.	17,24±0,32	18,88±0,29	9	19,56±0,18	13
Количество зерен в колосе, шт.	41,00±1,30	42,52±1,47	3	52,60±1,38	28
Масса зерен в колосе, г	1,59±0,07	1,64±0,08	3	2,14±0,10	34

Таблица 3. Влияние праймирования семян на структуру продуктивности *T. aestivum* сорта Ятрань 60 в полевом опыте

Вариант	Общая надземная масса, кг/м ²	Масса соломы, кг/м ²	Масса зерна, г/м ²	Масса 1000 зерен, г
Контроль	1,58±0,08	1,20±0,07	0,38±0,03	33,90±1,20
Инкрустирование	1,55±0,06	1,17±0,05	0,38±0,04	34,49±1,34
Праймирование + инкрустирование	1,50±0,06	0,88±0,02	0,62±0,03	36,97±1,42

Таблица 4. Влияние праймирования семян на структуру продуктивности *T. aestivum* сорта Володарка в полевом опыте

Вариант	Общая надземная масса, кг/м ²	Масса соломы, кг/м ²	Масса зерна, г/м ²	Масса 1000 зерен, г
Контроль	1,57±0,08	1,17±0,05	0,42±0,04	36,38±1,38
Инкрустирование	1,63±0,10	1,21±0,06	0,42±0,06	37,89±1,41
Праймирование + инкрустирование	1,54±0,07	0,95±0,02	0,59±0,04	38,52±1,35

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОГО ПРАЙМИРОВАНИЯ

с $1,1 \times 10^4$ в контроле до $3,2 \times 10^5$ после инкрустации и $1,2 \times 10^6$ после праймирования и инкрустации (рис. 6). В ризосфере сорта Ятрань 60 число КОЕ амилolitikов возросло с $9,9 \times 10^4$ в контроле до $3,3 \times 10^5$ и $2,2 \times 10^5$ КОЕ при инкрустации и праймировании-инкрустации, соответственно (рис. 7).

Таким образом, анализ двухмесячных растений озимой пшеницы выявил сортоспецифические изменения в композиции ризосферной микрофлоры, вызванные праймированием семян. Как у морозоустойчивого сорта Володарка, так и у сорта Ятрань 60, ГГЛ-праймирование вызывало снижение количества культивируемых азотфиксирующих бактерий. У сорта Володарка ГГП-праймирование также снижало количество культивируемых олигонитрофильных бактерий и нитрификаторов, в то время как количество культивируемых денитрифицирующих и амилolitikических бактерий незначительно повышалось (рис. 6).

В ризосферной микрофлоре сорта Ятрань 60 прайминг в сочетании с инкрустацией вызвали увеличение количества олигонитрофилов, однако незначительно снижали количество нитрифицирующих бактерий I и II групп и амилolitikов (рис. 7). Количество денитрификаторов уменьшалось на два порядка, чего не наблюдалось у сорта Володарка (рис. 6).

Влияние праймирования семян ГГЛ на структуру урожая. Анализ элементов структуры урожая был проведен в фазе полной спелости зерна. У обоих исследуемых сортов выявлено положительное влияние праймирования семян ГГЛ на показатели элементов структуры урожая. Повышение отмечено у сорта Ятрань 60, а именно, выявлено увеличение продуктивной кустистости растений (17,6% в варианте прайминг + инкрустация), количества зерен в одном колосе (22%) и массы зерен в одном колосе (27%) (табл. 1).

У сорта Володарка также зафиксирован положительный эффект праймирования семян ГГЛ (табл. 2). Праймирование семян ГГЛ (100 нг/мл) вызвало рост общей биомассы растений, надземной вегетативной массы и массы зерна (табл. 3, 4). Зафиксировано увеличение массы тысячи зерен. В работах других исследователей показано, что обработка АГЛ меняла соотношение между ауксинами и цитокининами в корнях и побегах *Vigna radiata*, что сопровождалось усилением ростовых процессов (Bai et al., 2012). После праймирования смесью АГЛ, продуцируемых симбиотической азотфиксирующей бактерией *Sinorhizobium meliloti*, в рас-

