

N.O. Leonova, L.A. Dankevich, S.Ph. Padalko, L.V. Bobyk, I.V. Dragovoz

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

AUXINS AND CYTOKININS SYNTHESIS BY VARIOUS PHYSIOLOGICAL GROUPS OF MICROORGANISMS IN RHIZOSPHERE AND PHILLOSFERE OF SOYBEAN

A capacity of symbiotic rhizobia, phosphate mobilizing bacilli and pathogenic for soybean bacteria to synthesis of extracellular auxins and cytokinins has been researched. The various physiology influents of hormones-stimulants on forming of relationships of these microorganisms with a host plant, correlated with their biology have been discussed.

Keywords: auxins, cytokinins, symbiotic rhizobia, phosphate mobilizing bacteria, phytopathogenic bacteria, plant-microbial interaction

Рекомендує до друку

Надійшла 16.04.2014

С.Я. Коць

УДК 581.1:243.1

В.М. МЕЛЬНИК, Д.А. КІРІЗІЙ, С.Я. КОЦЬ

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022

ФОТОСИНТЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ ТА АЗОТФІКСУВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ У РІЗНИХ ЗА ЕФЕКТИВНІСТЮ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМАХ СОЯ – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

В умовах піщаної культури вивчали азотфіксувальну активність (АФА), газообмін CO_2 (інтенсивність фотосинтезу (ІФ), дихання (ІД)) та інтенсивність транспірації (ІТ) у листках сої, інокульованої різними за ефективністю Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*. Виявлено пряму залежність між АФА кореневих бульбочок та ІФ на різних етапах розвитку рослин. У фазу бутонізації високі показники АФА, ІФ й ІД спостерігали у сої, що формувала з ризобіями ефективний симбіоз. Зниження АФА, ІФ й ІТ відмічали у варіантах із інокуляцією насіння сої малоефективними Tn5-мутантами. Як наслідок, дефіцит азоту і зменшення інтенсивності поглинання CO_2 , що його супроводжувало, призводили до зниження зернової продуктивності рослин у симбіотичних системах малої ефективності.

Ключові слова: азотфіксація, фотосинтез, дихання, транспірація, симбіоз, ефективність, соя, Bradyrhizobium japonicum

Адаптивне значення більшості мікробно-рослинних симбіозів полягає у використанні партнерами нових джерел живлення та енергії. У бобово-ризобіальних системах це досягається шляхом поєднання рослинного фотосинтезу і бактеріальної азотфіксації [7]. Біологічний азот експортується з бульбочок бобових у корені та надземну частину рослини. У свою чергу, фотоасиміляти слугують енергетичним матеріалом, С-акцепторами аміаку і джерелом вуглецю для росту кореневих бульбочок [9]. На забезпечення симбіотичної азотфіксації витрачається 10–20% від загальної продукції фотосинтезу, необхідної для росту рослин [10]. Надходження в рослини фіксованих азотних сполук потребує включення механізмів їх асиміляції і перерозподілу між різними органами, що приводить до встановлення характерного для кожного рослинного генотипу співвідношення С:N [4]. Між споживанням фотоасимілятів і експортом із бульбочок азоту встановлюється баланс, який певною мірою визначає ефективність симбіозу, його фізіологічну доцільність для рослини. Проте питання, як у різні фази онтогенезу реалізуються потреби симбіотичної системи в азоті та вуглеці з урахуванням закономірностей її формування, росту і функціонування, є складними і до кінця не вивченими.

У цьому контексті доцільними є експерименти з використанням симбіотичних систем різної ефективності, створення яких можливе, зокрема, за рахунок застосування в якості мікосимбіонтів мутантів бульбочкових бактерій. Важливе місце у розширенні спектра мінливості ризобій займає транспозоновий мутагенез. За допомогою цього методу з використанням плазміди рSUP2021::Tn5 [11] були отримані різні за ефективністю мутанти *B. japonicum* 646 [5]. Метою було порівняти деякі показники активності фотосинтетичного апарату (інтенсивність фотосинтезу, дихання, транспірації листків) та азотфіксувальну активність різних за ефективністю симбіотичних систем, сформованих за участю сої (*Glycine max* (L.) Merr.) та Tn5-мутантів *B. japonicum* 646.

