НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Наукова робота

**на здобуття щорічної премії Президента України
для молодих вчених**

**МЕТАБОЛІТНИЙ, БІЛКОВИЙ ТА ФІТОГОРМОНАЛЬНИЙ СТАТУС**

**БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНИХ СИСТЕМ ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ МАРКЕР АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЙ ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА**

|  |  |
| --- | --- |
| ЛЕВІШКО Алла Сергіївна – | кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України |
|  |  |
| КОНДРАТЮК Юлія Юріївна – | кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України |
|  |  |
| ГРИЩУК Олена Олександрівна – | молодший науковий співробітник відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України |

РЕФЕРАТ

2014

Реферат роботи

Левішко А.С., Кондратюк Ю.Ю., Грищук О.О.

**“Метаболітний, білковий та фітогормональний статус бобово-ризобіальних систем як потенційний маркер адаптивних реакцій до стресових чинників навколишнього середовища”**,

висунутої на здобуття премії Президента України для молодих вчених

Невпинне зростання населення земної кулі та нераціональне природокористування ставить перед світовою спільнотою невідкладні завдання, від успіхів у вирішенні яких залежить подальше існування людської цивілізації. Зважаючи на екологічний стан навколишнього середовища, вплив антропогенних факторів і виснаження природних ресурсів перед сучасною сільськогосподарською галуззю постає питання про найбільш екологічно- та економічно вигідні шляхи оптимізації виробництва. Одним із найперспективніших напрямків вирішення даної проблеми є біологізація виробничого процесу, тобто впровадження у сільськогосподарське виробництво сучасних біотехнологічних прийомів, що є одним із основних напрямків подолання продовольчої кризи. Саме за допомогою розробки біотехнологій стало можливим надання корисних властивостей важливим для сільського господарства видам продовольчих і технічних культур. Перш за все – це стійкість до несприятливих погодно-кліматичних впливів, шкідників, захворювань, тощо. Сільськогосподарські культури з покращеними властивостями дають хороший стійкий урожай і не вимагають додаткового застосування мінеральних добрив та пестицидів, складові яких накопичуються в самому продукті, а значить, у кінцевому рахунку, токсичні для людей. Більш того, зменшення застосування отрутохімікатів та мінеральних добрив призводить до скорочення їх виробництва – дуже шкідливого для навколишнього середовища. Відмова від повторних обробок мінеральними добривами і пестицидами значно здешевлює майбутній урожай. Тому одним із найважливіших завдань, що стоїть перед людством, стає послаблення антропогенного навантаження на агроекологічні системи і біосферу в цілому. Зокрема, все більшого значення набувають науково-технічні розробки, спрямовані на пошук альтернативних засобів, завдяки яким без зниження досягнутого рівня сільськогосподарського виробництва можна зменшити його собівартість та шкідливий вплив на навколишнє середовище і, водночас, досягнути екологічної чистоти продукції. У світовій практиці має місце тенденція до зниження доз застосовуваних добрив і зростає роль їх інтегрованого використання (за економічними та екологічними міркуваннями) з агротехнічними прийомами, метою яких є підтримання природної родючості ґрунтів, включаючи науково обґрунтовані сівозміни, заходи, спрямовані на підвищення біорізноманіття корисної ґрунтової мікрофлори.

Відомо, що мікроорганізми можуть виступати джерелами природних біологічно активних речовин, які є регуляторами ключових ланок метаболізму важливих сільськогосподарських рослин. Яскравим прикладом таких організмів є ґрунтові бактерії, насамперед ризобії, що у симбіозі з бобовими рослинами фіксують молекулярний азот атмосфери і перетворюють його в сполуки, здатні легко засвоюватися живими організмами, а також продукують фізіологічно активні речовини, що сприяє підвищенню урожаю польових культур. Стимуляція росту рослин за рахунок мікроорганізмів здійснюється через забезпечення рослини речовинами, синтезованими бактеріями, або за рахунок полегшення доступу до поживних речовин, що знаходяться в середовищі проживання. Крім поліпшення живлення, ці бактерії володіють й іншими механізмами позитивного впливу на рослину-господаря, оскільки забезпечують її фізіологічно активними речовинами (фітогормонами, амінокислотами та ін.). Таким чином, бактеризація приводить до активації багатьох фізіологічних процесів як у рослинній клітині зокрема, так і рослинному організмі вцілому, наближаючи їх до природного максимуму.

