

електронно-транспортного пути показало устойчивость этих общих параметров функционирования митохондрий к действию моделированной микрогравитации.

*Ключевые слова:* клинотатирование, митохондрии, ультраструктура, тканевое дыхание

V.O. Brykov

Institute of Botany of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

#### MITOCHONDRIAL ULTRASTRUCTURE AND PEA ROOT TISSUE RESPIRATION IN SIMULATED MICROGRAVITY

We investigated the mitochondria ultrastructure in different zones of *Pea* root under clinorotation. The condensation of mitochondria was found only in the distal elongation zone of the root. *In vivo* investigations of total oxygen uptake by the root apexes as well as capacity of alternative pathway have shown that above parameters of mitochondria functioning are tolerant to the impact of simulated microgravity.

*Key words:* clinorotation, mitochondria, ultrastructure, root tissue respiration

Рекомендує до друку

Надійшла 22.09.2010

М.М. Барна

УДК 581.557:582.739

А.В. ВІТЕР, Н.Е. ЕЛЛАНСЬКА, О.В. ЗАКРАСОВ, Г.І. КРИВОРЧУК, О.П. ЮНОШЕВА

Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України  
вул. Тимірязєвська, 1, Київ, 01014

### **РОЗВИТОК КОРЕНІВ І КОРЕНЕВИХ БУЛЬБОЧОК У СИМБІОТИЧНІЙ СИСТЕМІ ЛЮЦЕРНА ПОСІВНА – SINORHIZOBIUM MELILOTI ПІД ВПЛИВОМ КЛІНОСТАТУВАННЯ**

Вивчали закономірності впливу кліностатування на морфометричні показники коренів рослин люцерни посівної сорту Ярославна, вирощеної з насіння, інфікованого спонтанно малопродуктивними щодо азотфіксації дикими формами ризобій й інокульованого *Sinorhizobium meliloti* високоефективного штаму 441, а також бульбочок на коренях. Встановлено, що в умовах імітованої мікрогравітації пригнічується ріст кореня між 30-ою та 50-ою добами з моменту висіву насіння порівняно зі стаціонарним варіантом. Відзначено, що кліностатування помітно не впливає на кореневі бульбочки як спеціалізований орган азотфіксації. Умови належного азотного забезпечення як результат взаємодії люцерни посівної з ризобіями вказаного штаму сприяють прояву ефектів кліностатування.

*Ключові слова:* *Medicago sativa* L., *Sinorhizobium meliloti*, кліностатування, кореневі бульбочки, морфометричні показники

Незважаючи на те, що різні рослинні організми використовували як об'єкти для вивчення впливу мікрогравітації, комплексні дані щодо розвитку азотфіксуючих біосистем в цих умовах досить обмежені [1, 6-8, 11]. Результати окремих раніше проведених досліджень за умов мікрогравітації дали змогу виявити певні відмінності структурних показників рослин [3, 4, 8]. Автори вважають, що однією з причин таких відхилень можуть бути порушення, пов'язані з живленням рослин у цих умовах.

Бобово-ризобіальні симбіози з властивою їм азотфіксацією представляють науковий інтерес, перш за все, для розробки і впровадження нових технологій удобрення рослин в

закритих системах життєзабезпечення в умовах мікрогравітації, що дозволить створити адекватний режим живлення рослин в цих умовах. Виходячи з цього, ми спробували дослідити вплив кліностатування на кореневу систему рослин люцерни посівної *Medicago sativa* L. за умов як спонтанного інфікування в процесі взаємодії рослин з дикими формами бактерій, які майже завжди присутні на поверхні насіння і під насінною шкіркою, так і інокуляції штамом бульбочкової бактерії *Sinorhizobium meliloti* 441 за походженням із музейної колекції. Метою цієї роботи було дослідження ростових показників коренів люцерни та особливих утворень, в яких відбувається фіксація азоту, – корневих бульбочок.

### Матеріал і методи досліджень

В експериментах була використана люцерна посівна *Medicago sativa* L. сорту Ярославна (насіння із селекційного розсадника ННЦ «Інститут землеробства» УААН) і азотфіксувальна бактерія *Sinorhizobium meliloti* (штам 441) (музейна колекція ІФРГ НАН України). Рослини вирощували з пророщеного (2 доби) насіння, інокульованого вищезгаданим штамом. Контролем слугували рослини, що інфікувалися спонтанно, оскільки попередня поверхнева обробка насіння 70 %-им етиловим спиртом не забезпечувала повної стерилізації диких форм бульбочкових бактерій.

