

**У. Я. Стамбульська, В.І. Лушчак**

Прикарпатський національний університет  
імені В. Стефаника, вул. Шевченка, 57, Івано-Франківськ, 76025, Україна,  
тел.: 8 (03422) 714 683, e-mail: lushchak@pu.if.ua

## **ВПЛИВ БАКТЕРІЙ РОДУ *RHIZOBIUM* НА КОНЦЕНТРАЦІЮ ПІГМЕНТІВ І КРОХМАЛЮ У РОСЛИН ГОРОХУ**

*Вивчено вплив інокуляції бульбочковими бактеріями роду *Rhizobium* на концентрацію пігментів і крохмалю у рослин гороху посівного – *Pisum sativum* L. На початкових етапах онтогенезу гороху концентрація хлорофілу а і антоціанів була більшою, порівняно з контролем у всіх інокульованих бактеріями рослин. Обробка місцевими штамами RRL7, RRL8, RRL11 і референтним штамом *Rhizobium leguminosarum* 245a не впливала на концентрацію каротиноїдів у листках протягом всього періоду онтогенезу рослин гороху. Концентрація крохмалю у фазі 4-5 листків в рослинах *Pisum sativum* L., інокульованих бактеріями штамів RRL8, RRL11 та 245a, була нижчою, порівняно з контролем.*

*Ключові слова: бульбочкові бактерії, горох посівний, пігменти, крохмаль.*

У симбіозі з бульбочковими бактеріями при сприятливих умовах бобові рослини здатні засвоювати атмосферний азот [7]. Азот, нагромаджений у рослинах бобово-ризобіальними системами, розглядається як потужний фактор підвищення родючості ґрунту, заощадження мінеральних азотних добрив, зменшення забруднення навколишнього середовища шкідливими сполуками [3]. У бобових рослин існує тісний взаємозв'язок між процесами фотосинтезу і азотфіксації. Від азотного живлення залежить вміст пігментів у листку, перш за все, хлорофілу, а також каротиноїдів [5]. На даний час проводиться інтенсивний пошук нових високоефективних штамів азотфіксуючих бактерій, які можуть забезпечити потужну фіксацію азоту, сприяти прискоренню процесів фотосинтезу, що, в свою чергу, призведе до збільшення врожаю бобових культур [6, 7, 9].

Метою роботи було вивчення впливу бульбочкових бактерій гороху, виділених на території Івано-Франківської області, на концентрацію пігментів і крохмалю в листках *Pisum sativum* L.

### **Матеріали і методи**

Об'єктом дослідження були швидкорослі бульбочкові бактерії *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* штамів RRL7, RRL8, RRL9 і RRL11, ізольовані з рослин гороху посівного на території Івано-Франківської області. Для порівняння ефективності місцевих штамів використовували високоефективний штам *Rhizobium leguminosarum* 245a, отриманий з колекції Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного.



Бактерії вирощували при 28 °С на шейкері (120 коливань за хвилину) в рідкому живильному середовищі такого складу (г/л): глюкоза — 10,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4$  — 0,2;  $\text{NaCl}$  — 0,1;  $\text{CaCO}_3$  — 3,0; дріжджова вода (рН 6,8) — 100 мл [8].

Польовий експеримент був проведений на базі дендропарку „Дружба” Прикарпатського національного університету імені В. Стефаника (м. Івано-Франківськ) на дерново-підзолистих ґрунтах. Стерилізоване насіння гороху сорту Альфа обробляли суспензією різних штамів бульбочкових бактерій і висаджували на випадково розташовані ділянки (2,0 м x 1,5 м). Ширина міжрядь була 15 см, глибина загортання — 5 - 7 см. Інокуляційне навантаження  $\sim 1,2 \cdot 10^8$  клітин на насінину. Насіння рослин контрольних варіантів замочували у воді. Відбір експериментального матеріалу проводили тричі впродовж вегетаційного періоду гороху на фазах 4 - 5 листків (14 днів після появи сходів), бутонізації (30 днів після появи сходів) і цвітіння (42 дні після появи сходів).

