

ВПЛИВ МІСЦЕВИХ ШТАМІВ АЗОТФІКСУЮЧИХ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ НА ДЕЯКІ БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ РОСЛИН ГОРОХУ

У. Я. СТАМБУЛЬСЬКА

ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника»,
бул. Шевченка, 57 Івано-Франківськ, 76025, Україна
e-mail: ustambulska@yandex.ua

У бобових рослин існує тісний взаємозв'язок між процесами фотосинтезу і азотфіксації. Від азотного живлення залежить вміст пігментів у листку. Продукти фотосинтезу є головним джерелом енергії для росту і підтримки бульбочок, дихання бактероїдів і азотфіксації, джерелом молекул-попередників для асиміляції фіксованого азоту. У роботі вивчено вплив передпосівної обробки насіння бульбочковими бактеріями роду *Rhizobium* на концентрацію пігментів і крохмалю у рослин гороху посівного. Ефективності бульбочкових бактерій оцінювали у польових експериментах, які проводили у три вегетаційні сезони. Об'єктом дослідження були швидкорослі бульбочкові бактерії *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* штамів RRL1-RRL12, ізольовані нами з рослин гороху посівного на території Івано-Франківської області. Для порівняння ефективності місцевих штамів використовували референтний високоєфективний штам *R. leguminosarum* 245a. Пігменти екстрагували з листків рослин гороху 96% етанолом. Концентрацію пігментів визначали спектрофотометричним методом. Концентрацію крохмалю визначали калориметричним методом за принципом утворення забарвленого комплексу крохмаль-йод в осадах, утворених після екстракції пігментів. Встановлено, що за умов інокуляції насіння бактеріями місцевих штамів RRL8 і RRL9 концентрація хлорофілів у листках гороху у фазах бутонізації і цвітіння була більшою, порівняно з контролем і обробленим стандартним штамом рослин. Це дає можливість використання даних штамів у сільському господарстві для передпосівної інокуляції, з метою інтенсифікації азотфіксації і підвищення врожайності гороху. У фазі цвітіння концентрація хлорофілу *a* була максимальною, порівняно з іншими фазами росту гороху. Показано, що у фазі 4-5 листків концентрація крохмалю в листках рослин гороху, насіння яких обробляли бактеріями штамів RRL4-RRL6, RRL8 та 245a, була нижчою порівняно з контролем на 38-57%. Це може бути пов'язане з інтенсивним формуванням бульбочок, куди і спрямовується частина фотоасимілятів.

Ключові слова: бульбочкові бактерії; *Rhizobium leguminosarum*; горох посівний; пігменти; крохмаль

Вступ. Фотосинтез і засвоєння азоту повітря – ключові фізіологічні процеси, які забезпечують синтез пластичних речовин і, як результат, ріст та збільшення біомаси рослин. Фотосинтез постачає симбіотичні бульбочкові бактерії асимілянтами та енергетичними ресурсами, а бактерії, в свою чергу, – фотосинтетичний апарат рослини азотними сполуками (White et al., 2009; Trainer et al., 2010; Aranjuelo et al., 2015). У надземну частину рослини-господаря надходить до 90% фіксованого бактероїдами азоту. Цим підтримується на високому рівні процес фотосинтезу, інтенсивність якого залежить від забезпечення азотом (Патика, 2003).

Структурними елементами фотосинтетичного апарату є хлоропласти, від вмісту і функціональної активності яких залежить інтенсивність фотосинтезу і швидкість включення амонію в метаболізм рослин (Hu et al., 2015). Процес фотосинтезу відбувається за безпосередньої участі азотовмісних зелених пігментів – хлорофілу *a* і *b*. Основна їх частина входить до складу світлозбиральних комплексів, забезпечує поглинання і передачу світлової

енергії на реакційні центри, в яких і відбуваються первинні фотосинтетичні реакції (Xu et al., 2001). Проте тільки хлорофіл *a* є первинним донором електронів і відповідає за здатність рослин до фотосинтезу (Патика, 2003). Ефективність симбіозу бульбочкових бактерій з бобовими рослинами залежить також і від притоку фотоасимілятів у бульбочки на коренях рослин. Тому метою роботи було дослідити вплив бульбочкових бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, виділених на території Івано-Франківської області, на концентрацію пігментів і крохмалю в листках гороху.

