

ДИНАМІКА ВМІСТУ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ У КОРЕНЯХ СОЇ ЗА ІНОКУЛЯЦІЇ РІЗНИМИ ЗА ЕФЕКТИВНІСТЮ ШТАМАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Вивчали особливості складу моно- і дикарбонових кислот коренів рослин сої за інокуляції штамми *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності. Показано, що інокуляція сої ризобіями сприяє підвищенню вмісту бензойної, малонової, яблучної та бурштинової органічних кислот, які, як відомо, є адаптогенами за дії стресових чинників. При цьому їх кількість не залежала від ефективності штаму-інокулянта. Висунуто припущення, що інокуляція сої не лише покращує її азотне живлення, а й стимулює синтез сполук, які підвищують стійкість рослин до стресу.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, соя, органічні кислоти, метаболіти

У процесі формування бобово-ризобіального симбіозу клітини рослин і ризобії зазнають істотних структурних та біохімічних змін. Зокрема, в них синтезується низка метаболітів, необхідних для функціонування симбіотичного апарату. Тому, для покращення розуміння окремих фізіолого-біохімічних особливостей при формуванні симбіотичних систем необхідне дослідження метаболічного профілю рослин. Серед відомих метаболітів нами надано перевагу органічним кислотам. Виходячи з існуючих літературних даних про їх безпосередню участь у більшості фізіологічних реакцій, пов'язаних із ростом і розвитком рослин, та у рослинно-мікробних взаємодіях за мету було поставлено дослідити динаміку вмісту даних сполук при формуванні симбіотичних систем різної ефективності. Це дозволить виявити механізми регуляції ефективності взаємодії партнерів та з'ясувати роль біологічних молекул у метаболізмі симбіозів різної ефективності.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктами дослідження були корені рослин сої (*Glycine max* L. Merr.) сорту Васильківська, інокульованої різними за ефективністю штамми *Bradyrhizobium japonicum* – 634б (активний, високовірулентний) і 604к (неактивний, високовірулентний) із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Відбори зразків рослин для аналізу проводили у фази бутонізації (I відбір), початок цвітіння (II відбір) і масового цвітіння (III відбір).

Екстракцію органічних кислот проводили за загальноприйнятою методикою виділення метаболітів із коренів рослин [3].

Зразки аналізували на хроматографі «Agilent GC system 7890A» (США) з мас-спектрометром 5975С, із застосуванням HP5MS капілярної колонки довжиною 30 м, внутрішній діаметр якої 0,25 мм, плівкою щільністю 0,25 мкм та постійним протоком гелію 1 мл/хв. Об'єм досліджуваного зразка становив 2 мкл. Запрограмована температура колонки від 80°C до 300°C. Повторність усіх визначень трьохразова.

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз метаболітів коренів сої, інокульованої штамми *B. japonicum* різної ефективності, дозволив виявити широкий спектр органічних кислот: монокарбонові, що включають ароматичні і аліфатичні, які в свою чергу поділяються на насичені та ненасичені; дикарбонові; моноцукри із карбоксильною групою (цукрові кислоти) та інші (табл. 1).

Спектр органічних кислот, виділених із коренів сої, інокульованої штамми *V. japonicum* різної ефективності

МОНОКАРБОНОВІ			ДИКАРБОНОВІ	МОНОЦУКРИ З КАРБОКСИЛЬНОЮ ГРУПОЮ	ІНШІ
ароматичні	аліфатичні				
	насичені	ненасичені			
бензойна	мурашина	корична	щавелева	ксилонова	тіогліколева
анісова	оцтова	кротонова	малонова	глюконова	вугільна
	пропіонова		бурштинова	треонова	2-кетобутирова
	масляна		глутарова	манонова	2-кетоглутарова
	валеріанова		яблучна		гідроксибутирова
	гексанова		винна		
	пальмітинова		фумарова		
	стеаринова				
	пеларгонова				
	каприлова				

Усі ідентифіковані кислоти є основними компонентами циклу Кребса, метаболізму пірвіноградної кислоти, рослинно-мікробних взаємодій тощо.