Пігменти екстрагували з листків рослин гороху 96 % етанолом та спектрофотометрично визначали концентрацію хлорофілу *a*, хлорофілу *b*, каротиноїдів та антоціанів з використанням відповідних коефіцієнтів абсорбції [12, 14]. Концентрацію крохмалю визначали за принципом утворення забарвленого комплексу крохмаль-йод [11], використовуючи для побудови калібрувального графіка водорозчинний картопляний крохмаль. Поглинання комплексу крохмаль-йод визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 600 нм.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми MYNOVA [10], використовуючи критерій Стьюдента. Дані представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього ( $M \pm m$ ).

### Результати та їх обговорення

Для оцінки ефективності бульбочкових бактерій використовують різні показники, серед яких і вміст фотосинтетичних пігментів в листках [1, 5]. Як відомо, симбіотична азотфіксація функціонально пов'язана з фотосинтезом [6, 9]. Це пояснюється тим, що фотосинтез забезпечує бульбочкові бактерії асимілятами та енергетичними ресурсами, а бактерії, в свою чергу, — фотосинтетичний апарат рослини азотними сполуками [5, 9]. Одним із показників, який вчені пропонують використовувати при відборі і селекції ефективних штамів бульбочкових бактерій, є вміст хлорофілу у рослинах [1, 6]. Показано, що за умов інокуляції бактеріями штамів RRL8 та RRL9 концентрація загального хлорофілу (табл. 1) у фазі 4-5 листків була більшою, порівняно з контролем, на 28 % і 18 % відповідно. У фазі бутонізації у рослин, оброблених бактеріями штаму RRL9, значення даного показника були нижчими порівняно з контролем у 1,3 рази. Концентрація загального хлорофілу, при інокуляції бактеріями штамів RRL7, RRL11 і 245а на початкових етапах розвитку рослин, була нижчою і не відрізнялась від контролю у фазах цвітіння і бутонізації. З літератури відомо, що існує позитивний зв'язок між інтенсивністю азотфіксації в бульбочках і вмістом хлорофілу *a* в листках, незалежно від особливостей рослин-господарів і симбіотичних властивостей штамів бульбочкових бактерій [4]. У фазі 4 - 5 листків у рослин, інокульованих бактеріями досліджуваних штамів, концентрація хлорофілу *a* в листках була більшою, порівняно з контролем (табл. 1). Тобто, після обробки бульбочковими бактеріями інтенсивна фіксація азоту може відбуватися вже на ранніх фазах росту гороху. На початкових етапах онтогенезу



у рослин, оброблених бактеріями штамів RRL8 і RRL9, концентрація хлорофілу б була більшою, порівняно з контролем на 32 % та 21 % відповідно, і відбувалось достовірне її зниження протягом розвитку гороху (табл. 1). У рослин, інокульованих бактеріями штамів RRL7, RRL11 і 245а, концентрація даного пігменту у фазі 4 - 5 листків була нижчою відносно контролю, а у фазах бутонізації і цвітіння залишалася незмінною.

Таблиця 1

**Концентрація хлорофілів у рослин гороху при обробці насіння бульбочковими бактеріями штамів RRL7, RRL8, RRL9, RRL11, 245а**