Матеріал і методи досліджень

Сою вирощували в умовах вегетаційного досліду по шість рослин у 8-кілограмових посудинах Вагнера на річковому піску за природного освітлення та вологості субстрату 60% ПВ. Джерелом мінерального живлення була суміш Гельрїгеля (0,25 норми азоту) з додаванням мікроелементів. Бульбочкові бактерії отримані з музейної колекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Перед посівом насіння сої сорту Мар'яна стерилізували 15 хв 70%-ним розчином етанолу і промивали водою. Інокуляцію насіння здійснювали зволоженням бактеріальною суспензією в концентрації 10^8 кл./мл. Контролем слугували рослини сої, оброблені штамми *B. japonicum* 6346 і 646. Відбір зразків для аналізу проводили у фазі появи 3-х справжніх листків, бутонізації та цвітіння. АФА вимірювали ацетиленовим методом [8] на газовому хроматографі «Chromatograf – 504» (Польща). ІФ й ІД листків визначали за допомогою установки, змонтованої на базі оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ГІАМ-5М (Росія), включеного за диференціальною схемою, і розраховували за загальноприйнятою методикою [6]. ІТ визначали вимірюванням вологості повітря термоелектричним мікропсихрометром до та після проходження через листову камеру. Дослідження проводили у 3–6-кратній біологічній повторності, результати обробляли статистично [3].

Результати досліджень та їх обговорення

Раніше показано [2], що отримані Tn5-мутанти *B. japonicum* 646 за симбіотичними характеристиками можна поділити на ефективні (21-2, 9-1 і 17-2) і малоефективні (35-2, 107 і 113). Нашими дослідженнями виявлено пряму залежність між АФА кореневих бульбочок та ІФ у листках сої на різних етапах її онтогенезу (табл. 1). Коефіцієнт кореляції між цими показниками був найвищим у період бутонізації рослин і становив 0,88 (для порівняння: у фазі 3-х справжніх листків і цвітіння – відповідно 0,61 і 0,70). Відмічено, що рослини, інокульовані Tn5-мутантами 35-2, і 113, характеризувалися зниженням АФА кореневих бульбочок та ІФ у листках порівняно з варіантами із обробкою насіння активними ризобіями.

Таблиця 1

Динаміка азотфіксувальної активності (АФА) кореневих бульбочок (мкмоль C_2H_4 /(рослину · год)) та інтенсивності фотосинтезу (ІФ) (мг CO_2 /(дм² · год)) у листках сої, інокульованої штамми і Tn5-мутантами *B. japonicum* 646

Варіант	Фаза розвитку рослин					
	3 справжніх листки		бутонізація		цвітіння	
	АФА	ІФ	АФА	ІФ	АФА	ІФ
Штам						
6346	1,04 ± 0,2	23,7 ± 0,8	1,76 ± 0,1	25,8 ± 0,9	5,07 ± 0,5	26,7 ± 0,2
646	1,08 ± 0,2	19,6 ± 0,3	5,83 ± 0,2	32,0 ± 0,8	2,18 ± 0,4	26,7 ± 1,1
Tn5-мутант						
21-2	2,01 ± 0,4	27,7 ± 0,9	6,46 ± 0,3	29,8 ± 0,9	4,32 ± 0,8	22,8 ± 0,8
9-1	0,24 ± 0,0	25,6 ± 0,6	3,88 ± 0,4	29,3 ± 1,6	6,87 ± 0,6	22,9 ± 0,6
17-2	0,62 ± 0,1	21,6 ± 1,1	2,81 ± 0,3	24,8 ± 0,5	4,09 ± 0,5	26,4 ± 1,1
35-2	0,16 ± 0,1	21,2 ± 1,1	0,82 ± 0,1	22,8 ± 1,0	0,29 ± 0,0	15,1 ± 1,1
107	0,03 ± 0,0	20,8 ± 1,1	2,05 ± 0,2	22,9 ± 0,7	2,34 ± 0,1	20,4 ± 1,0
113	0,04 ± 0,0	15,8 ± 0,8	0,75 ± 0,1	17,6 ± 0,9	0,09 ± 0,0	14,4 ± 1,0