Аналіз вмісту дикарбонівих кислот у коренях сої показав (табл. 2), що інокуляція сої сприяє збільшенню вмісту малонової, бурштинової та яблучної кислот, порівняно із контрольним неінокульованим варіантом. При цьому рівень малонової та яблучної кислот збільшувався з розвитком рослин. Фумарова кислота була ідентифікована лише у контрольному варіанті і лише у фази бутонізації та початку цвітіння. Більшість дикарбонівих кислот є основними компонентами вуглецевого та азотного метаболізмів, а також головними компонентами сигнального каскаду при формуванні стійкості рослин до стресів. Так, бурштинова кислота є стресовим адаптогеном та помірним активатором росту, що покращує засвоєваність речовин із ґрунту [1]. Малонова кислота є алелопатичним агентом, який у значній кількості синтезується рослиною у відповідь на дію різних патогенів, зокрема грибів роду *Fusarium* [1]. Здатність рослин до активного синтезу даних кислот є маркером їх стійкості до впливу негативних зовнішніх чинників.

Таблиця 2

Кількість дикарбонівих кислот, виділених із коренів сої, інокульованої штамми *V. japonicum* різної ефективності, мг/1г зразка

Дикарбоніві кислоти	I відбір (бутонізація)			II відбір (початок цвітіння)			III відбір (масове цвітіння)		
	конт- роль	646	604к	конт- роль	646	604к	конт- роль	646	604к
малонова	0,59	1,14	1,33	0,20	1,50	1,69	1,57	3,15	2,65
бурштинова	0,11	0,20	0,22	0,11	1,26	1,06	0,21	0,59	0,84
яблучна	0,41	1,10	0,99	0,35	1,91	2,57	1,49	3,52	2,35
фумарова	0,07	-	0,01	0,07	-	-	-	-	-

Серед монокарбонівих кислот у відповідь на інокуляцію змінювався рівень лише бензойної кислоти (табл. 3), яка відома своєю антимікробною дією [4].

Попередня обробка рослин даною кислотою підвищує стійкість рослин до інфекційних агентів, а також сприяє їх адаптації до холоду та посухи, оскільки вона є попередником синтезу саліцилової кислоти [2]. Разом із тим, саліцилової кислоти в досліджених зразках сої нами не виявлено.

Кількість монокарбонових кислот, виділених із коренів сої, інокульованої штамми *B. japonicum* різної ефективності, мг/1г зразка

Монокарбонові кислоти	I відбір (бутонізація)			II відбір (початок цвітіння)			III відбір (масове цвітіння)		
	конт- роль	646	604к	конт- роль	646	604к	конт- роль	646	604к
оцтова	0,44	0,31	0,90	2,64	0,37	0,09	0,10	0,19	0,18
пропіонова	5,74	4,71	2,02	1,69	3,81	2,71	3,48	3,39	2,31
масляна	0,44	-	-	0,02	0,22	0,11	0,20	-	0,22
валеріанова	-	0,04	-	0,04	0,04	0,24	-	0,13	-
пальмітинова	9,59	9,17	8,40	7,28	7,41	8,43	7,20	6,40	6,80
стеаринова	9,66	8,29	7,92	7,30	6,34	6,11	5,41	5,29	4,93
бензойна	0,18	0,40	0,38	0,20	1,44	1,36	0,65	1,57	1,46

Згідно літературних джерел, інокуляція рослин сприяє підвищеному синтезу монокарбонових жирних кислот, таких як стеаринова та пальмітинова, що є наслідком посиленого клітинного біосинтезу мембранних ліпідів [5]. Разом із тим найвищий вміст даних кислот був відмічений у варіанті без інокуляції. На нашу думку, це є наслідком завершення формування симбіозу в даний період та розвитком стресу в контрольних рослинах на фоні дефіциту азоту.

У результаті проведених нами досліджень вивчено у динаміці синтез органічних кислот протягом періоду активного функціонування симбіотичних систем *Glycine max*-*B. japonicum* різної ефективності. Отримані дані свідчать про те, що інокуляція як активними, так і неактивними штамми *B. japonicum* сприяє синтезу органічних сполук, які не лише беруть участь у функціонуванні симбіозу, а й здатні створювати передумови для підвищення стійкості рослин до стресових чинників.

1. *Allelopathic effect of root exudates on pathogenic fungi of root rot in continuous cropping soybean* / [Ju H., Han L., Wang S. et al.] // *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* — 2002. — 13, N 6. — P. 723—727.
2. *Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants* / [Senaratna T., Merritt D., Dixon K. et al.] // *Plant Growth Regulation.* — 2003. — 39, N 1. — P. 77—81.
3. *Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants* / [Lisec J., Schauer N., Kopka J. et al.] // *Nature protocols.* — 2006. — 1, N 1. — P. 387—396.
4. *Soybean Metabolites Regulated in Root Hairs in Response to the symbiotic bacterium Bradyrhizobium japonicum* / [Brenchenmacher L., Lei Z., Libault M. et al.] // *Plant Physiol.* — 2010. — 153, N 4. — P. 1808—1822.
5. *Upchurch R.G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress* / Upchurch R.G. // *Biotechnol Lett.* — 2008. — 30, N 6. — P. 967—977.