Матеріали та методи. Для оцінки ефективності бульбочкових бактерій на базі дендропарку „Дружба” ДВНЗ „Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника” (м. Івано-Франківськ) був закладений польовий експеримент, який проводили у три вегетаційні сезони (2007-2009 роки). Об'єктом дослідження були швидкорослі бульбочкові бактерії *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* штамів RRL1-RRL12, ізольовані з рослин гороху посівного на території Івано-Франківської області. Для

порівняння ефективності місцевих штамів використовували високоефективний штам *R. leguminosarum* 245a, отриманий з колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. Бактерії вирощували згідно методик, описаних раніше (Стамбульська, Лушак, 2008). Перед посівом насіння гороху сорту Альфа стерилізували в 96% етанолі та у відбілювачі „Білизна”. Насіння гороху дослідних варіантів обробляли протягом однієї години суспензією різних штамів бульбочкових бактерій, а контрольних – замочували у воді і висаджували за описаним раніше зразком (Стамбульська, Лушак, 2008). Інокуляційне навантаження $\sim 1,2 \cdot 10^8$ клітин на насінину. Зразки рослин відбирали тричі впродовж вегетаційного періоду гороху посівного: у фазі 4-5 листків, бутонізації і цвітіння.

Пігменти екстрагували з верхівкових листків рослин шляхом гомогенізації в охолоджену 96% етанолі у співвідношенні 1:10 (маса:об'єм) з додаванням CaCO_3 (для нейтралізації середовища). Гомогенати центрифугували 10 хв при 8000 g (4°C) на центрифугі ОПН-8 (СССР). З отриманих осадів тричі екстрагували пігменти і центрифугували в попередньому режимі, після чого екстракти об'єднували (Lichtenthaler, 1987), а осад залишали для визначення концентрації крохмалю.

Концентрацію пігментів визначали спектрофотометричним методом в кінцевому сумарному екстракті з використанням характерних коефіцієнтів абсорбції (Lichtenthaler, 1987) і обчислювали за формулами:

$$C_{\text{хл } a} = 13,36 \text{ ОГ}_{664,2} - 5,19 \text{ ОГ}_{648,6},$$

$$C_{\text{хл } b} = 27,43 \text{ ОГ}_{648,6} - 8,12 \text{ ОГ}_{664,2},$$

$$C_{\text{хл } (a+b)} = 5,24 \text{ ОГ}_{664,2} + 22,24 \text{ ОГ}_{648,6},$$

де $C_{\text{хл}}$ – концентрації хлорофілів (мкг/мл)

Концентрацію крохмалю визначали за його здатністю утворювати забарвлений комплекс крохмаль-йод (Chang, 1979), використовуючи для побудови калібрувального графіка водорозчинний картопляний крохмаль („Sigma”). Поглинання комплексу крохмаль-йод визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 600 нм.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми „Mynova”. Дані представлені як середнє \pm похибка середнього ($M \pm m$). Порівняння середніх арифметичних і визначення достовірної різниці між ними проводили за допомогою критеріїв Стюдента або Даннета. Значення $P < 0,05$ розглядали як критерій достовірної різниці порівняно з контрольними значеннями.

Результати та обговорення. Продукти фотосинтезу – головне джерело енергії для росту і підтримки бульбочок, дихання бактероїдів і азотфіксації, а також джерело молекул-попередників для асиміляції фіксованого азоту (Aranjuelo et al., 2015). Вміст хлорофілу в рослинах є одним з показників, який пропонується використовувати при відборі і селекції ефективних штамів бульбочкових бактерій (Охріменко, 2001; Патица, 2003; Воробей, 2010).

Результати наших досліджень свідчать про різний вплив передпосівної інокуляції насіння азотфіксуючими бульбочковими бактеріями на вміст пігментів у листках гороху протягом вегетаційного періоду. Обробка насіння гороху місцевими і референтним штамми не впливала на концентрацію загального хлорофілу ($a+b$) в листках гороху у фазі 4-5 листків (табл.1).

