

УДК 581.557:577.175.1

ВМІСТ ФІТОГОРМОНІВ ГІБЕРЕЛІНОВОЇ ПРИРОДИ У КОРЕНЯХ І БУЛЬБОЧКАХ СОЇ НА РАННІХ ЕТАПАХ ФОРМУВАННЯ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНИХ ВЗАЄМОВІДНОСИН

© 2013 р. **О. О. Грищук, С. Я. Коць, П. М. Маменко**

Інститут фізіології рослин і генетики

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Досліджено вміст гіберелінів у коренях і бульбочках рослин сої *Glycine max* (L.) Merr., інокульованої штамми та Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* із різними симбіотичними характеристиками на початкових етапах формування й функціонування бобово-ризобіального симбіозу. Інокуляція штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* приводила до збільшення у коренях сої пулу фітогормонів гіберелінової природи. Залежності між вмістом гіберелінів у коренях і бульбочках та активністю штамів не виявлено. Відзначено існування тісного взаємозв'язку між пулом гіберелінів та індолілоцтової кислоти як у коренях, так і у бульбочках рослин при інокуляції штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* різної ефективності.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутанти, гібереліни

Одним із основним шляхів підвищення продуктивності бобових культур є застосування екологічно безпечних та економічно виправданих агротехнічних заходів, зокрема передпосівної інокуляції насіння бобових рослин бульбочковими бактеріями (Коць та ін., 2010б; Грищук та ін., 2011).

Відомо, що позитивний вплив бактеризації на рослину є комплексним. Окрім забезпечення молекулярним азотом атмосфери, складовими, що впливають на ріст та розвиток рослини-хазяїна, є здатність бактерій продукувати речовини фітогормональної природи (ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота тощо) (Волкогон та ін., 2005; Цавкелова и др., 2006; Коць и др., 2010а).

Гормональна регуляція процесів росту і розвитку рослин є визначальною складовою фізіолого-біохімічних процесів рослинного організму. Особливого значення фітогормони набувають у взаємовідносинах вищих рослин і мік-

роорганізмів, зокрема, становленні та функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу (Atzon et al., 1988; Hirsch et al., 1997; Цавкелова и др., 2006; Ryu et al., 2012).

Серед відомих класів гормонів рослин важливе місце у встановленні симбіотичних взаємозв'язків посідають гормони гіберелінової природи, хоча їхній вплив на формування симбіотичного апарату ще недостатньо вивчений (Ferguson, Mathesius, 2003; Oldroyd, Downie, 2008; Ferguson et al., 2011).

У мутантах *Pisum sativum*, дефіцитних за даним гормоном, спостерігається переривання утворення кореневих бульбочок, а застосування екзогенних гіберелінів відновлює даний процес (Ferguson et al., 2005). Показано, що мутації у гені, який відповідає за біосинтез гіберелінів (ГК) ГК₁, призводять до значного зменшення утворення бульбочок у *P. Sativum* (Ferguson et al., 2011). Сформовані кореневі бульбочки були морфологічно аберантними, дрібними, білого кольору та функціонально неактивними. Кількість та зовнішній вигляд бульбочок відновлювалися за типом вихідних рослин після застосування ГК₃.

Адреса для кореспонденції: Грищук Олена Олександрівна, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна; e-mail: shuminka@rambler.ru

Показано, що застосування ГК₃ і ГК₄ індукувало утворення псевдобульбочкових структур на коренях *Lotus japonicus* (Kawaguchi et al., 1996), що свідчить про необхідність гіберелінів в органогенезі бульбочок.

Використання сучасних методів генетичної інженерії, зокрема транспозонового мутагенезу, дозволило отримати ряд мутантів бульбочкових бактерій, різних за своєю біологічною ефективністю (Маліченко та ін., 2007, Tsugumaru et al., 2008), що відкрило нові шляхи у дослідженні особливостей бобово-ризобіального симбіозу, зокрема, його фітогормональної активності (Волкогон та ін., 2009; Грищук та ін., 2012).