тениях люцерны были идентифицированы 150 белков, среди которых пептиды и ферменты, задействованные в метаболизме ауксина, а также белки, которые участвуют в формировании защитных реакций, энергетических и метаболических процессах (Mathesius et al., 2003). Внесение АГЛ вызывало изменение соотношения между свободными ауксинами и цитокининами в тканях корней и побегов, что сопровождалось усилением роста. В модельном опыте молекула системы QS оксодеканойлгомосеринлактон индуцировала усиленный базипетальный транспорт ауксина, после чего происходило накопление H_2O_2 и NO, а также стимуляция роста дополнительных корней (Bai et al., 2012). Приведенные данные позволяют предположить, что зафиксированный в наших исследованиях рост показателей структуры урожая, возможно, обусловлен интенсификацией метаболических процессов и изменениями в балансе фитогормонов, вызванными праймированием ГГЛ. В работах других авторов сообщалось об изменении профиля экспрессии генов у растений после обработки растворами АГЛ (Mathesius et al., 2003; Schuegger et al., 2006; Gotz et al., 2007; Orti'z-Castro et al., 2008; von Radet al., 2008; Pang et al., 2009). Так, N-бутаноил-L-гомосеринлактон и ГГЛ усиливали рост корней у арабидопсиса (von Rad et al., 2008). N-деканойл-L-гомосеринлактон индуцировал формирование корневых волосков у арабидопсиса, влиял на архитектуру корней подобно ауксину, однако посредством ауксин-независимого пути (Orti'z-Castro et al., 2008). Выявлена иммуномодулирующая активность высокомолекулярных АГЛ, которая приводила к значительному росту резистентности к бактериальным и грибным патогенам у растений (Schikora et al., 2011; Schenk et al., 2012; Schenk et al., 2014). В нашей работе впервые установлен эффект повышения биомассы и урожайности, а также влияния на микрофлору ризосферы озимой пшеницы среднемолкулярных АГЛ.

Также праймирование положительно влияло на перезимовку растений. В частности, посеы праймированных семян жаростойкого сорта Ятрань 60 весной были значительно гуще по сравнению контролем (рис. 8). Таким образом, праймирование семян пшеницы ГГЛ вызвало улучшение структуры урожая.

Заключение

Гексаноилгомосеринлактон – вещество, обладающее фитостимулирующими свойствами, обработка которым способствует повышению устойчивости и урожайности расте-

ний озимой пшеницы. Праймирование водным раствором ГГЛ семян жароустойчивого сорта Ятрань 60 и морозоустойчивого Володарка вызвали прямой (на растения пшеницы) и косвенный (на ризоферную микрофлору) стимулирующие эффекты. Зафиксированы увеличение продуктивного кущения, количества и массы зерен в одном колосе, общей биомассы растений, надземной вегетативной массы и массы зерна, а также массы 1000 зерен. Исследование косвенного эффекта праймирования в условиях реальной экосистемы выявило качественные и количественные изменения в составе экологических групп ризосферной микрофлоры. Непредвиденным эффектом праймирования оказалось уменьшение количества азотфиксирующих бактерий, что наблюдалось на фоне повышения биомассы и урожайности растений. Этот эффект требует дальнейшего исследования. Поскольку праймирование семян озимой пшеницы в целом оказало положительное воздействие на растения пшеницы, ГГЛ можно рассматривать как перспективный экологический фитостимулятор и фитомодулятор.

Работа поддержана грантом Национальной академии наук Украины целевой комплексной междисциплинарной программой научных исследований «Молекулярные и клеточные биотехнологии для потребностей медицины, промышленности и сельского хозяйства».