Винятком були рослини, інокульовані бактеріями штаму RRL4, де концентрація даного пігменту була нижчою на 9% порівняно з рослинами, обробленими бактеріями штаму *R. leguminosarum* 245a. За умов інокуляції бактеріями штамів RRL9 і RRL12 концентрація загального хлорофілу у фазі бутонізації була на 11% вищою порівняно з контролем. Окрім того, у рослин, оброблених бактеріями даних штамів, концентрація хлорофілу ($a+b$) на 12% перевищувала таку у рослин, інокульованих референтним штамом. У фазі цвітіння у рослин, інокульованих бактеріями штамів RRL2 і RRL8, концентрація загального хлорофілу перевищувала таку в контролі на 18 і 14% відповідно. У рослин, оброблених бактеріями даних штамів, концентрація хлорофілу ($a+b$) в листках гороху була вищою за таку в рослин, інокульованих референтним штамом 245a на 15 і 12% відповідно. У дослідженнях, проведених В.С. Воробей з козлятником східним - *Galega orientalis* Lam. також показано, що зі зростанням рівня азотфіксації збільшується вміст хлорофілів у листках рослин, який є одним з головних показників, що характеризує активність фотосинтезу. У фазі цвітіння за інокуляції рослин козлятника штамом *R. galegae* К-3 вміст хлорофілів a і b зростав відносно контрольних рослин на 40%, а відносно рослин, інокульованих стандартним штамом *R. galegae* 0703 – на 15% (Воробей, 2010).

Інокуляція досліджуваними штамми бактерій не впливала на концентрацію хлорофілу a в листках гороху у фазі 4-5 листків (табл. 2). Винятком були рослини, оброблені бактеріями штамів RRL4 та RRL12, де концентрація хлорофілу a в листках була нижчою порівняно з контролем на 8 і 6% відповідно.

Таблиця 1.
Концентрація загального хлорофілу (a+b) у листках
рослин гороху при обробці насіння бульбочковими
бактеріями штамів RRL1-RRL12 та 245a

Table 1.
The concentrations of total chlorophyll (a+b) in the pea
leaves from plants inoculated with nodule bacteria
RRL1-RRL12 and 245a strains

Параметр	Варіант	Фаза росту		
		4-5 листків	Бутонізації	Цвітіння
Хлорофіли (a+b), мкмоль/г сирої маси	Контроль	1,69 ± 0,06	2,00 ± 0,06	2,03 ± 0,04
	RRL1	1,67 ± 0,07	1,99 ± 0,05	2,21 ± 0,07
	RRL2	1,68 ± 0,09	1,93 ± 0,07	2,39 ± 0,08* [†]
	RRL3	1,76 ± 0,07	2,00 ± 0,06	2,10 ± 0,04
	RRL4	1,57 ± 0,06* [†]	2,01 ± 0,07	2,10 ± 0,07
	RRL5	1,69 ± 0,08	1,91 ± 0,05	2,10 ± 0,10
	RRL6	1,63 ± 0,06	2,12 ± 0,04	2,21 ± 0,06
	RRL7	1,73 ± 0,06	2,02 ± 0,05	2,15 ± 0,07
	RRL8	1,60 ± 0,06	2,03 ± 0,07	2,32 ± 0,09* [†]
	RRL9	1,75 ± 0,05	2,21 ± 0,08* ^{†a}	2,00 ± 0,06
	RRL10	1,65 ± 0,06	2,10 ± 0,06	2,16 ± 0,05
	RRL11	1,69 ± 0,04	2,04 ± 0,06	2,10 ± 0,09
	RRL12	1,64 ± 0,06	2,22 ± 0,06* [†]	2,17 ± 0,09
245a	1,71 ± 0,04	1,98 ± 0,07	2,07 ± 0,07	

Примітка: *Вірогідно відмінне від відповідного контрольного значення (без обробки) та від *стандартного штаму 245a з $P < 0,05$. (n=3).

Note: *Significantly different from respective control values (without treatment) and *different from the respective 245a standard strain group with $P < 0.05$. (n=3).

У рослин, оброблених бактеріями штамів RRL4 і RRL8 концентрація даного пігменту була нижчою за таку у рослин, інокульованих референтним штамом. У фазі бутонізації концентрація хлорофілу *a* в листках гороху у рослин, інокульованих бактеріями штамів RRL9, RRL10 і RRL12, була більшою порівняно з контролем і перевищувала таку в рослин, інокульованих стандартним штамом 245a на ~12%. Можна припустити, що після обробки бульбочковими бактеріями інтенсивна фіксація азоту може відбуватися вже у фазі бутонізації гороху. Інокуляція бульбочковими бактеріями

штамів RRL1 і RRL2 призводила до зростання концентрації хлорофілу *a* у фазі цвітіння рослин гороху порівняно з варіантом без інокуляції на 12 і 10% відповідно.