Метою наших досліджень було вивчення вмісту гіберелінів у коренях та бульбочках рослин сої за інокуляції насіння штамми і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності на ранніх етапах формування й функціонування симбіотичних взаємовідносин та встановлення можливого зв'язку між вмістом гіберелінів у коренях і бульбочках й симбіотичними характеристиками штамів.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили з рослинами сої (*Glycine max* L. (Merr.)) сорту Мар'яна, інокульованими різними за ефективністю штамми *B. japonicum*: 646 (вихідний штам, високоактивний), 604к (неактивний), T66 (високоактивний), а також Tn5-мутантами штаму 646: 9-1 (високоактивний), T21-2 (високоактивний) і 113 (малоактивний) із музейної колекції азотфіксуючих мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України (Маліченко та ін., 2007).

Рослини сої вирощували в умовах вегетаційного дослідження в посудинах Вагнера на промитому річковому піску за 60 % ПВ і природного освітлення, по шість рослин у кожній. Джерело мінерального живлення – поживна суміш Гельрігеля, збагачена мікроелементами молібденом, бором, марганцем і міддю та збіднена на азот – 0,25 норми (1 норма азоту відповідає 708 мг Ca(NO₃)₂ • 4H₂O на 1 кг субстрату).

Перед посівом насіння, простерилізоване 70 %-м етанолом і промите проточною водою протягом 1 год, інокульовали суспензіями бульбочкових бактерій, концентрація бактерій становила 10⁷ клітин у 1 мл. Відбори зразків рослин для аналізу проводили на 13, 20 й 28-у добу після появи сходів.

Аналіз рослин на вміст гіберелінів у коренях та бульбочках сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* із різними симбіотичними характеристиками, проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) (Kelen et al., 2004). Для цього фітогормони з рослинної наважки екстрагували 96 %-м етиловим спиртом; етанольний екстракт випарювали на ротаційному випарювачі (HEIDOLPH Laboport 4000 efficient, Німеччина) і повторно розчиняли в 2 мл етанолу.

Хроматографічний аналіз проводили на рідинному хроматографі "Agilent 1260 Infinity 3D LC System" (США). Для елюції екстрактів використовували зворотnofазну колонку Zorbax SB-C18 (4,6 • 150 мм, 5 мкм) (Agilent Technologies (США)) при 25°C. Рухома фаза складалася з розчинників ацетонітрил – вода (26:74; 30:70 %; v/v) з ізократичною елюцією при швидкості потоку 0,8 мл/хв. Зразок об'ємом 5 мкл вводився в інжектор за допомогою спеціального шприца. Детекцію зразків проводили в діапазоні хвиль 205–220 нм. Кількість окремо взятих фітогормонів визначали за площею піку.

Всі дослідження проводили в 5-разовому біологічному повторенні. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали з використанням ПЕОМ та із залученням пакетів спеціальних програм Microsoft Excel'10.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення впливу фітогормонів гіберелінової природи на формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу є надзвичайно актуальним, проте, як було сказано вище, мало дослідженим. Безпосередня роль гіберелінів у процесі нодуляції була продемонстрована на рослині *Sesbania rostrata*. (Lievens et al., 2005) Виявлено, що гормони даного класу залучаються при утворенні інфекційної нитки – структури, необхідної для колонізації рослини ризобіями. Також встановлено, що гібереліни беруть участь в індукції поділу кортикальних клітин і примордіїв бульбочок у *Sesbania rostrata* (Lievens et al., 2005). Більш того, процес нодуляції у *Sesbania rostrata* може бути зупинений після застосування інгібіторів біосинтезу гіберелінів.

У наших дослідженнях аналіз накопичення гіберелінів у рослинах сої показав, що на початкових етапах формування бобово-ризобіального симбіозу рівень даного гормону в коренях зростає в усіх інокульованих рослинах

ВМІСТ ФІТОГОРМОНІВ ГІБЕРЕЛІНОВОЇ ПРИРОДИ

Таблиця 1. Вміст гіберелінів (мкг/г сирової речовини) у коренях рослин сої при інокуляції різними за ефективністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*

