

ВПЛИВ СИМБІОТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* НА ЦИТОКІНІНОВИЙ СТАТУС РОСЛИН СОЇ

В умовах вегетаційного дослідження вивчали вплив штамів та Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* із різними симбіотичними характеристиками на рівень фітогормонів цитокінінової природи у коренях та бульбочках сої *Glycine max* L. (Merr.) сорту Мар'яна. Встановлено прямий зв'язок між вмістом зеатину в кореневих бульбочках сої та ефективністю інокулянта в фазі першого трійчастого листка та бутонізації. Висунуто припущення, що вміст зеатину та зеатинрибозиду в бульбочках на початкових етапах формування симбіотичного апарату може бути пов'язаний із вірулентністю ризобій.

Ключові слова: *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутанти, цитокініни, зеатин, зеатинрибозид

В останні роки інтерес дослідників спрямований на поглиблене вивчення ролі фітогормонів у динамічних симбіотичних системах рослина-господар-мікроорганізми та з'ясування природи і характеру взаємодії макро- і мікроорганізмів. Серед усіх відомих на сьогодні класів гормонів рослин важливе місце у встановленні і функціонуванні симбіотичних взаємовідносин посідають гормони цитокінінової природи [1, 2, 7].

У коренях бобових цитокінінам належить основна роль у реактивації клітинного циклу та генів, асоційованих із ним, а також низки генів ранньої нодуляції, зокрема *ENOD2*, *ENOD12A*, *ENOD40*, що в подальшому ініціює утворення корневих бульбочок [5–7]. Поряд із рослинними фітогормонами не виключена участь і ризобіальних цитокінінів у регуляції даного процесу, що також сприяє формуванню симбіотичного апарату [6].

Розумінню специфіки гормональної реакції рослин на інокуляцію сприяє використання у дослідженнях різних за ефективністю ризобій зі зміненими симбіотичними ознаками, отриманих сучасними методами генетичної інженерії [4].

Метою наших досліджень було вивчення зв'язку між симбіотичними властивостями штамів-інокулянтів і вмістом фітогормонів цитокінінової природи у коренях та корневих бульбочках сої.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили з рослинами сої (*Glycine max* L. (Merr.) сорту Мар'яна, інокульованої різними за ефективністю штамми *Bradyrhizobium japonicum*: 646 (вихідний штам, високоактивний, високовірулентний), 604к (неактивний, високовірулентний) і T21-2 (високоактивний, високовірулентний) та Tn5-мутантами штаму 646: 9-1 (високоактивний, середньовірулентний), 113 (малоактивний, високовірулентний) із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. У контрольному варіанті використовувалися рослини без інокуляції.

Рослини вирощували у посудинах Вагнера в піщаній культурі з внесенням поживної суміші Гельрігеля з 0,25 норми азоту за умов природного освітлення та оптимального (60% повної вологоємності) водозабезпечення. Перед посівом простерилізоване 70% етанолом і промите під проточною водою насіння інокулювали протягом 1 год. суспензіями бульбочкових бактерій, концентрація яких становила 10^7 клітин/мл.

Вміст цитокінінів (зеатин та зеатинрибозид) у коренях та бульбочках сої в одній рослинній пробі визначали методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [3].

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали з використанням ПЕОМ і з залученням пакетів програм Microsoft Excel'10.

Результати досліджень та їх обговорення

Відомо, що ризобії індукують зміни балансу цитокінінів як у коренях, так і у бульбочках. Рівень бульбочкових цитокінінів порівняно з кореневими, може підвищуватись у численних видів рослин – *Pisum sativum*, *Phaseolus mungo*, *Myrica gale*, *Vicia faba* [6].

У ході наших досліджень було відмічено, що інокуляція насіння сої штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* різної ефективності приводить до незначного збільшення пулу зеатину в коренях порівняно з контролем на початкових стадіях становлення симбіотичних взаємовідносин (рис. 1).