А. Ф. Антипчук і колеги показали, що у рослин люцерни, інокульованих новими штамми бактерій, відбувалось збільшення асиміляційної поверхні і вмісту хлорофілу *a* порівняно з еталонним штамом (Антипчук та ін., 2002; Патица, 2003). Вважається, що це може свідчити про вищу ефективність даних штамів. Показаний також зв'язок вмісту хлорофілів, каротиноїдів і ксантофілів з рівнем азотного

забезпечення і періоду вегетації у ярої пшениці (Прядкіна, Дмитриєва, 2007). У фазі цвітіння концентрація хлорофілу *a* була максимальною порівняно до інших фаз росту. Аналогічна тенденція щодо вмісту хлорофілу *a* у надземній частині рослин гороху виявлена і в роботі С.М. Охріменко, який досліджував вплив інокуляції насіння клонами бульбочкових бактерій гороху при підвищеному вмісті мінерального азоту в субстраті (Охріменко, 2001). З літератури відомо, що існує позитивний кореляційний зв'язок між інтенсивністю азотфіксації в бульбочках і вмістом хлорофілу *a*

в листках незалежно від особливостей рослин-господарів і симбіотичних властивостей штамів бульбочкових бактерій (Патика, 2003). Проте, було встановлено, що зниження вмісту хлорофілу часто корелює зі зменшенням азотфіксації (Охріменко, 2001). Вважається, що серед первинних акумуляторів фіксованого азоту можуть бути порфіринові сполуки, можливо, синтезовані бактеріодами (Охріменко, 2001). Не виключено, що вільні бактеріодні порфірини можуть включатися у хлорофіл в процесі його оновлення, підвищуючи рівень синтезу хлорофілу (Охріменко, 2001).

Таблиця 2.
Концентрація хлорофілу *a* у листках рослин гороху при обробці насіння бульбочковими бактеріями штамів RRL1-RRL12 та 245a

Table 2.
The concentrations of chlorophyll *a* in the pea leaves from plants inoculated with nodule bacteria RRL1-RRL12 and 245a strains

Параметр	Варіант	Фаза росту		
		4-5 листків	бутонізації	Цвітіння
Хлорофіл <i>a</i> мкмоль/г сирої маси	Контроль	1,32 ± 0,05	1,48 ± 0,03	1,57 ± 0,04
	RRL1	1,29 ± 0,05	1,55 ± 0,04	1,76 ± 0,04*
	RRL2	1,31 ± 0,07	1,49 ± 0,04	1,74 ± 0,05*
	RRL3	1,35 ± 0,05	1,55 ± 0,05	1,62 ± 0,03
	RRL4	1,22 ± 0,04* ^a	1,50 ± 0,05	1,60 ± 0,06
	RRL5	1,28 ± 0,04	1,45 ± 0,03	1,50 ± 0,06
	RRL6	1,26 ± 0,04	1,58 ± 0,03	1,68 ± 0,03
	RRL7	1,33 ± 0,05	1,50 ± 0,03	1,67 ± 0,07
	RRL8	1,23 ± 0,04 ^a	1,55 ± 0,05	1,70 ± 0,05
	RRL9	1,32 ± 0,05	1,64 ± 0,03* ^a	1,49 ± 0,04
	RRL10	1,30 ± 0,04	1,65 ± 0,05* ^a	1,69 ± 0,05
	RRL11	1,32 ± 0,03	1,56 ± 0,03	1,62 ± 0,06
	RRL12	1,24 ± 0,05*	1,63 ± 0,04* ^a	1,67 ± 0,07
	245a	1,33 ± 0,03	1,47 ± 0,04	1,61 ± 0,05

Примітка: *Вірогідно відмінне від відповідного контрольного значення (без обробки) та від стандартного штаму 245a з $P < 0,05$. ($n=3$).

Note: *Significantly different from respective control values (without treatment) and ^adifferent from the respective 245a standard strain group with $P < 0.05$. ($n=3$).

Ми аналізували також співвідношення вмісту хлорофілу *a* і хлорофілу *b* в листках рослин гороху (табл. 3). У варіанті без інокуляції найбільше співвідношення вмісту хлорофілу *a* і хлорофілу *b* спостерігали у фазі цвітіння. Ці дані добре узгоджуються з такими, отриманими С.М. Охріменко (2001). Однак у варіантах з інокуляцією місцевими і стандартним штамом 245а зміна даного показника в онтогенезі відбувалась по-різному. Так, у рослин, оброблених бактеріями штамів RRL2, RRL4-RRL5, RRL8, RRL10-RRL11 найбільше співвідношення хлорофілу *a/b* було у фазі 4-5 листків, штамми RRL6 і RRL9 – у фазі бутонізації, штамми RRL1, RRL3 і RRL12 – у фазі цвітіння. Варто зауважити, що у рослин, інокульованих бактеріями стандартного штаму 245а і штаму RRL7 співвідношення даного показника було однаковим у фазах 4-5 листків і цвітіння.