А.С. Левшико, П.Н. Маменко, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

ДИНАМИКА ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В КОРНЯХ СОИ ИНОКУЛИРОВАННОЙ РАЗНЫМИ ПО ЭФФЕКТИВНОСТИ ШТАММАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Данное исследование было проведено для оценки эффективности инокуляции *Glycine max* (соя) активным и неактивным штаммами *Bradyrhizobium japonicum* на метаболитный профиль (в частности органические кислоты) корней сои. Анализ органических кислот проводили с использованием ГХ-МС. Экспериментальные данные показали, что корни сои, инокулированной как активным, так и неактивным штаммами клубеньковых бактерий содержали большее количество органических кислот, по сравнению с контрольными растениями. Инокуляция сои ризобиями вызвала изменения в количественном соотношении бензойной, малоновой, яблочной и янтарной кислот. Исследования показывают, что инокуляция индуцирует синтез физиологически

активных веществ, стимулирующих устойчивость растений к отрицательным воздействиям окружающей среды. Таким образом, полученные данные не только способствуют пониманию некоторых аспектов взаимодействия бобовых и клубеньковых бактерий, а также могут быть использованы для разработки стратегии создания растений с высокой экологической пластичностью.

Ключевые слова: Bradyrhizobium japonicum, соя, органические кислоты, метаболиты

A.S. Levishko, P.M. Mamenko, S.Ya. Kots
Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine

DYNAMICS OF ORGANIC ACIDS IN SOYBEAN ROOTS INOCULATED BY *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS WITH DIFFERENT SYMBIOTIC PROPERTIES

This study was conducted in order to assess the efficiency of the inoculation of *Glycine max* (soybean) with the active and inactive strains of *Bradyrhizobium japonicum* on the metabolite profile (in particular, organic acids) of soybean roots. The analysis of organic acids was performed using GC-MS. The experimental data showed that the soybean roots inoculated with active, as well as, with inactive strain of nodule bacteria contained more organic acids, in comparison to the roots which were not treated by rhizobia. Inoculation with nodule bacteria caused the changes in the quantitative ratio of benzoic, malonic, malic and succinic acids. The studies show that the inoculation of soybean seeds induces the synthesis of physiological active products in plants affected by stress and there by stimulates the plant resistance to environment stress. Thus, our findings contribute to the understanding of some aspects of the interaction between legumes and nodule bacteria, and besides, these data can be used for the developing of the strategy for the creation of plants with high ecological flexibility.

Keywords: Bradyrhizobium japonicum, soybean, organic acids, metabolites

Рекомендує до друку
С.В. Пида

Надійшла 29.04.2014

УДК 577.175.1 + 579.841.3 + 632.35

¹Н.О. ЛЕОНОВА, ¹Л.А. ДАНКЕВИЧ, ²С.Ф. ПАДАЛКО, ²Л.В. БОБИК, ¹І.В. ДРАГОВОЗ

¹Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д03680

²Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська 31/17, Київ, 03022

СИНТЕЗ АУКСИНІВ ТА ЦИТОКІНІНІВ РІЗНИМИ ФІЗІОЛОГІЧНИМИ ГРУПАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ РИЗОСФЕРИ ТА ФІЛОСФЕРИ СОЇ

Досліджено здатність до синтезу позаклітинних ауксинів і цитокінінів симбіотичними ризобіями, фосфатмобілізувальними бацилами та патогенними для сої бактеріями. Обговорено різну фізіологічну спрямованість дії фітогормонів–стимуляторів при формуванні взаємовідносин цих мікроорганізмів з рослиною–хазяїном, пов’язану з особливостями їх біології.

Ключові слова: ауксини, цитокініни, симбіотичні ризобії сої, фосфатмобілізувальні бактерії, фітопатогенні бактерії, рослинно-мікробні взаємодії

Рослинно-мікробні взаємодії в даний час активно вивчаються у багатьох країнах світу. Це зумовлено не тільки важливістю розуміння фундаментальних основ формування взаємовідносин