ЕКОЛОГІЯ

Відомо, що дихання залежить від умов живлення рослин, перш за все азотного [9]. У фазу бутонізації високі показники ІД ми відмічали у рослин сої, що формували ефективний симбіоз із вихідним штамом 646 і Tn5-мутантами 21-2, 9-1 і 17-2 (табл. 2). У всіх варіантах, за винятком тих, у яких інокуляцію проводили Tn5-мутантами 17-2 і 107, спостерігали тенденцію до зниження ІД листків у період цвітіння порівняно з фазою 3-х справжніх листків. Коефіцієнт кореляції між ІД та ІФ у фази бутонізації та цвітіння становили відповідно 0,82 і 0,84.

Встановлено, що інокуляція рослин сої різними за активністю Tn5-мутантами неоднаково впливала на ІТ протягом періоду дослідження (табл. 2). У фазу цвітіння високу ІТ відмічали у варіантах з інокуляцією штамми 6346, 646 і мутантами 9-1 та 17-2, що формували із рослинами високоефективний симбіоз. У сої, бактеризованої малоєфективним Tn5-мутантом 113, протягом усього досліджуваного періоду спостерігали зниження ІТ порівняно з контролями.

Таблиця 2

Динаміка інтенсивності дихання (ІД) ($\text{мг CO}_2/(\text{дм}^2 \cdot \text{год})$) та транспірації (ІТ) ($\text{г H}_2\text{O}/(\text{дм}^2 \cdot \text{год})$) у листках сої, інокульованої штамми і Tn5-мутантами *V. japonicum* 646

Варіант	Фаза розвитку рослин					
	3 справжніх листки		бутонізація		цвітіння	
	ІД	ІТ	ІД	ІТ	ІД	ІТ
Штам						
6346	2,4 ± 0,2	1,70 ± 0,0	2,0 ± 0,7	2,02 ± 0,1	2,3 ± 0,4	1,90 ± 0,0
646	3,6 ± 0,3	1,47 ± 0,1	3,0 ± 0,6	2,01 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,02 ± 0,2
Tn5-мутант						
21-2	3,6 ± 0,5	2,10 ± 0,2	3,5 ± 0,1	1,92 ± 0,0	1,8 ± 0,1	1,58 ± 0,2
9-1	2,7 ± 0,4	1,79 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,02 ± 0,1	1,7 ± 0,7	1,60 ± 0,2
17-2	1,6 ± 0,0	1,76 ± 0,2	2,6 ± 0,4	2,02 ± 0,2	2,5 ± 0,7	1,83 ± 0,2
35-2	2,0 ± 0,6	1,67 ± 0,1	1,8 ± 0,6	1,72 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,51 ± 0,1
107	1,8 ± 0,4	1,70 ± 0,1	2,1 ± 0,8	1,93 ± 0,1	2,1 ± 0,4	1,58 ± 0,1
113	3,4 ± 0,5	1,03 ± 0,0	1,9 ± 0,6	1,56 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,43 ± 0,1

Рослини сої, інокульованої малоєфективними ризобіями, відчували дефіцит азоту, що викликало зниження ІФ одиниці площі листової поверхні. На фоні цього зменшувалася кількість CO_2 , яка поглинається цілою рослиною, що призводило до зниження її зернової продуктивності [1].

Вивчення співвідношення параметрів газообміну й азотфіксувальної активності є важливим для пошуку шляхів підвищення урожайності бобових рослин і лежить у площині оптимізації взаємовідносин між симбіотичним та фотосинтетичним апаратами, а точніше – у змозі останнього забезпечити асимілятами як енергетичні потреби бактероїдів, що фіксують азот у корневих бульбочках, так і процеси вегетативного росту, і, особливо, репродуктивного розвитку рослин. Методом транспозонового мутагенезу отримано Tn5-мутанти, які не лише характеризуються різними симбіотичними властивостями, а й викликають зміни у фізіологічних процесах у рослин – партнерів симбіозу, зокрема, по-різному впливають на газообмін CO_2 .

