

УДК 579.841.3:579.222.3:577.175.1

ЗДАТНІСТЬ ШТАМІВ І Tn5-МУТАНТІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ДО СИНТЕЗУ ЗЕАТИНУ Й ГІБЕРЕЛІНІВ IN VITRO

О.О. ГРИЩУК, С.Я. КОЦЬ

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Досліджено здатність штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* з різними симбіотичними характеристиками до синтезу зеатину й гіберелінів у чистій культурі. Показано, що активні штами і Tn5-мутанти *B. japonicum* мають підвищену здатність до синтезу зеатину в умовах in vitro, а біосинтез гіберелінів не залежить від ефективності мікроорганізмів.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутанти, зеатин, гібереліни.

Одним із засобів підвищення продуктивності бобових культур є вжиття екологічно безпечних та економічно виправданих агротехнічних заходів, зокрема передпосівної інокуляції насіння бобових рослин бульбочковими бактеріями. Тому на сьогодні поряд із селекцією сортів сільськогосподарських культур актуальним залишається пошук нових штамів азотфіксувальних мікроорганізмів і створення на їх основі ефективних біодобрив для підвищення врожайності [7, 18].

Одним із найефективніших сучасних методів отримання нових штамів бульбочкових бактерій є транспозоновий мутагенез [4, 5, 16], який дає змогу створювати нові штами мікроорганізмів, що сприяють вирішенню низки фундаментальних наукових питань, пов'язаних із вивченням процесів встановлення та функціонування симбіотичних взаємовідносин бобових рослин і бульбочкових бактерій [1, 5, 19].

Відомо, що позитивний вплив бактеризації на рослину є комплексним. Окрім фіксації молекулярного азоту атмосфери бактерії продукують речовини фітогормональної природи (ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизову кислоту тощо). Фітогормони є посередниками у комунікації між рослиною-хазяїном та її мікрофлорою [9]. Утворення фітогормональних сполук — одна з основних властивостей ризосферних, епіфітних і симбіотичних бактерій [2, 3, 10].

Мета нашої роботи — оцінити активність біосинтезу зеатину й гіберелінів штамми і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності в умовах in vitro, встановити зв'язки між здатністю ризобій синтезувати фітогормони та їх симбіотичними характеристиками.

Методика

У досліді використано штами і Tn5-мутанти *B. japonicum* різної ефективності з музейної колекції відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України: вихідний штам 646 (високо-

активний), виробничий штам 6346 (високоактивний), штам 604 к (неактивний), штам Т66 (високоактивний, отриманий методом транспозонового мутагенезу), 9-1 (високоактивний, Tn5-мутант), Т21-2 (високоактивний, Tn5-мутант), 107 (малоактивний, Tn5-мутант), 113 (малоактивний, Tn5-мутант) [5].

Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на манітно-дріжджовому агарі [13] упродовж 7—8 діб за температури 26—28 °С. Змив зі скошеного агару (титр 10^7 клітин/мл) переносили в рідке манітно-дріжджове середовище, де ризобії вирощували протягом 8 діб за температури 26—28 °С.

Приріст маси мікроорганізмів контролювали за оптичною густиною, вимірюваною BIORAD SmartSpecPlus (США) при довжині хвилі 600 нм.

У подальших дослідженнях використовували надосадову рідину, яку отримували центрифугуванням суспензії мікроорганізмів протягом 20 хв на центрифугі К-24 при 8000 об/хв для осадження бактеріальних клітин.

Вміст білків визначали за методикою Вітакера [20]. Поглинання зразками світла з довжиною хвилі 235 і 280 нм вимірювали спектрофотометром BIORAD SmartSpecPlus (США). Розрахунок проводили за формулою

$$C = (D_{235} - D_{280})/2,51,$$

де C — концентрація білка, мг/мл; D_{235} , D_{280} — оптичні густини розчину при пропусканні світла з довжиною хвилі відповідно 235 і 280 нм.

Вміст зеатину визначали методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [8]. Із культуральної рідини ризобій його екстрагували тричі у ділільних лійках у двох незмішуваних фазах розчинників. Зеатин екстрагували *n*-бутанолом у співвідношенні 1 : 1. Потім бутанольну фракцію випарювали на ротаційному випарнику (HEIDORPH Laborota 4000 Efficient, Німеччина) за температури 41—43 °С, сухий залишок перерозчиняли в 2 мл 96 %-го етанолу. Отримані фітогормональні екстракти очищували способом препаративної хроматографії на пластинках із силікагелем (Merck 1.05554.0001, F_{254} , Німеччина) у різних системах розчинників. Після очищення екстрактів проводили рехроматографію елюатів цитокінінів на пластинках з оксидом алюмінію (Merck 1.05550.0001, F_{254} , Німеччина) в системі розчинників хлороформ : оцтова кислота (19 : 1). Кількісний вміст зеатину визначали на сканувальному спектроденситометрі «Camag TLC Scanner» (Швейцарія), кількісний вміст гіберелінів у пробі — спектрофотометричним методом (спектрофотометр BIORAD SmartSpecPlus (США), довжина хвилі 730 нм). Для визначення вмісту гіберелінів екстракти попередньо очищали за методикою Муромцева та співавт. [6].

Експериментальні дані оброблено статистично з використанням пакета спеціальних програм Microsoft Excel'10.