ЛИТЕРАТУРА

- Бабаянц Л., Мештергази А., Вехтер Ф. Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ – Прага. – 1988. – 322 с.
- Бабенко Л.М., Щербатюк, М.М., Мошинець О.В., Косаківська І.В. Ацилгомосеринлактоны бактериального происхождения у біотехнології праймування рослин: досягнення і перспективи використання в аграрному виробництві // Физиология растений и генетика. – 2016. – Т. 48, № 6. – С. 463-474.
- Бабенко Л.М., Марин Г.І., Косаківська І.В., Мусатенко Л.І. Вплив зневоднення на ліпоксигеназну активність та ультраструктуру клітин зародкової осі під час проростання насіння квасолі // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, № 4. – С. 305-312.
- Бубряк О.А., Акімкіна Т.В., Дмитрієв О.П., Гродзинський Д.М., Бубряк І.І. Пошук молекулярних маркерів для оптимізації предпосівної обробки (праймування) насіння // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 2 (29). – С. 6-19.
- Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции // Журн. инфектологии. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 4-15.
- Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1996. – 307 с.
- Крестецька С.Л., Нестеренко А.М. Аутоіндукція та сигнальна трансдукція: комунікаторні системи в мікробних популяціях // Annals Mechnicov Inst. – 2007. – № 1. – Р. 4-9.
- Луговая А. А., Карпец Ю. В., Григоренко Д. А., Колмоєц Б. А., Обозный А.И., Мирошниченко Н.Н., Колупаев Ю.Е. Влияние жасмоновой кислоты на продуктивность растений ячменя и их устойчивость к засухе и грибным инфекциям // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2015. – Вип. 3 (36). – С. 54-61.
- Моргун В.В., Санін Є.В., Швартау В.В. Клуб 100 центнерів. – К.: Логос, 2008. – 87 с.
- Мошинець О.В., Косаківська І.В. Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. 1. Структурно-функціональна характеристика ризо-, енто- та фітосфери // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2010а. – Вип. 2 (20). – С. 19-35.
- Мошинець О.В., Косаківська І.В. Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. 2. Фітосфера як екологічна ніша рослинно-мікробних взаємовідносин. функціональна активність мікроорганізмів та їхній вплив на рослини // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2010б. – Вип.3 (21). С. 6-22.
- Мошинець О.В., Штильова С.П., Снайрс Е.Д., Косаківська І.В. Фітосфера *Brassica napus* L. як екологічна ніша для *Pseudomonas fluorescens* SBW25 // Доповіді НАН України. – 2010. – №12. – С. 150-153
- Олексин А., Ботвинко И., Цевкелова Е. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 3. – С. 309-327.
- Теннер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1998. – 175 с.
- Ashraf M., Foolad M. Presowing seed treatment – a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions // Adv. Agron. – 2005. – V. 88. – P. 223-271.
- Bai X., Todd C. D., Desikan R., Yang Y., X. N-3-Oxo-Decanoyl- L-Homoserine-Lactone activates auxin-induced adventitious root formation via hydrogen peroxide- and nitric oxide-dependent cyclic GMP signaling in mung bean // Plant Physiol. – 2012. – V. 158. – P. 725-736.
- Bassler B. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria // Cell. – 2002. – V. 109. – P. 421-424.