В роботі використовували повільні 3D кліностати, які здатні відтворювати низку ефектів мікрогравітації (окрім скалярної складової гравітації, якої неможливо позбавитися на Землі) [2]. Швидкість обертання кліностатів по одній осі складала 0,11, по іншій – 0,48 об./хв. Рослини вирощували на мінеральному волокнистому субстраті Grodan (Нідерланди). Полив рослин здійснювали безазотним живильним середовищем [5]: під час посіву давали насичувальну дозу, а під час досліду вологість субстрату підтримували на рівні 600 % за масою. Фотоперіод рослин складав 15:9 год (світло:темрява). Для освітлення використовували люмінесцентні лампи (1230 лм), які закріплювали на відстані 23 см від поверхні субстрату, де росли рослини в усіх варіантах експериментів. Освітленість на рівні поверхні субстрату становила 4 клк.

Наші двохфакторні експерименти склалися з чотирьох варіантів: 1) стаціонар (контроль)+спонтанне інфікування, 2) стаціонар (контроль)+інокуляція *S. meliloti* штаму 441, 3) кліностатування+спонтанне інфікування та 4) кліностатування+ інокуляція *S. meliloti* штаму 441. Експерименти проводили протягом різних місяців: жовтень-листопад, січень-лютий, квітень-травень, червень-липень, але за єдиним протоколом.

З метою аналізу корені та кореневі бульбочки відбирали від субстрату з рослин 30- і 50-добового віку. Визначали абсолютно суху масу коренів. Кореневі бульбочки фіксували в 70 %-ому етанолі, а потім фотографували з використанням світло-оптичного мікроскопу Axios Zeiss Primo Star (Німеччина). Розміри бульбочок на отриманих фотографіях вимірювали за допомогою програмного додатку ПД UTSCSA Image Tool 3.00.

Азотфіксувальну здатність рослин визначали ацетиленовим методом [9]. Рослини поміщали в герметично закриті флакони зі скла об'ємом 75 см<sup>3</sup>, у яких створювали 10 %-у концентрацію ацетилену. Після 24-годинної інкубації газову суміш аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6850 з полуменево-іонізаційним детектором. Розділення газів проводили на колонці (0,40x130 см) із Porapak N за температури 80 °С. Газоносієм був гелій (20 мл/хв.). Об'єм аналізованої проби газової суміші становив 1 см<sup>3</sup>. За стандарт використовували чистий етилен. Для математичної обробки результатів застосовували програмний додаток Microsoft Excel 2003.

### Результати досліджень та їх обговорення

Кореневі бульбочки у рослин люцерни, інокульованих штамом 441, мали характерну пігментацію – від світло-червоної до бурої, тоді як у спонтанно заражених рослин вони були білими.

Корені рослин стаціонарного контролю та тих, що сформувалися в умовах кліностатування (імітованої мікрогравітації), мали різний характер розміщення в контейнерах: розташування основної частини коренів цілком обумовлювалося різним розподілом поживного розчину по всьому об'єму контейнерів. Так, у стаціонарі коренева система стрімко пронизувала

верхні шари субстрату і формувала розгалужений корінь у нижніх шарах субстрату, часто навіть безпосередньо на дні контейнера. Під впливом кліностакування галуження коренів було дещо слабшим, але коренева система перерозподілялася більш-менш рівномірно по об'єму контейнера. Це пояснюється, вірогідно, тим, що двоосьове обертання кліностаку сприяло більш рівномірному розподілу живильного розчину по об'єму контейнера, а відтак усувало його накопичення на дні. Варто відзначити, що кореневі бульбочки також завжди формувалися у місцях найбільшого скупчення вологи як на добре розвинених, так і на молодих коренях.

Аналіз даних сухої маси коренів показав, що корені 30-добового віку, які сформувалися в кліностаковому варіанті зі спонтанним інфікуванням були легшими, ніж в такому ж варіанті (без інокуляції штамом 441) стаціонарного контролю на 54 %, а з проведенням інокуляції – на 32% (таблиця). Суха маса кліностакованих коренів спонтанно заражених рослин 50-ти добового віку зменшувалась на 32 %, з інокуляцією штамом 441, навпаки, збільшувалась на 79 %. Чіткої тенденції щодо зміни маси коренів під дією припосівної інокуляції виявлено не було.