Ефективність симбіотичних систем визначається взаємодією обох партнерів – макро- і мікросимбіонта, вплив яких на активність симбіозу істотно залежить від їх адаптивних реакцій до стресових чинників навколишнього середовища. Тому проведення комплексного дослідження взаємодії рослин і мікроорганізмів, пошук потенційних маркерів їх адаптації та застосування для цього нових біотехнологічних підходів, сприяє прискоренню одержання високоефективних бактеріальних препаратів нового покоління.

У зв’язку з викладеним, головною метою представленої роботи було проведення комплексного дослідження взаємодії рослин і мікроорганізмів. Це дасть підґрунтя для розробки новітніх біотехнологічних прийомів, що покращать ріст, розвиток, продуктивність рослин та пристосовуваність до стресових чинників навколишнього середовища, а також забезпечать можливість запобігання суттєвим втратам врожаю та зниженню показників його якості.

Лише за допомогою комплексного підходу можливо розкрити весь потенціал «біологічного» азоту, зрозуміти певні фундаментальні аспекти фізіології рослин, що може привести до розробки нових стратегій отримання сільськогосподарських культур, пристосованих до нестабільних умов навколишнього середовища, а також забезпечить максимальне розкриття генетичного потенціалу їх продуктивності.

У викладеній науковій роботі показано ефективне застосування сучасних біотехнологічних підходів длякомплексного дослідження потенційних маркерів адаптивних реакцій рослинно-мікробної взаємодії у агроекосистемах за впливу різних стресових факторів навколишнього середовища.

Наведено експериментальні дані та теоретичні узагальнення стосовно особливостей біологічно активних речовин (білки, метаболіти, фітогормони), які розглядаються як фактори формування і функціонування системи ґрунт-мікроорганізми-рослина за оптимальних та стресових умов навколишнього середовища.

Показано, що за умов живлення рослин мінеральним азотом на початку їх розвитку спостерігалось пригнічення формування симбіотичного апарату та зниження азотфіксувальної активності. Але, по мірі вичерпання азоту рослиною та зниження його вмісту у ґрунті активність ризобій збільшувалась, що приводило до переходу на симбіотрофне живлення. Виявлено, що за умов живлення рослин мінеральним азотом інтенсивне накопичення амінокислот відбувалось у коренях, а з початком вичерпання азоту – у бульбочках. При симбіотрофному живленні рослин азотом більша кількість амінокислот спостерігалась за умов утворення ефективного симбіотичного апарату та з початком інтенсивної азотфіксації. Показано, що функціонування ефективного симбіотичного апарату вирізняється накопиченням у коренях рослин сої цукрів, які, ймовірно, і є джерелом енергії для забезпечення роботи нітрогеназного комплексу або можуть бути використані рослиною як частина запасних речовин, а також у метаболічній регуляції компонентів антиоксидантної системи. При живленні рослин мінеральним азотом інокуляція рослин штамами ризобій також сприяє накопиченню великої кількості цукрів у коренях і бульбочках, що може створювати передумови, для підвищення стійкості рослин до стресу.

Продемонстровано, що у рослинах сої відбувається накопичення різних органічних сполук, які беруть участь у функціонуванні симбіозу та дозволяють не лише отримати симбіотичні системи з високим рівнем фіксації азоту, а й сприяють підвищенню стійкості рослин до посухи.

При дослідженні змін білкових профілів симбіотичних систем сої було показано загальну тенденцію для білкових препаратів як бульбочок, так і коренів сої до зниження їх сумарної кількості за недостатньої зволоженості ґрунту незалежно від штаму-інокулянта на фоні зниження сухої маси коренів та бульбочок у стресових умовах. Разом із тим, у дослідах із бульбочками кількість білків знижувалась протягом досліджуваного періоду росту рослин незалежно від водного забезпечення, у той час, як у коренях навпаки спостерігався суттєвий приріст цього показника. Тобто можна зробити висновок про те, що білки, екстраговані з інфікованих та неінфікованих коренів сої, по-різному реагують на водний стрес та, імовірно, залучаються до різних механізмів адаптації до нестачі вологи в ґрунті. У той же час слід відмітити, що у екстрактах бульбочок більш суттєве зниження вмісту загального білка було характерне для варіанту за інокуляції активним штамом, порівняно з інокуляцією неактивним.