Table 1

**Pea plants Chlorophyll content at seed treatment by nodule bacteria strains RRL7, RRL8, RRL9, RRL11, 245a**

Фаза	Варіант	Хлорофіли, мкмоль/ г сирової маси		
		(а+б)	а	б
4-5 листків (14 днів після сходів)	Контроль	2,58 ± 0,11	0,98 ± 0,03	1,60 ± 0,08
	RRL7	1,70 ± 0,085	1,29 ± 0,074	0,41 ± 0,025
	RRL8	3,30 ± 0,154в	1,18 ± 0,081	2,11 ± 0,084в
	RRL9	3,05 ± 0,074в	1,13 ± 0,061а	1,93 ± 0,024в
	RRL11	1,86 ± 0,154	1,41 ± 0,132	0,45 ± 0,025
	245а	1,76 ± 0,085	1,35 ± 0,064	0,42 ± 0,025
бутонізація (30 днів після сходів)	Контроль	2,01 ± 0,11	1,47 ± 0,06	0,54 ± 0,05
	RRL7	1,79 ± 0,17	1,34 ± 0,12	0,45 ± 0,05
	RRL8	1,97 ± 0,21	1,49 ± 0,16	0,48 ± 0,06
	RRL9	1,49 ± 0,153	1,11 ± 0,123	0,38 ± 0,033
	RRL11	1,88 ± 0,13	1,39 ± 0,07	0,49 ± 0,07
	245а	1,71 ± 0,14	1,27 ± 0,12	0,44 ± 0,02
цвітіння (42 дні після сходів)	Контроль	1,94 ± 0,16	1,44 ± 0,12	0,50 ± 0,04
	RRL7	2,13 ± 0,14	1,59 ± 0,11	0,53 ± 0,03
	RRL8	2,05 ± 0,14	1,53 ± 0,11	0,52 ± 0,03
	RRL9	1,59 ± 0,126	1,19 ± 0,096	0,41 ± 0,036
	RRL11	2,20 ± 0,16	1,63 ± 0,12	0,57 ± 0,04
	245а	2,24 ± 0,13	1,68 ± 0,10	0,56 ± 0,03

Примітка: <sup>1</sup> значення достовірно відмінне від контролю з  $P < 0,05$ , <sup>2</sup> $P < 0,01$ , <sup>3</sup> $P < 0,025$ , <sup>4</sup> $P < 0,005$ , <sup>5</sup> $P < 0,001$ ; <sup>а</sup> достовірно відмінне від значень для штаму 245а з  $P < 0,025$ , <sup>б</sup> $P < 0,005$ , <sup>в</sup> $P < 0,001$ ,  $n = 3-6$ .

Каротиноїди виконують роль допоміжних пігментів і належать до активних компонентів фотохімічної системи хлоропластів [2, 14]. Вони беруть участь у функціонуванні реакційних центрів і світлозбираючих комплексів фотосистем, ефективно виконують захисні функції: знешкоджують триплетний хлорофіл, синглетний кисень, а також супероксидні радикали [13]. Як видно з таблиці 2, інокуляція місцевими і референтним штамми не впливала на концентрацію каротиноїдів у листках гороху протягом всього періоду онтогенезу рослин гороху.



Виняток становили рослини, оброблені штамом RRL9, де концентрація даного пігменту була нижчою відносно контролю у фазах бутонізації і цвітіння у 1,4 та 1,2 рази відповідно.

Таблиця 2

**Концентрація каротиноїдів, антоціанів та крохмалю у рослин гороху при обробці насіння бульбочковими бактеріями штамів RRL7, RRL8, RRL9, RRL11, 245a**

Table 2

**Pea plant carotenoid, anthocyanins and starch concentration at seed treatment by nodule bacteria strains RRL7, RRL8, RRL9, RRL11, 245a**

Фаза	Варіант	Каротиноїди, мкмоль/г сирої маси	Антоціани, мкмоль/г сирої маси	Крохмаль, мг/г сирої маси
4-5 листків (14 днів після сходів)	Контроль	0,59 ± 0,03	0,57 ± 0,04	0,11 ± 0,03
	RRL7	0,58 ± 0,02	0,64 ± 0,016	0,09 ± 0,03
	RRL8	0,56 ± 0,03	0,67 ± 0,021	0,05 ± 0,011
	RRL9	0,60 ± 0,02	0,66 ± 0,021	0,06 ± 0,01
	RRL11	0,64 ± 0,06	0,70 ± 0,032	0,05 ± 0,011
	245a	0,61 ± 0,02	0,68 ± 0,012	0,05 ± 0,011
бутонізація (30 днів після сходів)	Контроль	0,69 ± 0,07	0,57 ± 0,02	0,07 ± 0,01
	RRL7	0,60 ± 0,05	0,59 ± 0,04a	0,08 ± 0,02
	RRL8	0,78 ± 0,13	0,48 ± 0,041	0,05 ± 0,01
	RRL9	0,51 ± 0,051	0,52 ± 0,04	0,08 ± 0,02
	RRL11	0,63 ± 0,04	0,50 ± 0,021	0,13 ± 0,04
	245a	0,56 ± 0,04	0,50 ± 0,022	0,12 ± 0,04
цвітіння (42 дні після сходів)	Контроль	0,61 ± 0,03	0,58 ± 0,04	0,13 ± 0,03
	RRL7	0,62 ± 0,05	0,66 ± 0,07	0,04 ± 0,012
	RRL8	0,61 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,14 ± 0,02a
	RRL9	0,49 ± 0,031в	0,48 ± 0,021в	0,06 ± 0,012
	RRL11	0,64 ± 0,04	0,62 ± 0,04	0,10 ± 0,02
	245a	0,67 ± 0,04	0,65 ± 0,04	0,08 ± 0,02