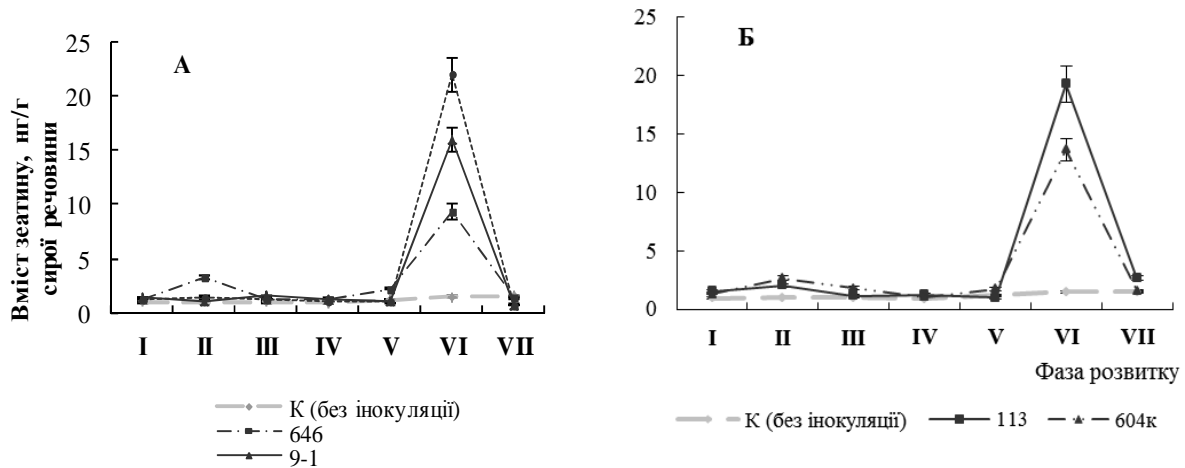


Рис. 1. Вміст зеатину в коренях рослин сої за використання активних (А) та малоактивного й неактивного (Б) штамів і Tn5-мутантів *B. japonicum*. *Тут і надалі фази розвитку сої: I – поява сім’ядольних листків, II – сім’ядольних листків, III – першого трійчастого листка, IV – двох трійчастих листків, V – трьох трійчастих листків, VI – бутонізації, VII – цвітіння

У той же час у фазу бутонізації показник вмісту зеатину в коренях контрольного варіанту кардинально відрізнявся від дослідних, внаслідок чого можна припустити, що функціонування симбіотичної системи та синтез зеатину тісно пов’язані між собою, при цьому вплив бактеризації на вміст даного гормону в коренях є визначальним, незалежно від ефективності штамів-інокулянтів.

При визначенні вмісту зеатину в кореневих бульбочках відзначено два періоди в онтогенезі сої, коли суттєво підвищується вміст даного гормону: під час формування симбіотичного апарату (фаза першого трійчастого листка) та його активного функціонування (фаза бутонізації та цвітіння) (рис. 2).

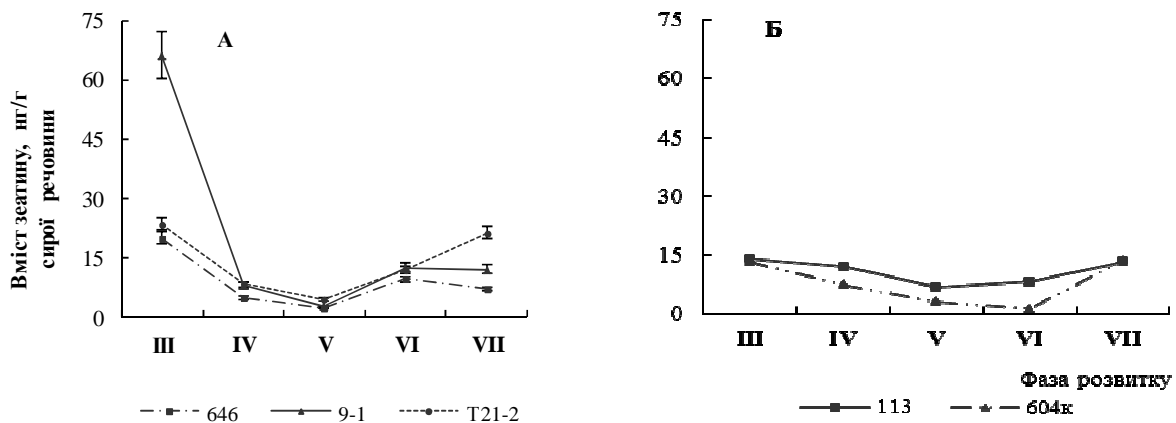


Рис. 2. Рівень зеатину в кореневих бульбочках сої, бактеризованої активними (А), малоактивним і неактивним (Б) штамми та транспозоновими мутантами *B. japonicum*