Отримані результати свідчать про певне пригнічення розвитку коренів в умовах кліностакування. Можна припустити, що зниження сухої маси коренів у варіантах з використанням інокуляції штамом 441 є результатом достатнього забезпечення рослин азотом, внаслідок чого рослини не потребували значного розростання коренів.

Таблиця

Характеристики коренів і корневих бульбочок люцерни посівної в досліді з довготривалим кліностакуванням

Показники	30 діб після посіву				50 діб після посіву			
	за умов спонтанного інфікування		за інокуляції <i>S. meliloti</i> штаму 441		за умов спонтанного інфікування		за інокуляції <i>S. meliloti</i> штаму 441	
	Стаціонар	Кліностакування	Стаціонар	Кліностакування	Стаціонар	Кліностакування	Стаціонар	Кліностакування
Суха маса кореня рослини, мг	3,23± 0,62	1,50± 0,50	1,54± 0,35	1,05± 0,31	7,86± 2,68	5,39± 1,80	5,83± 1,96	10,42± 3,39
Співвідношення між сухими масами пагонів і коренів рослин	3,0± 0,8	12,9± 3,1	4,8± 1,6	8,7± 2,7	0,9± 0,3	2,1± 0,7	1,7± 0,6	1,5± 0,4
Кількість бульбочок на одну рослину, шт	28	39	27	35	75	62	55	72
Об'єм бульбочки (середній / інтервал варіювання), мм <sup>3</sup>	0,48± 0,10 / 6,6·10 <sup>-3</sup> ...4,4	0,47± 0,09 / 7,8·10 <sup>-3</sup> ...5,4	0,30± 0,04 / 3,8·10 <sup>-3</sup> ...3,1	0,31± 0,04 / 0,03 ...1,8	0,62± 0,13 / 4,4·10 <sup>-3</sup> ...9,1	0,56± 0,12 / 8,5·10 <sup>-3</sup> ...3,5	0,31± 0,07 / 2,4·10 <sup>-3</sup> ...3,0	0,25± 0,05 / 2,0·10 <sup>-3</sup> ...9,1
Об'єм бульбочок на 1 мг сухої маси кореня, мм <sup>3</sup>	0,33± 0,07	1,25± 0,25	0,75± 0,10	0,88± 0,11	0,78± 0,19	1,07± 0,26	0,38± 0,09	0,55± 0,12
Ацетилен відновлювальна активність, нмоль/(рослина·год)	0	0,01	1,23± 0,47	0,37± 0,14	0	0,01	1,23± 0,33	1,77± 0,16

У серії проведених нами дослідів для спонтанно інфікованих рослин було відзначено відносно стале співвідношення між сухими масами пагона та кореня у стаціонарі на 30-у добу (3,0) і виражена тенденція його зростання під дією кліностакування – на 330 %. Рослини стаціонару, інокульовані штамом 441, характеризувалися вищим значенням цього співвідношення (4,8), до того ж кліностакування призводило до його зростання на 45 %. На 50-у добу в проведених нами дослідях у всіх варіантах даний показник виявився дуже варіабельним, тим не менше можна було помітити тенденції щодо його зміни в умовах

імітованої мікрогравітації порівняно зі стаціонаром. У рослин, неінокульованих ефективним штамом ризобій, у результаті кліноштатування співвідношення пагін:корінь за масою зросло на 122 %, в інокульованих воно в деяких експериментах залишалося на одному рівні зі стаціонаром. Дія інокуляції в стаціонарі сприяла зростанню сухої маси пагона відносно кореня на 85 %, на кліноштані – зниженню на 28 %. У більшості варіантів відбувалося зниження масового співвідношення пагона до кореня між 30-ою та 50-ою добами, при чому найвиразнішим таке зниження було в кліноштатованих рослин, інфікованих спонтанно, (в 6,1 разів). Ми схильні вважати, що за рахунок симбіозу люцерни із ризобіями посилюється ріст надземних органів й одночасно гальмується надмірне розростання кореня, яке можна розглядати як реакцію на нестачу азоту в субстраті. Сформовані бульбочки на коренях люцерни спостерігалися як поодинокі, так і у вигляді намисто- і гроноподібних скупчень.

