

УДК 579.57.083.3

ВЗАЄМОДІЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *AZOSPIRILLUM* З РОСЛИНАМИ ШОВКОВИЦІ В СИСТЕМІ: ДІАЗОТРОФ–БАГАТОРІЧНА РОСЛИНА

Ю. О. Гончар, І. В. Волкова, О. В. Надкернична

Взаємодія бактерій роду Azospirillum з рослинами шовковиці в системі: діазотроф–багаторічна рослина. — Ю. О. Гончар, І. В. Волкова, О. В. Надкернична. — Показана здатність бактерій роду *Azospirillum* викликати деформації корневих волосків проростків шовковиці, що свідчить про властивість даних бактерій забезпечувати зворотну реакцію рослин шовковиці на інокуляцію. Вперше розроблено модифіковану схему імунізації кролів клітинами азоспірил, що дозволило отримати штамспецифічну антисироватку до штаму *A. brasilense* 54. Виявлена здатність азоспірил проникати у внутрішні тканини коренів дорослих рослин шовковиці.

Ключові слова: *Azospirillum brasilense*, шовковиця, деформації корневих волосків, імунологічні методи.

Адреса: Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН 14033, Україна, м. Чернігів, вул. Шевченко, 97;
e-mail: yugb@rambler.ru

Interaction Azospirillum with plants of mulberry in system: diazotroph – perennial plant. — Y. A. Gonchar, I. V. Volkova, E. V. Nadkernichnaja. — For studying interaction of bacteria sort *Azospirillum* with plants of mulberry antiwhey with a credit 1:32 and a sufficient degree strains specific has been received. It is established, that strain *Azospirillum brasilense* 54 it is capable to penetrate into internal fabrics of roots of plants a mulberry and to occupy paranodules, formed on roots of the given culture under influence 2,4–D.

Key words: *Azospirillum brasilense*, mulberry, paranodules, antiwhey.

Address: Institute of Agricultural UAAS 14027, Shevchenko str., 97, Chernihiv, Ukraine; e-mail: yugb@rambler.ru

Вступ

Фіксація молекулярного азоту є важливим біологічним процесом, який поряд з фотосинтезом забезпечує існування життя на нашій планеті. Незаперечною роллю в цьому процесі відіграють азотфіксуючі мікроорганізми, взаємовідносини яких з рослинами настільки різноманітні, що продовжують залишатися пріоритетним напрямком досліджень сучасної мікробіології, генетики, біохімії і фізіології рослин [10, 14, 18].

На сьогодні не існує єдиної думки відносно просторової локалізації діазотрофів в кореневій зоні рослин [3, 13]. Найбільш перспективним, на наш погляд, є застосування для інокуляції рослин діазотрофів, що здатні до ендоситі. Така асоціація забезпечує більш тісну, а тому, і більш ефективну взаємодію бактерій з рослиною та більшу стійкість щодо несприятливих умов навколишнього середовища. Відомо, що бактерії родів *Azospirillum* [11, 12, 17], *Bacillus* [15], *Clostridium* [9], *Azotobacter* [20], *Pseudomonas* [16] здатні проникати в зону гістосфери, розмножуватись там і фіксувати атмосферний азот.

Мета нашої роботи – вивчити здатність бактерій роду *Azospirillum* викликати зворотну реакцію рослин шовковиці на інокуляцію та з'ясувати можливість проникнення даних бактерій у внутрішні тканини коренів шовковиці.

Матеріали та методики

Початкові етапи взаємодії штамів азоспірил з рослинами шовковиці вивчали в умовах лабораторних дослідів. Простерилізоване насіння інокулювали бактеріальною суспензією *A. brasilense* 54, з титром 200 тис. клітин на одну насінину. Через 5–10 діб після інокуляції коріння проростків довжиною 1 см мікроскопували і підраховували кількість морфологічно змінених корневих волосків [4].

Визначали здатність бактерій проникати у внутрішні тканини коренів шовковиці, використовуючи метод генетичного маркування популяцій [2]. Антибіотикостійкі мутанти отримували за методом Зибальського [6], використовуючи градієнт концентрації стрептоміцину в агарі.

Дослідження взаємодії діазотрофів з рослинами шовковиці проводили також за допомогою імунологічних методів [5, 7, 19]. Тварин імунізували відмитою фізіологічним розчином бактеріальною суспензією з оптичною густиною $D_{660\text{nm}}=1,3$, що відповідає концентрації 3×10^{10} кл/мл. Як адьювант використовували мантанід ISA 25. Нами запропонована модифікована схема імунізації, за якою була отримана штамспецифічна антисироватка з титром 1:32 в реакції преципітації і 4×10^5 в реакції твердофазного імуноферментного аналізу.