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОГО ПРАЙМИРОВАНИЯ

- Beckers G.J., Conrath U.* Priming for stress resistance: From the lab to the field // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2007. – V. 10. – P. 425-431.
- Beckers G.J., Jaskiewicz M., Liu Y., Underwood W.R., He S.Y., Zhang S.* Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell.* – 2009. – V. 21. – P. 944-953.
- Bhattacharjee R.B., Singh A., Mukhopadhyay S.N.* Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – V. 80. – P. 199-209.
- Bruce T.J., Matthes M.C., Napier J.A., Pickett J.A.* Stressful memories of plants: evidence and possible mechanisms // *Plant Sci.* – 2007. – V. 173. – P. 603-608.
- Chhabra S. R., Harty C., Hooi D. S. W., Daykin M., Williams P., Telford G., Pritchard D. I., Bycroft B. W.* Synthetic analogues of the bacterial signal (Quorum Sensing) molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators // *J. Med. Chem.* – 2003. – V. 46. – P. 97-104.
- Conrath U., Pieterse C., Mauch-Mani B.* Priming in plant-pathogen interactions // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 210-216.
- Copley J.* Ecology goes underground // *Nature.* – 2000. – V. 406. – P. 452-454.
- Gonzalez J.E., Marketon M.M.* Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – V. 67. – P. 574-592.
- Jung H.W., Tschaplinski T.J., Wang L., Glazebrook J., Greenberg J.T.* Priming in systemic plant immunity // *Science.* – 2009. – V. 324. – P. 89-91.
- Kloepper J.W., Schroth M.N., Miller T.D.* Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield // *Ecol. Epidemiol.* – 1980. – V. 70, № 11. – P. 1078-1082.
- Luna E., Bruce T.J., Roberts M.R., Flors V., Ton J.* Next-generation systemic acquired resistance // *Plant Physiol.* – 2012. – V. 158. – P. 844-853.
- Mathesius U., Mulders S., Gao M., Teplitski M., Caetano-Anolles G., Rolfe B. G.* Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – P. 1444-1449.
- Miller M.B., Bassler B.L.* Quorum sensing in bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2001. – V. 55. – P. 165-99.
- Moshynets O., Koza A., Dello Sterpaio P., Kordium V., Spiers A.J.* Up-dating the Cholodny method using PET films to sample microbial communities in soil // *Biopolym. Cell.* – 2011. – V. 27. – P. 199-205.
- Mylona, P., Pawlowski K. Bisseling, T.* Symbiotic nitrogen fixation // *Plant Cell.* – 1995. – V. 7. – P. 869-885.
- Natelson S., Natelson E. A.* Preparation of D-, DL- and L-homoserine lactone from methionine // *Microchem. J.* – 1989. – V. 40. – P. 226-232.
- Normander B., Prosser J.L.* Bacterail origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66. – P. 4372-4377.
- Paterson E., Heyes V.* The use of seed priming to improve your sugar beet crop // *Int. Sugar J.* – 2011. – V. 113. – P. 131-133.
- Rasmann S., De Vos M., Casteel C.L., Tian D., Halitschke R., Sun J.Y.* Herb ivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance // *Plant Physiol.* – 2012. – V. 158. – P. 854-863.
- Rendi O.C., Hexcon A., Lourdes M.R.* The role of microbial signals in plant growth and development // *Plant Signal. Behav.* – 2009. – V. 4. – P. 701-712.
- Reynolds M., Ortiz-Monasterio J., McNab A.* Application of physiology in wheat breeding. – Mexico, D.F.: Cimmyt, 2001. – 491 p.
- Rosenblueth M., Martinez-Romero E.* Bacterial endophytes and their interactions with hosts // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2006. – V. 19. – P. 827-837.
- Schenk S., Schikora A.* AHL-priming function via oxylipin and salicylic acid // *Front. Plant Sci.* – 2015. – V. 5 – P. 784-794.
- Schenk S.T., Schikora A.* AHL-priming function via oxylipin and salicylic acid // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 5. – P. 784.
- Schenk S.T., Stein E., Kogel K.H., Schikora A.* Arabidopsis growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules // *Plant Signal. Behav.* – 2012. – V. 7. – P. 178-181.
- Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampothiri K., Soccol C.* α -Amylases from microbial sources an overview on recent developments // *Food Technol. Biotechnol.* – 2006. – V. 44, N 2. – P. 173-184.
- Sjoffjan O., Ardyati T.* Extracellular amylase activity of amylolytic bacteria isolated from Quail's (*Coturnix japonica*) intestinal tract in corn flour medium // *Int. J. Poultry Sci.* – 2011. – V. 10. – P. 411-415.
- Slaughter A., Daniel X., Flors V., Luna E., Hohn, B., Mauch-Mani B.* Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress // *Plant Physiol.* – 2012. – V. 158. – P. 835-843.
- Ton J., Jakab G., Toquin V., Flors V., Iavicoli A., Maeder M.N.* Dissecting the β -aminobutyric acid – induced priming phenomenon in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 2005. – V. 17. – P. 987-999.
- Van der Heijden M.G.A., Bakker R., Verwaal J., Scheublin T.R., Rutten M., Van Logtestijn R., Staehelin C.* Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune

- grassland // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006. – V. 56. – P. 178-187.
- Van Elsas J.D., Tumer S., Bailey M.J. Horizontal gene transfer in the phytosphere // New Phytologist. – 2003. – V. 157. – P. 525-537.
- Van Kammen A. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis // Plant Mol. Biol. Rep. – 1994. – V. 2. – P. 43-45.
- Van Peer P., Punte H.L.M., De Weger L.A., Schippers B. Characterization of root surface and endorhizosphere *Pseudomonas* in relation to their colonization of roots // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – V. 56. – P. 2462-2470.
- Von Rad U., Klein I., Dobrev P.I., Kottova J., Zazimalova E., Fekete A., Hartmann A. Schmitt-Kopplin P., Durner J. Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere // Planta – 2008. – V. 229. – P. 73-85.

Поступила в редакцию
19.01.2017 г.

EFFECTS OF PRESOWING N-HEXANOYL-L-HOMOSERINE LACTONE PRIMING ON FORMATION OF RHIZOSPHERE MICROFLORA AND HARVEST STRUCTURE OF *TRITICUM AESTIVUM* L.