Одним із показників, залучених нами для аналізу, була кількість сформованих бульбочок, проте виявлялася значна розбіжність даного показника в різних експериментах. Тому ми використали більш інформативні дані: лінійні розміри кореневих бульбочок. У всіх варіантах виявлено значне коливання об'ємів бульбочок (таблиця): великі величини характеризують гроноподібні скупчення, в яких неможливо виокремити межі кожної з бульбочок. Протягом періоду від 30-ої до 50-ої доби середній об'єм бульбочки на коренях стаціонару зі спонтанним зараженням на 30 %<sub>2</sub> тоді як на кліноштані також за умов спонтанного інфікування – на 13 %. Інокуляція штамом 441 призводила, навпаки, до зменшення середнього об'єму бульбочки за умов кліноштатування на 19 % – це відбувалося за рахунок нових (утворених за цей проміжок часу) органів азотфіксації, що мали невеликі розміри.

В нашій роботі здійснювалась оцінка розмірів кореневих бульбочок не тільки за середнім об'ємом, а й за часткою бульбочок різних категорій об'ємів (до 0,01 мм<sup>3</sup>, від 0,01 до 0,1 мм<sup>3</sup>, від 0,1 до 1 мм<sup>3</sup> і понад 1 мм<sup>3</sup>) у загальній вибірці (рис.). Цей спосіб аналізу свідчить про те, що в усіх варіантах досліду як на 30-у, так і на 50-у добу після посіву об'єм переважної частини органів азотфіксації припадає на інтервал від 0,1 до 1 мм<sup>3</sup>. Кліноштатування незалежно від шляху інфікування кореня та віку рослин призводило до зменшення відносної кількості бульбочок найбільшого з перелічених класів; до того ж у 50-добових рослин під впливом імітованої мікрогравітації збільшувалася частка дрібних бульбочок – тих, які мали об'єм до 0,1 мм<sup>3</sup>. Це дає підстави думати, що дія кліноштатування сприяє не тільки росту, але й закладанню нових бульбочок (не виключено, що також і більш пролонгованому інфікуванню коренів ризобіями).

Рослини в більшості варіантів і повторностей досліду значно відрізнялися як за масою коренів, так і за кількістю сформованих на них бульбочок. З цієї причини ми вважали параметр об'єму кореневих бульбочок, який припадав на одну рослину, непоказовим. Спостереження показали, що значно надійнішим параметром був об'єм кореневих бульбочок, перерахований на одиницю сухої маси кореня. В 30-добових рослин кліноштатування сприяло зростанню цього параметру: за спонтанного зараження – на 275 %, за інокуляції штамом 441 – на 17 %, а в 50-добових відповідно на 24 і 45 %. Зазначимо, що на відміну від спонтанно інфікованих рослин, результатом взаємодії досліджуваних рослин із штамом 441 було зниження співвідношення об'єм бульбочки:суха маса кореня з 30-ої по 50-у добу вегетації в стаціонарі на 48 %, на кліноштані – на 37 %. Не виключено, що причиною цього є те, що ризобії штаму 441 порівняно з дикими формами не пригнічують ріст кореня такою мірою, оскільки є менш агресивним щодо використання ресурсів макросимбіонта.