Результати та їх обговорення

Характер взаємодії *Azospirillum brasilense* з рослинами шовковиці при утворенні ефективних асоціацій вивчали з перших етапів розвитку мікробно-рослинних взаємовідносин.

Вивчення зміни морфології корневих волосків під впливом інокуляції проростків шовковиці штамми азоспірил показало, що дані бактерії здатні викликати деформації корневих волосків. Ми спостерігали деформовані кореневі волоски: скручені у вигляді спіралі, гачковидно зігнуті та булавовидні кореневі волоски в результаті інокуляції проростків азоспірилами, що свідчить про здатність бактерій викликати зворотну реакцію рослин шовковиці [1, 8].

Визначали вплив інокуляції азоспірилами насіння шовковиці на кількість деформацій корневих волосків проростків даної культури. Штами *A. brasilense 53*, *A. brasilense 54* і *A. brasilense 61* забезпечили достовірне підвищення кількості морфологічних змін корневих волосків в порівнянні з контролем в 6,6 – 7,8 разів (рис. 1).

З метою визначення здатності азоспірил проникати у внутрішні тканини кореня шовковиці було отримано стрептоміцинстійкий штам *A. brasilense 54*, який не відрізнявся від вихідного штаму по культурально-морфологічним і фізіологічним ознакам і належав до S-типу. Не змінилась також нітрогеназна активність мутантної культури та її здатність позитивно впливати на продуктивність сянців шовковиці.

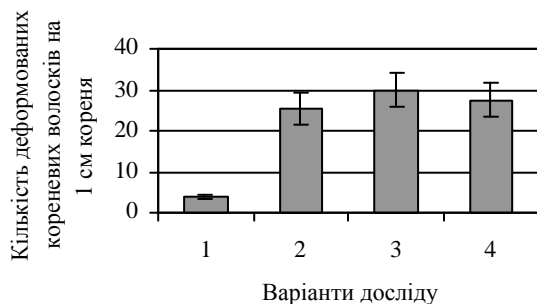


Рис. 1. Вплив інокуляції проростків шовковиці бактеріальними суспензіями азоспірил на кількість деформованих корневих волосків; 1 – контроль, 2 – *A. brasilense 53*, 3 – *A. brasilense 54*, 4 – *A. brasilense 61*.

Fig. 1. Influence of processing of sprouts of a mulberry by bacterial suspensions *Azospirillum* on quantity of the deformed root hair; 1 – the control, 2 – *A. brasilense 53*, 3 – *A. brasilense 54*, 4 – *A. brasilense 61*.

Через 60 днів після інокуляції з поверхнево стерилізованого коріння були виділені реізольати

стрептоміцинстійких мутантів, що доводить здатність азоспірил проникати у внутрішні тканини рослин шовковиці.

Для підтвердження здатності досліджуваного штаму проникати в тканини коренів рослин шовковиці паралельно з методом генетичного маркування ми використовували імунологічні методи. Застосовуючи модифіковану нами схему імунізації кролів, була отримана штамоспецифічна антисироватка з титром 1:32 в реакції преципітації і 4×10^5 в реакції твердофазного імуоферментного аналізу, що дозволило використати її для дослідження можливості проникнення штаму *Azospirillum brasilense 54* у внутрішні тканини коренів шовковиці. З поверхнево стерилізованих коренів через 16 місяців після інокуляції були виділені ізоляти №1, 2, 3, 4, 5, з коренів рослин шовковиці через 4 місяці після інокуляції – ізоляти №6, 7, 8. Ізоляти №1, 2, 6 утворювали смуги преципітації зі штамоспецифічною антисироваткою.

Твердофазний імуоферментний аналіз (ТІФА) проводили на полістиролових планшетах в непрямому варіанті. (табл. 1). Аналіз представлених даних дозволяє зробити висновок, що ізоляти №1, 2, 6 відповідають штаму *A. brasilense 54*.

Таким чином, результати ТІФА свідчать про те, що азоспірили здатні проникати в корені рослин шовковиці та зберігати життєздатність протягом 16 місяців після інтродукції бактерій в кореневу зону цієї культури.

Таблиця 1. Результати імуоферментного аналізу ізолятів бактерій, виділених з коренів дерев шовковиці.

Table 1. Results of the enzyme-linked immunosorbent assay of the bacteria allocated from roots of trees of a mulberry.