Таблиця 3.
Співвідношення вмісту хлорофілу *a* і хлорофілу *b* у листках рослин гороху при обробці насіння бульбочковими бактеріями штамів RRL1-RRL12 та 245а

Параметр	Варіант	Фаза росту		
		4-5 листків	Бутонізації	цвітіння
Хлорофіл <i>a/b</i>	Контроль	3,57	2,85	3,41
	RRL1	3,31	3,52	3,67
	RRL2	3,54	3,39	2,68
	RRL3	3,29	3,30	3,38
	RRL4	3,49	3,33	3,27
	RRL5	3,12	2,84	2,94
	RRL6	3,41	3,43	3,0
	RRL7	3,41	2,78	3,41
	RRL8	3,32	2,98	2,74
	RRL9	3,07	3,35	2,87
	RRL10	3,82	2,89	3,60
	RRL11	3,57	3,47	3,38
	RRL12	3,10	2,76	3,34
	245а	3,50	2,88	3,50

З літератури відомо, що високе співвідношення хлорофілів *a/b*, з одного боку, може слугувати ознакам високої потенційної інтенсивності фотосинтезу, а з іншого – підвищення вмісту хлорофілу *b* пов'язують з захисною функцією пігменту, який може екранувати фотосинтетично активний хлорофіл *a* від негативних впливів (Хромих та ін., 2013).

Основним резервом вуглецю і джерелом енергії для вищих рослин є крохмаль (Wang et al., 1998; Sehnke et al., 2001). У бобових рослин накопичення крохмалю відбувається і в корневих бульбочках (Wang et al., 1998). З рис. 1, А видно, що у фазі 4-5 листків концентрація крохмалю в листках рослин *P. sativum* L., інокульованих бактеріями штамів RRL4-RRL6, RRL8 та 245а, була нижчою порівняно з контролем на 38-57%.

Table 3.
The chlorophyll *a/b* ratio in the pea leaves from plants inoculated with nodule bacteria RRL1-RRL12 and 245a strains

Нижчу концентрацію крохмалю в листках інокульованих рослин гороху на початкових етапах росту можна пояснити інтенсивним формуванням бульбочок в цей період, куди і спрямовується частина ресурсів. Окрім того, у рослин, які піддавались обробці бактеріями штамів RRL1, RRL9 та RRL10, концентрація

крохмалю була вищою за таку у рослин, інокульованих стандартним штамом 245a на 38%. У фазі бутонізації, подібно до попередньої фази росту, у рослин, оброблених бактеріями штамів RRL4, RRL6, RRL12 та 245a, концентрація крохмалю була нижчою порівняно з контролем на 30, 44, 30 і 44% відповідно (рис. 1, Б).