Варіант	Доба після появи сходів		
	13-а	20-а	28-а
Контроль (без інокуляції)	1,50 ± 0,10	2,21 ± 0,19	3,33 ± 0,25
Штам <i>B. japonicum</i> 646	2,15 ± 0,22	3,52 ± 0,29	3,67 ± 0,33
Штам <i>B. japonicum</i> 604к	1,71 ± 0,15	3,4 ± 0,25	4,64 ± 0,39
Штам <i>B. japonicum</i> T66	2,10 ± 0,19	3,95 ± 0,33	4,55 ± 0,41
Tn5-мутант 9-1	2,26 ± 0,20	3,47 ± 0,28	4,39 ± 0,35
Tn5-мутант T21-2	1,98 ± 0,16	3,10 ± 0,25	4,99 ± 0,40
Tn5-мутант 113	2,15 ± 0,18	3,52 ± 0,30	3,67 ± 0,35

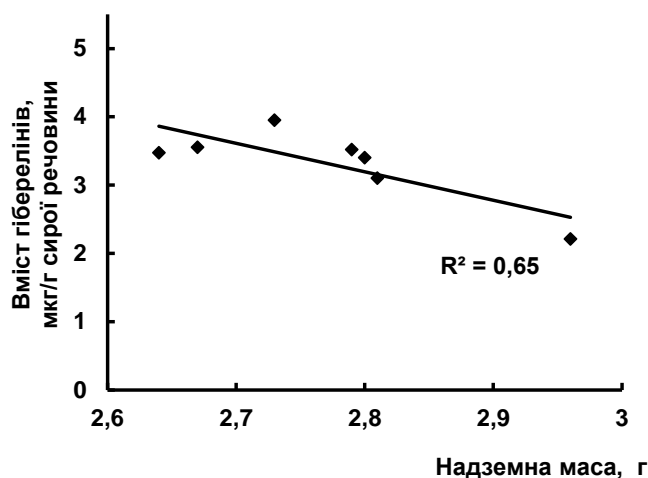


Рис. 1. Залежність між надземною масою і вмістом гіберелінів у коренях рослин сої, інокульованої різними за ефективністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum* (20-та доба після появи сходів).

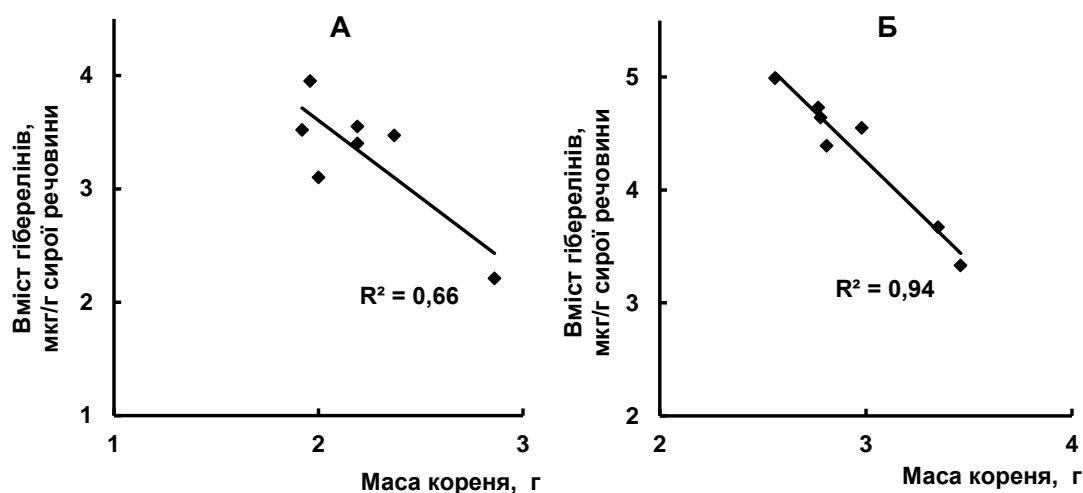


Рис. 2. Залежність між масою кореня і вмістом гіберелінів у коренях сої, інокульованої різними за ефективністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*.

А – 20-та доба після появи сходів, Б – 28-ма доба після появи сходів.