Зразки	ТІФА	
	ОГ, 492-нм	ОГзразка/ОГ(-)*
Позитивний контроль (<i>A. brasilense 54</i>)	2,984	4,76
Негативний контроль (<i>A. brasilense Sp7</i>)	0,627	1,0
Ізолят №1	2,859	4,56
Ізолят №2	2,947	4,70
Ізолят №3	0,622	0,99
Ізолят №4	0,531	0,85
Ізолят №5	0,645	1,03
Ізолят №6	2,937	4,68
Ізолят №7	0,492	0,78
Ізолят №8	0,528	0,84
Ізолят №9	0,486	0,78

*– Співвідношення ОГ досліджуваного зразка до ОГ негативного контролю.

1. Егоренкова И. В., Коннова С. А., Скворцов И. М., Игнатов В. В. Исследование начальных этапов взаимодействия бактерий *Azospirillum brasilense* с корнями проростков пшеницы: адсорбции, деформации корневых волосков // Микробиология. – 2000. – Т. 69, №1. – С. 120–126.

2. Элементы регуляции в растительности: 36. науч. пр.– К.: Компас, 1998. – 360 с.

3. Емцев В. Т., Чумаков М. И. Критерии ассоциативности для бактерий, находящихся в diazотрофном биоценозе с небобовыми

- выми растениями. // Микробиол. журн. – 1988. – Т. 50, №3. – С. 93–102.
4. Коннова С. А. Полисахаридсодержащие биополимеры бактерий рода *Azospirillum*: разнообразие химического строения и функций: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 09.00.08 / Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. – М., 2003. – 43 с.
 5. Макарова Н. М., Чуваева Н. А., Кравченко Л. В. Изучение серологических свойств бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. – 1991. – Т. 60, №1. – С. 132–138.
 6. Методы общей бактериологии / Ф. Герхардт, Р. Г. И. Мюррей, Р. Н. Костилоу и др.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – Т. 2. – 466 с.
 7. Никитин В. М. Справочник методов иммунологии. – Кишинев: Штиинца, 1982. – 304 с.
 8. Федоненко Ю. П., Егоренкова И. В., Коннова С. А., Игнатов В. В. Участие липополисахаридов азоспирилл во взаимодействии с поверхностью корней пшеницы // Микробиология. – 2001. – Т. 70, №3. – С. 384–390.
 9. Чумаков М. И., Иванова Л. Ю., Емцев В. Т. Модифицированный метод выделения ассоциативных азотфиксирующих бактерий из корней злаков // Изв. ТСХА. – 1986. – № 6. – С. 122–128.
 10. Anderson A. Understanding plant–microbe communication // Utah Sci. – 1986. – Vol. 47, № 1. – P. 6–8.
 11. Bashan Y. Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary depression of rhizosphere microflora // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 51, № 5. – P. 1067–1071.
 12. Bashan B. Y., Levany H., Klein E. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots // J. Gen. Microbiol. – 1986. – Vol. 132, № 11. – P. 3069–3073.
 13. Dobereiner J. Nitrogen fixation in grass bacteria associations in the tropical // Isotopes Biol. Denitrogen Fixat. Proc. (Vienna, 1977). – Vienna, 1978. 7 – P. 51–69.
 14. Gough C., Vasse J., Galera C. et al. Interactions between bacterial diazotrophs and non-legume dicots *Arabidopsis thaliana* as a model–plant // Plant Soil. – 1997. – Vol. 194, № N 1–2. – P. 123–130.
 15. Klucas R. V., Dobereiner J. Grasses wheat, maize and sorghum–position paper // Associative Nitrogen Fixation / Ed. P. V. Vose, A. P. Rushell. – Boca Raton: CRC–press. – 1981. – Vol. 2. – P. 243–254.
 16. Lynch J. M. Soil biotechnology, microbiology factors in crop productivity: Blackwell Scientific Publication. – 1983. – 191 p.
 17. Magalhaes F. M. M., Patriquin D., Dobereiner J. Infection of field grown maize with *Azospirillum spp.* // Rev. Brazil. Biol. – 1979. – Vol. 39, № 3. – P. 587–596.
 18. Manguiat I. I., Mendoza D. M., Tilo S. N. Influence of the legume – rhizobia symbiosis of the nitrogen economy of a legume – based cropping system // Philipp. Agriculturist. – 1985. – Vol. 68, № 1. – P. 44–55.
 19. Ouchterlony O. Antigen–antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. – Acta pathol. et microbial. Scand., 1953, 32, №2. – P. 231–240.
 20. Sharma S., Jain N., Stah A. Occurrence of *Azotobacter chroococcum* in *Pothes scandeus* // Curr. Sci. (India). – 1985. – Vol. 54, № 3. – P. 142–143.

Отримано: 25 січня 2006 р.

Прийнято до друку: 19 травня 2006 р.