У фазу першого трійчастого листка високий вміст зеатину в бульбочках пояснюється активною участю цитокінінів у ранніх процесах нодуляції. Необхідно виділити варіант за використання високоактивного середньовірулентного Tn5-мутанту 9-1, який характеризується найбільшим вмістом зеатину.

Знову ж таки, у фазу бутонізації рослини, бактеризовані високоефективними штамми та мутантами *B. japonicum*, відзначалися найвищими показниками вмісту зеатину в бульбочках (рис. 2).

Окрім рівня зеатину в корневих бульбочках було визначено пул іншого гормону цитокінінової природи – зеатинрибозиду. У ході досліджень було показано, що у всіх рослин, бактеризованих високовірулентними штамми, як активними, так і неактивними, показник вмісту цитокінінів у бульбочках коливався приблизно в однакових межах, тоді як у варіантах із застосуванням середньовірулентного високоактивного транспозонового мутанту 9-1 цей показник більш, ніж у два рази вищий порівняно з іншими варіантами (рис. 3).

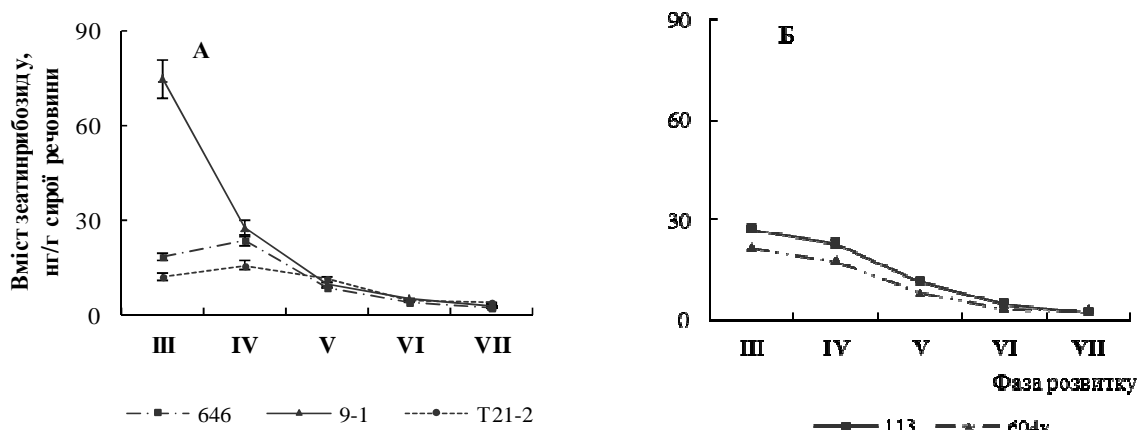


Рис. 3. Вміст зеатинрибозиду в коренях рослин сої за інокуляції активними (А) та малоактивним і неактивним (Б) штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum*

Таке суттєве підвищення показників вмісту зеатину та зеатинрибозиду в бульбочках сої, інокульованої 9-1, на нашу думку, можна пояснити характерним для цього варіанту пізнім формуванням бульбочок.

Очевидно, подальші дослідження з вивчення вмісту зеатину та зеатинрибозиду в корневих бульбочках на початкових етапах формування симбіотичного апарату за умови істотного збільшення спектру штамів із різною вірулентністю зможуть підтвердити зв'язок між вмістом цитокінінів у бульбочках і вірулентністю ризобій.

Висновки

Виявлено прямий зв'язок між вмістом зеатину в корневих бульбочках сої та ефективністю штам-інокулянта в фазі першого трійчастого листка та бутонізації.