Примітка: <sup>1</sup>значення достовірно відмінне від контролю з P<0,05, <sup>2</sup>P<0,025; <sup>3</sup> достовірно відмінне від значень для штаму 245a з P<0,05, <sup>4</sup>P<0,01, <sup>5</sup>P<0,005, n=3-6.

Важливу антиоксидантну роль в житті рослин відіграють вакуольні пігменти антоціани. Зростання концентрації антоціанів може бути наслідком дії несприятливих факторів середовища, таких як посуха, ультрафіолетове випромінювання, дія низьких температур, нестача азоту і фосфору, забруднення, а також при інфікуванні бактеріями та грибами [12, 15]. З отриманих результатів видно, що у фазі 4 - 5 листків концентрація антоціанів була більшою, порівняно з контролем, у всіх інокульованих бактеріями рослин (табл. 2). На 30-й день після сходів у рослин гороху, оброблених бактеріями штамів RRL8, RRL11 та 245a, концентрація даних пігментів була нижчою, порівняно з контролем. У фазі цвітіння концентрація антоціанів не відрізнялась від такої в контролі, окрім рослин, інокульованих штамом RRL9, де вона була на 21 % нижчою. Отримані результати узгоджуються з літературними даними, де зазначено зростання концентрації антоціанів при інфікуванні бактеріями та накопичення їх в молодих листках і при старінні рослин [12].



З літератури відомо, що ефективність симбіозу бульбочкових бактерій залежить і від притоку фотоасимілятів у бульбочки на коренях рослин [4]. Продукти фотосинтезу, які утворюються в листках, є основним джерелом енергії для росту бульбочок, дихання бактероїдів і азотфіксації [9]. У фазі 4 - 5 листків (табл. 2) концентрація крохмалю в рослинах *Pisum sativum* L., інокульованих бактеріями штамів RRL8, RRL11 та 245а, була нижчою, порівняно з контролем. Нижчу концентрацію крохмалю в листках інокульованих рослин гороху на початкових етапах росту можна пояснити тим, що в цей період відбувається інтенсивне формування бульбочок, куди і направляється частина ресурсів.