Висновки

Виявлено пряму залежність між АФА корневих бульбочок та ІФ на різних етапах розвитку рослин. У фазу бутонізації високі показники АФА, ІФ й ІД спостерігали у сої, що формувала із ризобіями ефективний симбіоз. Зниження АФА, ІФ й ІТ відмічали у варіантах із інокуляцією насіння малоєфективними Tn5-мутантами. Як наслідок, дефіцит азоту і зменшення інтенсивності поглинання CO_2 , що його супроводжувало, призводили до зниження зернової продуктивності рослин у симбіотичних системах малої ефективності.

1. *Василюк В.М.* Активність пероксидази і каталази у сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* / В.М. Василюк, О.Д. Кругова, Н.М. Мандровська, С.Я. Коць // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — Т. 39, № 4. — С. 334—342.
2. *Василюк В.М.* Динаміка фотосинтетичної й азотфіксуючої активностей та продуктивність сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* / В.М. Василюк, Д.А. Кірізій, С.Я. Коць // Доповіді НАН України. — 2008. — № 1. — С. 147—152.
3. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
4. *Кретович В.Л.* Биохимия усвоения азота воздуха растениями / В.Л. Кретович. — М.: Наука, 1994. — 168 с.
5. *Маліченко С.М.* Транспозонний мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* / С.М. Маліченко, В.К. Даценко, В.М. Василюк, С.Я. Коць // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — Т. 39, № 5. — С. 409—418.
6. *Мокронос А.Т.* Онтогенетический аспект фотосинтеза / А.Т. Мокронос. — М.: Наука, 1981. — 196 с.
7. *Тихонович И.А.* Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / И.А.Тихонович, Н.А. Проворов. — СПб.: Наука, 1998. — 194 с.
8. *Hardy R.W.F.* The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation / R.W.F. Hardy, R.D. Holsten, E.K. Jackson, R.C. Burns // Plant Physiol. — 1968. — Vol. 43, N 8. — P. 1185—1207.
9. *Hunt S.* Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity / S. Hunt, D.B. Layzell // Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1993. — Vol. 44. — P. 483—511.
10. *Phillips D.A.* Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes / D.A. Phillips // Annu Rev. Plant Physiol. — 1980. — Vol. 31, N 11. — P. 29—49.
11. *Simon R.* Plasmid vector for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria / R. Simon, M. O'Connell, M. Labes, A. Puhler // Methods Enzymol. — 1986. — N. 118. — P. 640—659.

В.Н. Мельник, Д.А. Кірізій, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ В РАЗНЫХ ПО ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ СОЯ – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

В песчаной культуре изучали азотфиксирующую активность (АФА), газообмен CO₂ (интенсивность фотосинтеза (ИФ), дыхание (ИД)) и интенсивность транспирации (ИТ) листьев сои, инокулированной разными по эффективности Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*. Установлена прямая зависимость между АФА корневых клубеньков и ИФ на разных этапах развития растений. Коэффициент корреляции между этими показателями был максимальным в период бутонизации растений и составлял 0,88. В эту фазу высокую АФА, ИФ и ИД наблюдали у сои, которая формировала с ризобиями эффективный симбиоз по сравнению с вариантами с использованием малоэффективных клубеньковых бактерий. Снижение ИТ отмечали у растений, инокулированных малоэффективным Tn5-мутантом. Как результат, дефицит азота и уменьшение интенсивности поглощения CO₂, сопровождающий его, приводили к понижению зерновой продуктивности растений в симбиотических системах низкой эффективности.