1. *Биологическая* фиксация азота: бобово-ризобияльный симбиоз / [Коць С. Я., Моргун В. В., Патыка В. Ф. и др.]. — [монография : в 4-х т.]. — К.: Логос, 2011. — Т. 2. — 523 с.
2. Гришук О. О. Динаміка вмісту фітогормонів цитокінінової природи у коренях і бульбочках сої на ранніх етапах формування бобово-ризобіального симбіозу / О. О. Гришук, С. Я. Коць, М. В. Волкогон // *Физиология и биохимия культ. растений*. — 2013. — 45, № 1. — С. 20—28.
3. Савинский С. В. Определение зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / С. В. Савинский, И. В. Драгозов, В. К. Педченко // *Физиология и биохимия культ. растений*. — 1991. — 23, № 6. — С. 611—619.
4. *Транспозоновий* мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* / [С. М. Маліченко, В. К. Даценко, В. М. Василюк, С. Я. Коць] // *Физиология и биохимия культ. растений*. — 2007. — 39, № 5. — С. 409—418.

5. Dehio C. The early nodulin gene SrEnod2 from *Sesbania rostrata* is 10 inducible by cytokinin / C. Dehio, F. J. de Bruijn // Plant J. — 1992. — 2. — P. 117—128.
6. Ferguson B. J. Signaling interactions during nodule development / B. J. Ferguson, U. Mathesius // J. Plant Growth Reg. — 2003. — 22, N 1. — P. 47—72.
7. Nagata M. Effects of phytohormones on nodulation and nitrogen fixation in leguminous plants / M. Nagata, A. Suzuki // Advances in biology and ecology of nitrogen fixation. — 2014. — P. 111—128.

Е.А. Грищук, В.И. Грищук, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

ВЛИЯНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* НА ЦИТОКИНИНОВЫЙ СТАТУС РАСТЕНИЙ СОИ

В условиях вегетационного опыта исследовали влияние штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* с различными симбиотическими характеристиками на уровень фитогормонов цитокининовой природы в корнях и клубеньках сои *Glycine max* L. (Merr.) сорта Марьяна. Показано резкое увеличение содержания зеатина в корнях в фазу бутонизации во всех исследуемых вариантах, кроме контрольного, что указывает на тесную связь функционирования симбиотической системы и синтеза зеатина, при этом влияние бактериализации на содержание данного гормона в корнях является определяющим, независимо от эффективности инокулянта. Установлена прямая зависимость между содержанием зеатина в корневых клубеньках растений сои и эффективностью штамма-инокулянта в фазы первого тройчатого листа и бутонизации. Выдвинуто предположение, что содержание зеатина и зеатинрибозидов в клубеньках на начальных этапах формирования симбиотического аппарата может быть связано с вирулентностью штаммов *B. japonicum*.

Ключевые слова: *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутанты, цитокинины, зеатин, зеатинрибозид

O.O. Gryshchuk, V.I. Gryshchuk, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine

EFFECT OF SYMBIOTIC CHARACTERISTICS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ON CYTOKININ STATUS OF SOYBEAN PLANTS

The effect of strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* possessing various symbiotic characteristics on the level of phytohormones of cytokinin nature in roots and nodules of soybean plants *Glycine max* L. (Merr.) cult. Mariana was studied in plant-house experiment. The sharp increase in zeatin content in plant roots at budding stage was observed in all studied variants, except for the control one, that indicates the close relationship between functioning of symbiotic system and zeatin synthesis. Herewith the bacterization influence on zeatin content in the roots is determining regardless of the effectiveness of inoculum. The direct relationship between zeatin content in nodules of soybean plants and efficiency of strain-inoculum at first ternate leaf and budding stages was revealed. It is suggested that the zeatin and zeatin riboside content in the nodules at the initial stages of symbiotic apparatus formation might be closely associated with the virulence of the *B. japonicum* strains.

Key words: *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-mutants, cytokinins, zeatin, zeatin riboside

Рекомендує до друку

С.В. Пида

Надійшла 03.06.2014