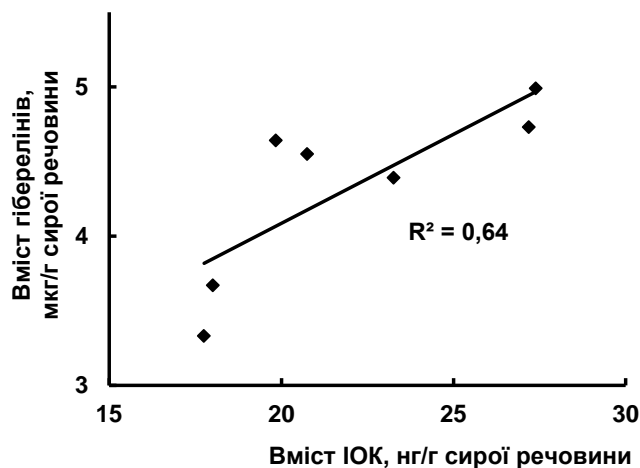


Рис. 3. Залежність між вмістом ІОК та гіберелінів у корнях рослин, інокульованих різними за ефективністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum* (28-ма доба після появи сходів).

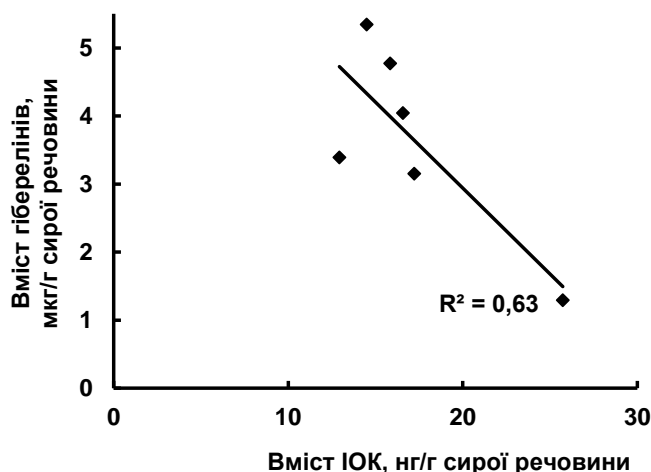


Рис. 4. Залежність між вмістом ІОК та гіберелінів у корневих бульбочках сої, інокульованої різними за ефективністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum* (20-та доба після появи сходів).

Таблиця 2. Вміст гіберелінів (мкг/г сирі речовини) у бульбочках рослин сої при інокуляції різними за ефективністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*

Варіант	Доба після появи сходів	
	20-а	28-а
Штам <i>B. japonicum</i> 646	5,34 ± 0,56	2,81 ± 0,20
Штам <i>B. japonicum</i> 604к	1,29 ± 0,10	3,13 ± 0,29
Штам <i>B. japonicum</i> T66	4,04 ± 0,33	2,85 ± 0,25
Tn5-мутант 9-1	3,15 ± 0,35	3,00 ± 0,33
Tn5-мутант T21-2	4,77 ± 0,41	2,55 ± 0,25
Tn5-мутант 113	3,39 ± 0,37	3,28 ± 0,34

(табл. 1), що може свідчити про вагомий внесок бактеріальних клітин у біосинтез гіберелінів або про певну відповідь рослин на бактерізацію. Надалі у процесі онтогенезу відзначали

постійне збільшення пулу гіберелінів у корнях дослідних варіантів. Залежності між вмістом гіберелінів у корнях та активністю штамів не спостерігалось.

ВМІСТ ФІТОГОРМОНІВ ГІБЕРЕЛІНОВОЇ ПРИРОДИ

Встановлено залежність між вмістом гіберелінів у коренях та надземною масою і масою коренів сої на прикінцевих етапах формування та на початкових етапах функціонування симбіотичних систем (рис. 1, 2). Як видно з рис. 1 і 2, починаючи з 20-ї доби після появи сходів, при збільшенні маси рослин спостерігалось зниження пулу гіберелінів в їх коренях. У попередніх дослідженнях нами було виявлено активний біосинтез індолілоцтової кислоти (ІОК) у рослин сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами різної ефективності у цей же період розвитку симбіотичного апарату (Гришук та ін., 2012). Вивчення взаємодії даних гормонів показало наявність тісного кореляційного зв'язку між вмістом гіберелінів та ІОК у коренях досліджуваних рослин (рис. 3) на 28-му добу після появи сходів, що підтверджує комплексність гормональних зв'язків у рослинному організмі та вказує на важливу їх роль у регуляції бобово-ризобіального симбіозу.