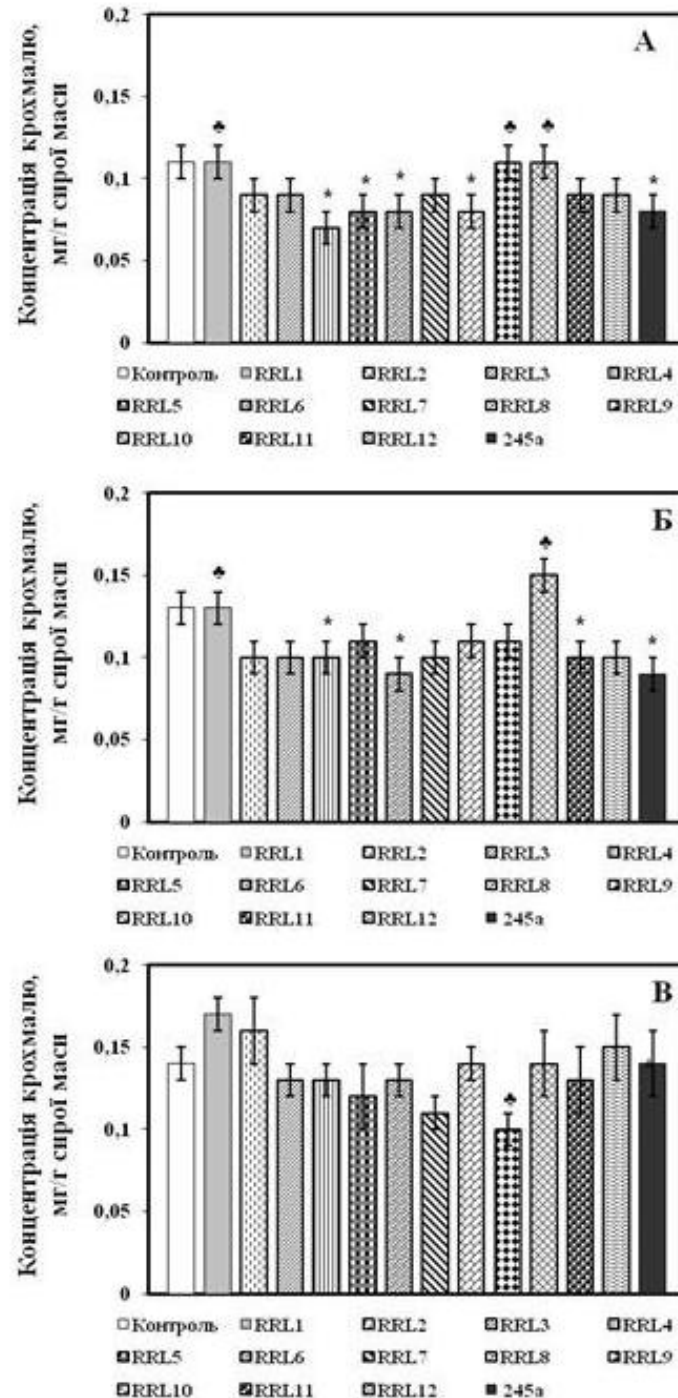


Рис. 1. Концентрація крохмалю в листках рослин гороху при обробці насіння бульбочковими бактеріями штамів RRL1-RRL12 та 245a у фазах 4-5 листків (А), бутонізації (Б) та цвітіння (В).

Примітка: *Вірогідно відмінне від відповідного контрольного значення (без обробки) та від стандартного штамів 245a з $P < 0,05$. ($n=3$).

Fig. 1. The starch concentration in pea plants inoculated with nodule bacteria RRL1-RRL12 and 245a strains at the stages of 4-5 leaves (A), budding (B) and flowering (B).

Note: *Significantly different from respective control values (without treatment) and ♦different from the respective 245a strain group with $P < 0.05$. ($n=3$).

У рослин, інокульованих бактеріями штамів RRL1 і RRL10, концентрація крохмалю перевищувала цей показник у рослин, оброблених стандартним штамом на 44 і 67% відповідно. У фазі цвітіння, інокуляція бульбочковими бактеріями не впливала на концентрацію крохмалю в листках гороху (рис. 1, B). Тільки в рослин, оброблених бактеріями штаму RRL9, концентрація даного показника була на 40% нижчою порівняно зі стандартним штамом.

Висновки. Проаналізувавши вміст пігментів і крохмалю в листках рослин гороху, вибрані місцеві штамви бульбочкових бактерій RRL8 і RRL9, обробка якими призводила до інтенсифікації фіксації азоту. Концентрація хлорофілів у рослин, насіння яких піддавалось інокуляції бактеріями цих штамів, у фазах бутонізації і цвітіння, була більшою за таку в контролі і у оброблених стандартним штамом рослин. Це вказує на можливість використання даних штамів у сільському господарстві з метою покращення врожайності гороху. У фазі цвітіння концентрація хлорофілу *a* була максимальною порівняно до інших фаз росту гороху. На початкових етапах онтогенезу рослини гороху, інокульовані бактеріями штамів RRL4-RRL6, RRL8 та 245a, мають нижчу концентрацію крохмалю в листках, порівняно з контролем. Це, ймовірно, пов'язане з інтенсивним формуванням бульбочок, куди і спрямовується частина фотоасимілятів.

Список літератури:

- Антипчук А.Ф., Краснобрига О.М., Леонова Н.О. та ін. Особливості формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу за умов забруднення важкими металами // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34, № 1. – С. 63 – 69.
- Біологічний азот / за редакцією В.П. Патики. – Київ: Світ, 2003. – 424 с.
- Воробей В.С., Григор'єва О.М., Андрощук С.Т., Ковалевська Т.М. Ефективність штаму *Rhizobium galegae* K-3 для інокуляції козлятника східного в різних ґрунтово-кліматичних умовах України // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2010. – Вип. 11. – С. 21 – 33.
- Охріменко С.М. Вміст пігментів у рослинах гороху при інокуляції клонами бульбочкових бактерій, стійкими до мінерального азоту // Физиология и биохимия культурных растений. – 2001. – Т. 33, № 6. – С. 535–538.
- Прядкина Г.А., Дмитриева В.В. Онтогенетические изменения содержания каротиноидов и ксантофиллов в листьях яровой пшеницы в зависимости от уровня азотного питания // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 212 – 219.
- Стамбульська У.Я., Луцкач В.І. Вплив місцевих ізолятів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на морфологічні показники рослин гороху // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2008. – Вип. 7. – С. 131 – 137.
- Хромих Н.О., Россихіна-Галича Г.С., Лихолат Ю.В. Післядія гербіцидної обробки на окисно-відновну активність та вміст хлорофілу у рослин пшениці наступної генерації // Науковий часопис Національного педагогічного університету ім. М.П. Драгоманова. Серія 20. Біологія. – 2013. – випуск 5. – С. 81 – 88.
- Aranjuelo I., Molero G., Erice G., Aldasoro J., Arrese-Igor C., Nogués, S. Effect of shoot removal on remobilization of carbon and nitrogen during regrowth of nitrogen-fixing alfalfa // Physiologia plantarum. – 2015. – Vol. 153, N 1. – P. 91– 104.
- Chang C.W. Starch and its component ratio in developing cotton leaves // Plant physiology. – 1979. – Vol. 63. – P. 973 – 977.
- Hu L., Yu J., Liao W., Zhang, G, Xie J., Lv J., Bu, R. Moderate ammonium: nitrate alleviates low light intensity stress in mini Chinese cabbage seedling by regulating root architecture and photosynthesis // Scientia Horticulturae. – 2015. – Vol. 186. – P. 143– 153.
- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in enzymology. – 1987. – Vol. 148. – P. 331 – 382.
- Sehnke P.C., Chung H., Wu K., Ferl R.J. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins // Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. – 2001. – Vol. 98, N 2. – P. 765 – 770.
- Identification and characterization of the intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase enzyme PhaZ of *Sinorhizobium meliloti* / M. A. Trainer, D. Capstick, A. Zachertowska // BMC Microbiology. – 2010. – Vol. 10, N 92. – P. 1–10.
- White J.P., Prell J., Ramachandran V. K., Poole P.S. Characterization of γ -aminobutyric acid transport system of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 // Journal of bacteriology. – 2009. – Vol. 191, N 5. – P. 1547 – 1555.
- Wang T.L., Bogracheva T.Ya., Hedley C.L. Starch: as simple as A, B, C? // Journal of experimental botany. – 1998. – Vol. 49, N 320. – P. 481 – 502.
- Xu H., Vavilin D., Vermaas W. Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complex of cyanobacteria // Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. – 2001. – Vol. 98, N 24. – P. 14168 – 14173.

References:

- Antypchuk A.F., Krasnobryzha O.M., Leonova N.O. та ін. Osoblyvosti formuvannia ta funktsionuvannia bobovo-ryzobialnoho symbiozu za umov zabrudnennia vazhkymy metalamy // Fyziolohyia i byokhymyia kulturnikh rastenyi. – 2002. – Т. 34, № 1. – С. 63 – 69.