L. M. Babenko¹, O. V., Moshynets², S. P. Rogalsky³,
N. N. Shcherbatiuk¹, O. S. Suslova,⁴ I. V. Kosakivska¹

¹*M.G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

E-mail: lilia.babenko@gmail.com

²*Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

³*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

⁴*D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

N-acyl homoserine lactones (AHLs) belong to the class of bacterial molecules-mediators involved in a signal distance transduction between phytosphere bacteria and directly between bacteria and plants. The aim of our study was to estimate effects of winter wheat seeds priming with N-acylhomoserine lactone of short chain on the formation of rhizosphere microflora and yield structure. In this regard, the AHL middle-size molecule N-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL) was synthesized. HHL water solution was used to prime seeds of new *Triticum aestivum* L. genotypes selected in Ukraine: heat-proof species Yatran 60 and freeze resistant Volodarka. Direct (on wheat plants) and indirect (on rhizosphere microflora) priming effects been revealed. The productive tillering, number and mass of seeds in a spike as well as total plant biomass, overground vegetative and seed mass, and 1000 seeds mass found to be increased. The indirect effects of priming under conditions of real ecosystem showed qualitative and quantitative changes in the composition of ecological groups of rhizosphere microflora. Unexpectedly, there was some reduction of nitrogen-fixing bacteria under priming followed a plant yield increasing. The effect of increase in crop biomass and productivity when nitrogen-fixing bacteria decreased requires a deeper investigation. Since the priming of winter wheat seeds shown positive effect on wheat plants HHL might be considered as a promising ecological phytostimulator and phytomodulator.

Key words: *Triticum aestivum*, N-acyl homoserine lactones, N-hexanoyl-L-homoserine lactone, priming, phytostimulator, phytomodulator, quorum sensing

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОГО ПРАЙМИРОВАНИЯ

ВПЛИВ ПЕРЕДПОСІВНОГО ПРАЙМУВАННЯ N-ГЕКСАНОЇЛ-L-ГОМОСЕРИНЛАКТОНОМ НА ФОРМУВАННЯ РИЗОСФЕРНОЇ МІКРОФЛОРИ І СТРУКТУРУ УРОЖАЙНОСТІ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Л. М. Бабенко¹, О. В. Мошинець², С. П. Рогальський³,
М. М. Щербатюк¹, О. С. Суслова⁴, І. В. Косаківська¹

¹Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України
(Київ, Україна)

E-mail: lilia.babenko@gmail.com

²Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України
(Київ, Україна)

³Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії Національної академії наук України
(Київ, Україна)

⁴Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)

Ацилгомосеринлактони (АГЛ) належать до класу молекул медіаторів бактеріального походження, задіяних у дистанційній трансдукції сигналів між бактеріями-колонізаторами фітосфери і безпосередньо між бактеріями і рослиною. Завданням роботи було оцінити ефекти праймування насіння озимої пшениці розчином коротколанцюгового N-ацилгомосеринлактону на формування ризосферної мікрофлори і структуру врожайності рослин. У зв'язку з цим нами було здійснено хімічний синтез молекул АГЛ середнього розміру – N-гексаноїл-L-гомосеринлактону (ГГЛ), підібрана система розчинення препарату для приготування стокових водних розчинів, визначена ефективна робоча концентрація. Отриманим водним розчином ГГЛ праймували насіння нових генотипів *Triticum aestivum* L. української селекції: жаростійкий сорт Ятрань 60 і морозостійкий Володарка. У результаті проведених досліджень виявлено прямий (на рослини пшениці) і непрямий (на ризосферну мікрофлору) ефекти праймування. Зафіксовані збільшення продуктивного кущіння, кількості і маси зерен в одному колосі, загальної біомаси рослин, надземної вегетативної маси і маси зерна, а також маси тисячі зерен. Дослідження непрямого ефекту праймування в умовах реальної екосистеми виявило якісні і кількісні зміни в складі екологічних груп ризосферної мікрофлори. Непередбаченим ефектом праймування виявилось зменшення кількості азотфіксуючих бактерій, що, тим не менш, спостерігалось на тлі збільшення продуктивності рослин. Цей феномен потребує подальшого дослідження. Оскільки праймування насіння озимої пшениці в цілому позитивно вплинуло на рослини пшениці, ГГЛ можна розглядати як перспективний екологічний фітостимулятор і фітомодулятор.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, N-ацилгомосеринлактони, N-гексаноїл-L-гомосеринлактон, фітостимулятори, фітомодулятори, праймування, quorum sensing