При дослідженні якісних змін білкових профілів коренів та бульбочок сої за інокуляції різними за активністю штамами *B. japonicum* та за різного водного забезпечення нами було продемонстровано, що для всіх препаратів коренів та всіх екстрактів бульбочок характерні спільні картини кількісного розподілу поліпептидів. У той же час виявлено велику кількість відмінностей білкового складу всіх зразків залежно від штама-інокулянта, фази росту рослин та наявності стресового чинника.

Дослідження впливу передпосівної інокуляції штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum* із різними симбіотичними властивостями на фітогормональний статус рослин сої показали, що бактеризація насіння сої приводить до підвищення пулу індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) у коренях у порівнянні з контролем у всіх досліджуваних варіантах. При цьому показник вмісту ауксинів у бульбочках на початкових стадіях формування симбіотичного апарату перевищував даний показник у коренях, що свідчить про важливу роль ІОК у закладанні бульбочок. Відмічено чіткі залежності між вмістом ІОК у коренях та бульбочках, утворених високоактивними штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*, та азотфіксувальною активністю на ранніх фазах розвитку рослин сої.

При визначенні вмісту зеатину було показано різке підвищення даного фітогормону у коренях досліджуваних рослин у порівнянні з контролем у фазу бутонізації (активної фіксації азоту). Це свідчить про те, що функціонування симбіотичного апарату та синтез зеатину в дану фазу тісно пов’язані між собою.

Також було відмічено, що саме на початкових стадіях онтогенезу рослин вміст зеатинрибозиду у коренях перевищував вміст зеатину у них.

У той же час було відзначено, що у всіх рослин, бактеризованих високовірулентними штамами, як активними, так і неактивними, показник вмісту цитокінінів у бульбочках коливався приблизно в однакових межах, тоді як у бульбочках сої у варіанті із застосуванням середньовірулентного, високоактивного транспозонового мутанту цей показник більш, ніж у два рази був вищий в порівнянні з іншими варіантами.

В ході досліджень було встановлено, що на початкових етапах формування бобово-ризобіального симбіозу інокуляція рослин сої приводить до підвищення пулу гормонів гіберелінової природи в порівнянні з контролем. Залежності між вмістом гіберелінів у коренях та активністю штамів не було виявлено. Результати досліджень показали, що зміна вмісту гіберелінів у кореневих бульбочках сої пов’язана не лише з активністю, а й із вірулентністю штаму-інокулянту. Відмічено існування тісного взаємозв’язку між вмістом гіберелінів та іншими фітогормонами у різних органах сої, інфікованої контрастними за активністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*, що свідчить про комплексність гормональних зв’язків у рослинному організмі та їх важливу роль у регуляції симбіотичних взаємовідносин.

При визначенні пулу рістінгібуючого гормону абсцизової кислоти (АБК) у досліджуваних рослин було показано, що його концентрація у коренях на порядок менша, ніж у бульбочках на початкових етапах формування симбіозу.

Було встановлено, що з початком інтенсифікації азотфіксувальної активності зміна пулу АБК у кореневих бульбочках у всіх дослідних варіантах несе схожий характер, це може вказувати на строго запрограмовану дію АБК у регулюванні формування і функціонування азотфіксувального апарату.

Порівняння показника вмісту АБК у бульбочках сої з іншими фітогормонами дозволило виявити певні взаємозв’язки з показниками вмісту ауксинів, цитокінінів та гіберелінів у фазу двох трійчастих листків. Контроль над цими взаємодіями (зокрема, в дану фазу) може слугувати одним із ефективних заходів інтенсифікації симбіотичних взаємовідносин.

Таким чином, інокуляція як активними, так і неактивними штамами ризобій сприяє синтезу органічних речовин, які не лише приймають участь у функціонуванні симбіозу, а й здатні створювати передумови для підвищення стійкості рослин до несприятливих умов довкілля, у тому числі до дефіциту вологи.

Результати досліджень, представлених у роботі, запропоновано враховувати при розробці і впровадженні нових підходів до керування продукційним процесом у бобових культур. Отримані дані є потенційним підґрунтям для розробки нових і вдосконалення існуючих елементів технологій біологічного землеробства, спрямованого на суттєве підвищення продуктивності бобових та зернових культур, економію енергоресурсів та захист довкілля.

За темою роботи опубліковано 37 праць. Загальна кількість публікацій авторів – 74, у тому числі у міжнародних журналах, що містяться в базі даних SCOPUS – 8, загальна кількість посилань на публікаціїї  претендентів – 9, h-індекс – 3.