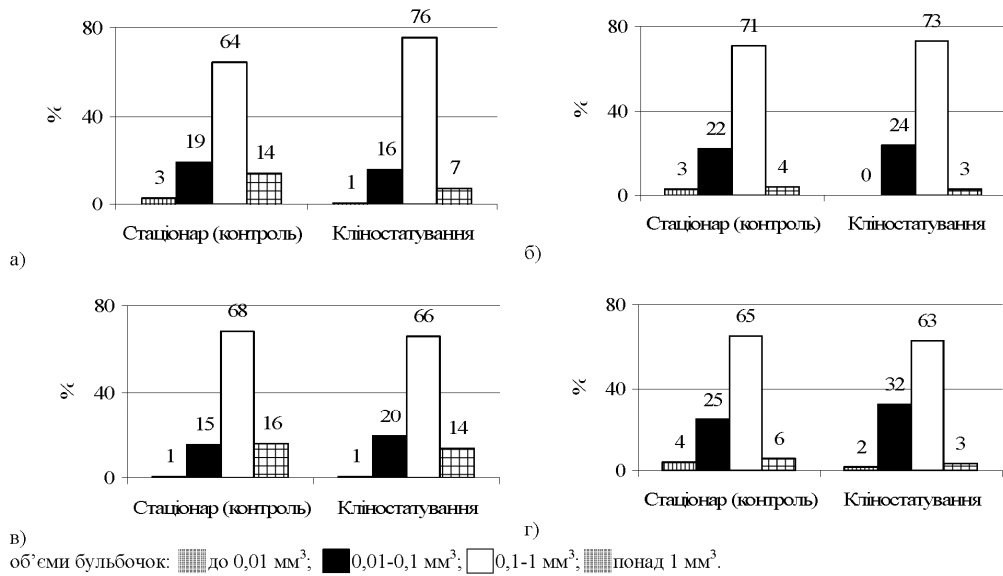


Рис. Частка бульбочок (% до загальної кількості) різних категорій об'ємів у загальній вибірці: а) 30 діб після посіву, спонтанна інокуляція; б) 30 діб після посіву, інокуляція *S. meliloti* (штам 441); в) 50 діб після посіву, спонтанна інокуляція; г) 30 діб після посіву, інокуляція *S. meliloti* (штам 441)

У попередньому досліді було зафіксовано низьку активність нітрогенази, яка відповідає за азотфіксацію, за спонтанного зараження та значно вищу активність цього ферменту у випадку інокуляції штамом 441. За умов кліностакування рівень фіксації азоту виявився нижчим порівняно зі стаціонарним варіантом у 30-добових і вищим у 50-добових рослин люцерни посівної, що можна пояснити поступовою адаптацією симбіотичної системи до умов імітованої мікрогравітації.

### Висновки

Проведені нами дослідження симбіозів люцерни посівної з дикими формами і високоефективним штамом ризобій в умовах кліностакування показали, що ріст кореня визначається насамперед розподілом живильного середовища по об'єму контейнера і наявністю доступних для рослин форм азоту. Неприятливі режими водного й азотного забезпечення є причиною посиленого росту кореня, а крім того зниження частки пагона в загальній масі рослин. Важливим фактором формування кореневих бульбочок є зволоження субстрату. Покращення водного режиму субстрату в результаті кліностакування стимулює процеси формування та росту бульбочок як наслідок взаємодії як із дикими формами ризобій, так і зі штамом 441. Це відбувається шляхом збільшення кількості новоутворених бульбочок за імітації мікрогравітації у рослин віком від 30 до 50 діб. Морфометричні спостереження за симбіотичною системою люцерна посівна сорту Ярославна – *S. meliloti* штаму 441, доповнені аналізом нітрогеназної активності, свідчать, що вказаний штам за умов кліностакування є ефективним у відновленні азоту й оптимізує ріст макросимбіонта. Вибрану нами пару симбіонтів можна рекомендувати для подальших вивчень дії імітованої та дійсної мікрогравітації на бобово-ризобіальні симбіози.

1. *Влияние невесомости на цератоптерис Azolla* / Э.Я. Шепелев, Х.Т. Нгуэн, В.А. Кордюм [и др] // Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1982. – Т. 16, № 6. – С. 66–68.
2. *Кордюм Е.Л.* Условия микрогравитации – экспериментальная основа для познания роли гравитации в онтогенезе растений / Е.Л. Кордюм // Экология та ноосферология. – 2009. – Т. 20, № 1-2. – С. 20–23.
3. *Левинских М.А., Сычев В.Н., Подольских И.Г.* Исследования онтогенеза, репродукции и метаболизма высших растений в серии экспериментов в оранжерее "Свет" на борту ОК "Мир" // Мат. XII конфер. "Космическая биология и авиакосмическая медицина. – М., 2002. – С. 208–209.
4. *Меркис А.И.* Полный цикл индивидуального развития растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на борту орбитальной станции Салют-7 / А.И. Меркис, Р.С. Лауринавичюс // Доклады АН СССР – 1983. – Т. 271. – С. 509–512.