Визначення вмісту гіберелінів у кореневих бульбочках сої, інокульованої різними за ефективністю штамми та Tn5-мутантами *V. japonicum*, показало зменшення інтенсивності синтезу цих фітогормонів (на відміну від синтезу гіберелінів у коренях) в усіх досліджуваних варіантах у ході формування симбіотичних систем сої, причому, вищий вміст гіберелінів був виявлений на 20-ту добу після появи сходів у варіантах із застосуванням штаму *V. japonicum* 646 та його Tn5-мутанту *V. japonicum* T21-2 (табл. 2). На 28-у добу після появи сходів високий вміст фітогормонів гіберелінової природи виявлено у малоактивного Tn5-мутанту 113. Також було встановлено обернену залежність між вмістом ІОК (Гришук та ін., 2012) та гіберелінів у бульбочках інфікованих рослин (20-та доба після появи сходів) (рис. 4). Це можна пояснити участю гіберелінів у стимуляції біосинтезу ІОК з його попередника – триптофану, а також у підвищенні активності гідролаз у рослинних тканинах, що сприяє вивільненню ІОК зі зв'язаних форм (Волкогон та ін., 2005; 2010).

Таким чином, нами було встановлено, що інокуляція насіння сої азотфіксувальними бактеріями *V. japonicum* приводить до збільшення пулу фітогормонів гіберелінової природи у коренях на початкових етапах формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу. Залежності між вмістом гіберелінів у коренях і бульбочках та активністю штамів не виявлено. Показано існування тісного взаємозв'язку між вмістом гіберелінів та індолілоцтової ки-

слоти як у коренях, так і у бульбочках рослин, інфікованих різними за активністю штамми та Tn5-мутантами *V. japonicum*, що підтверджує комплексність гормональних зв'язків у рослинному організмі та їх важливу роль у регуляції симбіотичних взаємовідносин.

ЛІТЕРАТУРА

- Волкогон В.В., Волкогон М.В., Дімова С.Б. Рістстимульовальні мікроорганізми // Експериментальна ґрунтова мікробіологія / За ред. В.В. Волкогона – К.: Аграрна наука, 2010. – С. 383-416.
- Волкогон В.В., Сальник В.П. Значення регуляторів росту рослин у формуванні активних азотфіксувальних симбіозів та асоціацій // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, № 3 – С. 187-197.
- Волкогон М.В., Мащенко П.М., Коць С.Я. Баланс ІОК та зеатину в рослинах сої за інокуляції насіння різними штамми й мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 5. – С. 408-416.
- Гришук О.О., Волкогон М.В., Коць С.Я. Динаміка вмісту індоліл-3-оцтової та абсцизової кислот у коренях та бульбочках сої на ранніх етапах формування бобово-ризобіального симбіозу // Физиология и биохимия культ. растений. – 2012. – Т. 44, № 5. – С. 408-416.
- Гришук О.О., Волкогон М.В., Коць С.Я. Здатність штамів та Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності до синтезу фітогормонів в умовах *in vitro* // Сільськогосподарська мікробіологія: здобутки та перспективи. – Чернігів: Вид-во Чернігів. ЦНТІ. – 2011. – С. 168-173.
- Коць С.Я., Волкогон М.В., Гришук О.О. Спосібність штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* к синтезу ІУК и АБК *in vitro* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010а. – Т. 42, № 6. – С. 491-496.
- Коць С.Я., Моргун В.В., Патица В.Ф., Даценко В.К., Кругова Е.Д., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н., Михалкив Л.М. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобияльный симбиоз. Т. 1. – Киев: Логос, 2010б. – 508 с.
- Маліченко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М., Коць С.Я. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 5. – С. 409-418.
- Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Непрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое

- применение // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133-143.
- Atzon R., Crozier A., Wheeler C.T., Sandberg G. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots // *Planta*. – 1988. – V. 175. – P. 532-538.
- Ferguson B.J., Mathesius U. Signaling interactions during nodule development // *J. Plant Growth Reg.* – 2003. – V. 22. – P. 47-72.
- Ferguson B.J., Foo E., Ross J.J., Reid J.B. Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in *Pisum sativum* // *New Phytol.* – 2011. – V. 189. – P. 829-842.
- Ferguson B.J., Ross J.J., Reid J.B. Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of *Pisum sativum* // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 138. – P. 2396-2405.
- Hirsch A.M., Fang Y., Asad S., Kapulnik Y. The role of phytohormones in plant-microbe symbioses // *Plant and Soil*. – 1997. – V. 194. – P. 171-184.
- Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Fukai S., Syono K. Unusual branching in the seedlings of *Lotus japonicus*–Gibberellins reveal the nitrogen-sensitive cell divisions within the pericycle on roots // *Plant Cell Physiol.* – 1996. – V. 37. – P. 461-470.
- Kelen M., Demiralay E.C., Sen S., Ozkan G. Separation of abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid in 99 R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and rose oil (*Rosa damascena* Mill.) by reversed phase liquid chromatography // *Turk. J. Chem.* – 2004. – V. 28. – P. 603-610.
- Lievens S., Goormachtig S., Herder J.D., Capoen W., Mathis R., Hedden P., Holsters M. Gibberellins are involved in nodulation of *Sesbania rostrata* // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 139. – P. 1366-1379.
- Oldroyd G.E.D., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – V. 59. – P. 519-546.
- Ryu H., Cho H., Choi D., Hwang I. Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis // *Mol. Cells*. – 2012. – V. 34. – P. 117-126.
- Tsurumaru H., Yamakawa T., Tanaka M., Sakai M. Tn5 mutants of *Bradyrhizobium japonicum* Is-1 with altered compatibility with Rj2-soybean cultivars // *Soil Sci. and Plant Nutr.* – 2008. – V. 54. – P. 197-203.

Надійшла до редакції
14.01.2013 р.

GIBBERELLINS CONTENT IN ROOTS AND NODULES OF SOYBEAN ON THE EARLY STAGES OF FORMATION AND FUNCTIONING OF SYMBIOTIC SYSTEMS

O. O. Gryshchuk, S. Ya. Kots, P. M. Mamenko

*Institute of Plant Physiology and Genetics
National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The content of gibberellins in roots and nodules of soybean plants *Glycine max* (L.) Merr., inoculated with strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with various symbiotic characteristics was studied on the early stages of formation and functioning of legume-rhizobial symbiotic systems. Inoculation with strains and Tn5-mutants of *B. japonicum* leads to the increased pool of gibberellins in roots. No relation between gibberellins content in roots and nodules and the activity of strains was detected. The close relationship between the content of gibberellins and indolil acetic acid in roots and nodules of soybean plants, inoculated with strains and Tn5-mutants of *B. japonicum* varied in their efficiency was observed.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5- mutants, gibberellins

**СОДЕРЖАНИЕ ФИТОГОРМОНОВ ГИББЕРЕЛЛИНОВОЙ ПРИРОДЫ
В КОРНЯХ И КЛУБЕНЬКАХ СОИ НА РАННИХ ЭТАПАХ ФОРМИРОВАНИЯ
И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ**

Е. А. Грищук, С. Я. Коць, П. Н. Маменко

*Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Исследовано содержание гиббереллинов в корнях и клубеньках растений сои *Glycine max* (L.) Merr., инокулированной штаммами и Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* с различными симбиотическими характеристиками на начальных этапах формирования и функционирования бобово-ризобияльного симбиоза. Инокуляция штаммами и Tn5-мутантами *B. japonicum* приводит к увеличению в корнях сои пула фитогормонов гиббереллиновой природы. Зависимости между содержанием гиббереллинов в корнях и клубеньках и активностью штаммов не выявлено. Отмечено существование тесной взаимосвязи между пулом гиббереллинов и индолуксусной кислоты как в корнях, так и в клубеньках растений при инокуляции штаммами и Tn5-мутантами *B. japonicum* различной эффективности.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутанты, гиббереллины