Отримані результати свідчать, що на початкових етапах онтогенезу гороху, рослини, інокульовані бульбочковими бактеріями, мають вищі порівняно з контролем, концентрації хлорофілу *a* та антоціанів, а також відбувається відтік продуктів фотосинтезу в бульбочки. Тобто азотфіксація може відбуватися вже на ранніх фазах росту рослин гороху.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Антипчук А. Ф., Краснобрижа О. М., Леонова Н. О., Танцюренко О. В., Путинська Г. О. Особливості формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу за умов забруднення важкими металами // Физиология и биохимия культ. растений. — 2002. — Т.34, № 1. — С. 63 — 69.
2. Ладыгин В. Г. Биосинтез каротиноидов водорослей и его генетический контроль // Успехи соврем. биологии. — 2001. — № 3. — С. 296 — 317.
3. Коць С. Я. Роль біологічного азоту у підвищенні продуктивності сільськогосподарських рослин // Физиология и биохимия культ. растений. — 2001. — Т.33, № 3. — С. 208 — 215.
4. Мандровская Н. М., Охрименко С. М., Киризий Д. А., Старченков Е. П. Влияние инокуляции азотустойчивыми клонами клубеньковых бактерий на интенсивность фотосинтеза и азотфиксации у гороха // Физиология и биохимия культ. растений. — 1995. — 27, № 3. — С. 169 — 173.
5. Охрименко С. М. Вміст пігментів у рослинах гороху при інокуляції клонами бульбочкових бактерій, стійкими до мінерального азоту // Физиология и биохимия культ. растений. — 2001. — 33, № 6. — С. 535 — 538.
6. Патица В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. Біологічний азот. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
7. Патыка В. П., Толкачев Н. З., Бутвина О. Ю. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современной земледелии Украины // Физиология и биохимия культ. растений. — 2005. — 37, № 5. — С. 384 — 393.
8. Теннер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. — М.: Агропромиздат, 1987. — 135 с.
9. Тихонович И. А., Прохорова Н. А. *Rhizobiaceae*, молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. — Санкт-Петербург, 2002. — 567 с.
10. Brooks S. P. J. A simple computer program with statistical test for the analysis of enzyme kinetics // BioTechniques. — 1992. — 13. — P. 909 — 911.
11. Chang C. W. Starch and its component ratio in developing cotton leaves // Plant Physiol. — 1979. — 63. — P. 973 — 977.
12. Gitelson A. A., Merzlyak M. N., Chivkunova O. B. Optical properties and non-destructive estimation of anthocyanin content in plant leaves // Photochem. Photobiol. — 2001. — 74, N 1. — P. 38 — 45.
13. Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M. et al. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit // Plant Physiol. — 2004. — 134. — P. 824 — 837.
14. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. — 1987. — 148. — P. 331 — 382.
15. Rossetto M., Vanzani P., Lunelli M. et al. Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates // Free Radic. Res. — 2007. — 41, № 7. — P. 854 — 859.



УДК 579.64:631.46 + 581.1

**У. Я. Стамбульська, В. И. Лушак**

Прикарпатский национальный университет  
имени В. Стефаныка, ул. Шевченко, 57, Ивано-Франковск, 76025, Украина  
тел.: 8 (03422) 714 683; e-mail: lushchak@pu.if.ua

## **ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM* НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ПИГМЕНТОВ И КРАХМАЛА В РАСТЕНИЯХ ГОРОХА**

### **Реферат**

Изучено влияние инокуляции клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* на концентрацию пигментов и крахмала в растениях гороха посевного — *Pisum sativum* L. На начальных этапах онтогенеза гороха концентрация хлорофилла *a* и антоцианов у всех инокулированных бактериями растений была выше по сравнению с контролем. Инокуляция местными штаммами RRL7, RRL8, RRL11 и референтным штаммом *Rhizobium leguminosarum* 245a не влияла на концентрацию каротиноидов в листьях в течение всего периода онтогенеза растений гороха. Концентрация крахмала в фазе 4 - 5 листьев в растениях *Pisum sativum* L., инокулированных бактериями штаммов RRL8, RRL11 та 245a, была ниже, относительно контроля.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** клубеньковые бактерии, горох посевной, пигменты, крахмал.

УДК 579.64:631.46 + 581.1

**U. Ya. Stambulska, V. I. Lushchak**

Vassyl Stefanyk Precarpathian National University,  
Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk 76025, Ukraine  
tel.: 8 (03422) 714 683, e-mail: lushchak@pu.if.ua

## **BACTERIA *RHIZOBIUM* EFFECT ON PIGMENTS AND STARCH CONTENT IN PEA PLANTS**

### **Summary**

Influence of inoculation by nodule bacteria *Rhizobium* on the pigments and starch content in pea plants — *Pisum sativum* L. was studied. At the initial stages of the plant ontogenesis, the concentrations of chlorophyll *a* and anthocyanins were higher in all inoculated plants than those in control. The treatment of pea seeds by local wild strains RRL7, RRL8, RRL11 and collection strain *Rhizobium leguminosarum* 245a did not affect the carotenoid concentration in the leaves during the whole ontogenesis period of pea. Starch content in the phase of 4 - 5 the leaves in plants of *Pisum sativum* L. inoculated with the bacteria strains RRL8, RRL11, 245a was lower than in control.

**Key words:** nodule bacteria, pea, pigments, starch.