2. Aranjuelo I., Molero G., Erice G., Aldasoro J., Arrese-Igor C., Nogués, S. Effect of shoot removal on remobilization of carbon and nitrogen during regrowth of nitrogen-fixing alfalfa // *Physiologia plantarum*. – 2015. – Vol. 153, N 1. – P. 91– 104.
3. Біологічний азот / за редакцією В.П. Патюк. – Київ: Світ, 2003. – 424 с.
4. Chang C.W. Starch and its component ratio in developing cotton leaves // *Plant physiology*. – 1979. – Vol. 63. – P. 973 – 977.
5. Hu L., Yu J., Liao W., Zhang, G, Xie J., Lv J., Bu, R. Moderate ammonium: nitrate alleviates low light intensity stress in mini Chinese cabbage seedling by regulating root architecture and photosynthesis // *Scientia Horticulturae*. – 2015. – Vol. 186. – P. 143– 153.
6. Identification and characterization of the intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase enzyme PhaZ of *Sinorhizobium meliloti* / M. A. Trainer, D. Capstick, A. Zachertowska // *BMC Microbiology*. – 2010. – Vol. 10, N 92. – P. 1–10.
7. Khromykh N.O., Rossykhina-Halycha H.S., Lykholat Yu.V. Pisladiia herbisydnoi obrobky na okysno-vidnovnu aktyvnist ta vmist khlorofilu u roslyn pshenytsi nastupnoi heneratsii // *Naukovi chasopys Natsionalnoho pedahohichnoho universytetu im. M.P. Drahomanova. Seriya 20. Biolohiia*. – 2013. – Vyp. 5.– S. 81 – 88.
8. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in enzymology*. – 1987. – Vol. 148. – P. 331 – 382.
9. Okhrimenko S.M. Vmist pihmentiv u roslynakh horokhu pry inokuliyatsii klonamy bulbochkovykh bakterii, stiikymy do mineralnoho azotu // *Fyzyolohiya i byokhymiya kulturnykh rastenyi*. – 2001. – T. 33, № 6. – S. 535 – 538.
10. Priadkyna H.A., Dmytryeva V.V. Ontohenetycheskye izmeneniya soderzhaniya karotynoydov i ksantofyllov v lystyakh yarovoi pshenytsi v zavysymosti ot urovnia azotnoho pytaniya // *Fyzyolohiya i byokhymiya kulturnykh rastenyi*. – 2007. – T. 39, № 3. – S. 212 – 219.
11. Sehnke P.C., Chung H., Wu K., Ferl R.J. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins // *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98, N 2. – P. 765 – 770.
12. Stambulska U.Ia., Lushchak V.I. Vplyv mistsevykh izolyativ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* na morfolohichni pokaznyky roslyn horokhu // *Silskohospodarska mikrobiolohiia: Mizhvidomchyi tematychnyi naukovi zbirnyk*. – 2008. – Vyp. 7. – S. 131 – 137.
13. Vorobei V.S., Hryhorieva O.M., Androshchuk S.T., Kovalevska T.M. Efektyvnist shtamu *Rhizobium galegae* K-3 dlia inokuliyatsii kozliatnyka skhidnoho v riznykh gruntovo-klimatychnykh umovakh Ukrainy // *Silskohospodarska mikrobiolohiia: Mizhvidomchyi tematychnyi naukovi zbirnyk*. – 2010. – Vyp. 11. – S. 21 – 33.
14. Wang T.L., Bogracheva T.Ya., Hedley C.L. Starch: as simple as A, B, C? // *Journal of experimental botany*. – 1998. – Vol. 49, N 320. – P. 481 – 502.
15. White J.P., Prell J., Ramachandran V. K., Poole P.S. Characterization of γ -aminobutyric acid transport system of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 // *Journal of bacteriology*. – 2009. – Vol. 191, N 5. – P. 1547 – 1555.
16. Xu H., Vavilin D., Vermaas W. Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complex of cyanobacteria // *PNAS USA*. – 2001. – Vol. 98, N 24. – P. 14168 – 14173.

EFFECT OF LOCAL STRAINS OF NITROGEN FIXING NODULE BACTERIA ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF PEA PLANTS

U.Ya. Stambulska

*Leguminous plants demonstrates cooperation between the processes of photosynthesis and nitrogen fixation. The concentration of pigments depends on the nitrogen supply to plants. Photosynthetic products which are formed in leaves are the main energy source for nodule growth, bacteroid respiration and nitrogen fixation. Influence of seed treatment by nodule bacteria *Rhizobium* on pigment and starch content in pea plants was studied. Effectivity of rhizobia was evaluated in field experiments which were conducted at three vegetation seasons. In this study we used fast-growing nodules bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains RRL1-RRL12, isolated from pea plants in the Ivano-Frankivsk region. The *Rhizobium leguminosarum* 245a strain was used as the reference strain based on its efficiency. Pigments were extracted from the pea plants leaves by 96% ethanol. The concentration of pigments was determined by spectrophotometric method. Concentration of starch was measured by colorimetric method which based on formation of colored complex starch-iodine. It was found that concentration of chlorophylls in pea leaves was higher at the budding and flowering stages, in plants inoculated with local strains RRL8 and RRL9 as compared to control and treated with standard strain plants. It seems that these strains can be used in agriculture for the seed inoculation for fixation of air nitrogen to enhance the pea crop capacity. The concentration of chlorophyll *a* was the highest at the flowering stage in comparison to the previous growth stages of pea plants. At the 4-5 leaves stage, the concentration of starch in plants inoculated with RRL4-RRL6, RRL8 and 245a strains was 38-57% lower compared to controls. This could be related with intensive nodules formation.*

*Key words: nodule bacteria; *Rhizobium leguminosarum*; pea; pigments; starch.*

Одержано редколлегією 05.03.2015