Ключевые слова: азотфиксация, фотосинтез, дыхание, транспирация, симбиоз, эффективность, соя, *Bradyrhizobium japonicum*

V.N. Melnyk, D.A. Kiriziy, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

PHOTOSYNTHETIC PARAMETERS AND NITROGEN-FIXING ACTIVITY IN THE SYMBIOTIC SYSTEMS OF SOYBEAN – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* WITH DIFFERENT EFFICIENCY

The effect of the inoculation of soybean by the Tn5 mutants of *Bradyrhizobium japonicum* revealing different efficiency on the nitrogen-fixing activity (NFA), CO₂ gas exchange (photosynthesis intensity (PI), respiration (RI)) and transpiration rate (TR)) of leaves were studied. Direct relationship between NFA of the root nodules and PI were established during different stages of plant development. The greatest correlation coefficient between these parameters 0.88 was observed during the budding stage. In this phase of plant development the NFA, PI and RI were higher in soybean forming effective symbiosis

with rhizobia as compared to the plants inoculated by ineffective nodule bacteria. It was shown that the TR was reduced in the plants inoculated with ineffective Tn5 mutant. As a result, the nitrogen deficiency and decline of the intensity of CO₂ absorption accompanying it, led to the decrease in grain productivity of plants in the symbiotic systems of low efficiency.

Keywords: nitrogen fixation, photosynthesis, respiration, transpiration, symbiosis, efficiency, soybean, Bradyrhizobium japonicum

Рекомендує до друку
В.П. Патика

Надійшла 16.04.2014

УДК: 581.135.5:579.262

Н.М. МЕЛЬНИКОВА

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

ФОРМУВАННЯ БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ ЗА ДІЇ ЕКСУДАТІВ НАСІННЯ ЛЮПИНУ

Досліджували бульбочкоутворення у симбіозі люпин-*Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) 359a за дії ексудатів насіння люпину, азотфіксуючу активність бульбочок та формування надземної частини рослин в умовах дрібноділянкових експериментів. Показано, що 6-ти годинний ексудат насіння люпину сприяв збільшенню кількості корневих бульбочок у період розвитку рослин 8-10 листків, тоді як 20-ти годинний ексудат підвищував азотфіксуючу активність бобово-ризобіального симбіозу.

Ключові слова: ексудати насіння, люпин, бобово-ризобіальний симбіоз, азотфіксація, бульбочкоутворення

Бобово-ризобіальний симбіоз є одним із найбільш потужних джерел біологічного азоту, функціонування якого забезпечує рослини доступними сполуками цього елемента, що сприяє покращенню їх росту і розвитку.

Під час набухання і проростання насіння бобових виділяє в навколишнє середовище низку біологічно активних речовин, зокрема флавоноїди, які викликають експресію генів нод-факторів бульбочкових бактерій [7], лектин – гемаглютинуючий білок, який може суттєво впливати на розвиток бобово-ризобіального симбіозу [3] та інші сполуки, які сприяють розвитку симбіотичних взаємовідносин [9]. З огляду на те, що взаємодія між партнерами симбіозу розпочинається ще на доконтактному рівні, коли відбувається активізація необхідних для симбіотичного кооперування фізіологічних процесів у макро- та мікроорганізмів, ексудати, зокрема насінні, можуть мати значний вплив на формування бобово-ризобіального симбіозу. Метою роботи було дослідити спрямованість дії ексудатів насіння люпину, зібраних на різних етапах проростання, на формування бульбочок бактеріями *Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) 359a, азотфіксуючу активність останніх у симбіозі з люпином та розвиток надземної частини рослин в умовах дрібноділянкових експериментів.

Матеріал і методи досліджень

У дослідженнях використовували бульбочкові бактерії люпину *Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) 359a, надані з колекції Всеросійського НДІ сільськогосподарської мікробіології (Санкт-Петербург, Росія), які вирощували на манітно-дріжджовому середовищі, а також рослини люпину (*Lupinus luteus* L.) сорту Круглик. Насіння стерилізували 15% H₂O₂, промивали стерильною водою і пророщували в чашках Петрі з додаванням стерильної води при 24⁰С протягом 6-ти та 20-ти годин. Ексудати стерилізували за допомогою мембранного фільтру (Millipore Co., США) та вимірювали в них кількість білку за Вітакером [10]. Росту активність бактерій *Bradyrhizobium*