5. Шильникова В.К. Влияние кислотности среды на процесс инфицирования клевера клубеньковыми бактериями / В.К. Шильникова, Н.М. Нестерова // Известия АН СССР, серия биологическая. – 1969. – № 3. – С. 445–448.
6. *Binding of isolated plant lectin by rhizobia during episodes of reduced gravity obtained by parabolic flight* / [R.L. Henry, P.D. Green, P.P. Wong, J.A. Guikema] // *Plant Physiology*. – 1990. – Vol. 92. – P. 262–264.
7. *Changes in symbiotic and associative interrelations in a higher plant-bacterial system during space flight* / V.A. Kordyum, V.G. Man'ko, A.F. Popova [et al.] // *Advances in space research*. – 1983. – Vol. 3, No 9. – P. 265–268.
8. *Clover development during spaceflight: a model system* / J.A. Guikema, L. DeBell, A. Paulsen [et al.] // *Advance in Space Researches*, 1994. – Vol. 14, No. 8. – P. 173–176.
9. *N<sub>2</sub> fixation laboratory and field evaluation* / R.W.F. Hardy, R.D. Holston, E.K. Jackson, R.C. Burns // *Plant Physiology*. – 1968. – Vol. 43, No 8. – P. 1185–1207.
10. *Spaceflight effects on consecutive generations of peas grown onboard the Russian segment of the International Space Station* / V. N. Sychev, M. A. Levinskikh, S. A. Gostimsky [et al.] // *Acta Astronautica*. – 2007. – Vol. 60. – P. 426–432.
11. *Urban J.E. Effect of microgravity on the binding of acetylsalicylic acid by Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* / J.E. Urban, R. Gerren, J. Zoelle // *Acta Astronautica*, 1995. – Vol. 36, No. 2. – P. 129–133.

*A.V. Viter, N.Э. Элланская, A.V. Закрасов, Г.И. Криворчук, Е.П. Юношева*

Национальный ботанический сад им. Н.Н.Гришко НАН Украины, Киев

#### РАЗВИТИЕ КОРНЕЙ И КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ В СИМБИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЛЮЦЕРНА ПОСЕВНАЯ – SINORHIZOBIUM MELILOTI ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ

Изучали закономерности влияния клиностатирования на морфометрические показатели корней растений люцерны посевной, выращенной из семян, инфицированных спонтанно малопродуктивными относительно азотфиксации формами ризобий и инокулированных *Sinorhizobium meliloti* высокоэффективного штамма 441, а также клубеньков на корнях. Установлено, что в условиях имитированной микрогравитации подавляется рост корня между 30-ми и 50-ми сутками с момента высева семян по сравнению со стационарным вариантом. Отмечено, что клиностатирование заметно не влияет на корневые клубеньки как специализированный орган азотфиксации. Условия надлежащего азотного обеспечения как результат взаимодействия люцерны посевной с ризобиями указанного штамма способствуют проявлению эффектов клиностатирования.

*Ключевые слова: Medicago sativa L., Sinorhizobium meliloti, клиностатирование, корневые клубеньки, морфометрические показатели*

*A.V. Viter, N.E. Ellan'ska, O.V. Zakrasov, H.I. Kryvorchuk, O.P. Yunosheva*

M.M.Gryshko National Botanical Garden, NAS of Ukraine, Kyiv

#### DEVELOPMENT OF ROOTS AND NODULES IN MEDICAGO SATIVA – SINORHIZOBIUM MELILOTI SYMBIOTIC SYSTEM, INFLUENCED WITH CLINOROTATION

Regularities for clinorotation effects on morphometric parameters of roots of alfalfa cv. Yaroslavna, grown from spontaneously infected by wild non-effective in nitrogen-fixation rhizobia forms and from *Sinorhizobium meliloti* str. 441 inoculated seeds, as well as nodules were studied. Root growth from 30<sup>th</sup> to 50<sup>th</sup> day since time of sowing was established to be depressed by simulated microgravity conditions. Noticeable impacts of clinorotation on nodules as specialized nitrogen-fixing organs were no observed. We conclude that proper nitrogen nutrition (resulted by alfalfa – *S. meliloti* str. 441 interaction) facilitates manifestations effects of clinorotation.

*Key words: Medicago sativa L., Sinorhizobium meliloti, clinorotation, nodules, morphometric parameters*

Рекомендує до друку

Надійшла 22.09.2010

М.М. Барна