Результати та обговорення

У дослідях застосовано культуру мікроорганізмів, що знаходилась у стаціонарній фазі росту (рис. 1).

Визначення кількості клітин у культуральних суспензіях досліджуваних мікроорганізмів показало, що штам *B. japonicum* Т66 вирізнявся інтенсивнішим наростанням культури в перші дні культивування.

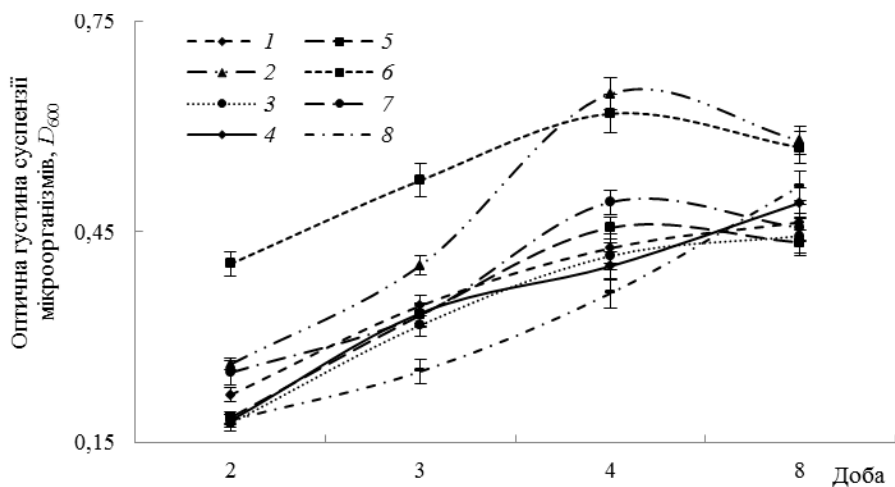


Рис. 1. Роста активність штамів і Tn5-мутантів *B. japonicum* різної ефективності. Тут і на рис. 2:

1 — *B. japonicum* 646; 2 — *B. japonicum* 604к; 3 — Tn5-мутант 9-1; 4 — Tn5-мутант 107; 5 — *B. japonicum* 6346; 6 — *B. japonicum* T66; 7 — Tn5-мутант T21-2; 8 — Tn5-мутант 113

Стрімкими темпами росту характеризувався також неактивний, але високовірулентний штам *B. japonicum* 604к. Усі інші штами й Tn5-мутанти практично не відрізнялись між собою за приростом біомаси. На восьму добу культивування всі досліджувані мікроорганізми знаходились у стаціонарній фазі росту (див. рис. 1).

Динаміку накопичення білка у культуральній рідині штамів і Tn5-мутантів *B. japonicum* ілюструє рис. 2. Спостерігалась загальна тенденція до збільшення кількості білка з наростанням маси мікроорганізмів. Підкреслимо, що біосинтез протеїнів у культурах малоактивних Tn5-мутантів *B. japonicum* 107 і 113 у стаціонарну фазу росту мікроорганізмів посилювався.

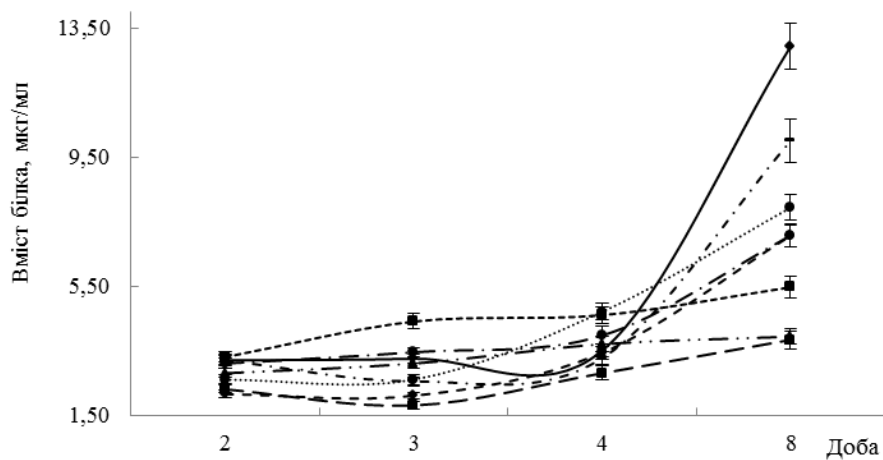


Рис. 2. Динаміка накопичення білка в культуральних рідинах штамів і Tn5-мутантів *B. japonicum* різної ефективності (10-разове розбавлення)

Відомо, що бактерії родини Rhizobiaceae здатні до синтезу регуляторів росту рослин [9]. Ми встановили, що представники роду *Bradyrhizobium* активно продукують сполуки фітогормональної природи [2, 3]. Здатність штамів і Tn5-мутантів *B. japonicum* різної ефективності синтезувати цитокініни підтверджена у досліді із вивчення вмісту зеатинрибозиду в культуральних рідинах досліджуваних мікроорганізмів [2].

Під час визначення вмісту зеатину в культуральній рідині виявлено, що найбільшою здатністю до його синтезу характеризувався неактивний, проте високовірулентний штам *B. japonicum* 604к — 0,141 мкг/мл (рис. 3, а). Найменший вміст цього гормону був у культуральних рідинах малоактивних Tn5-мутантів *B. japonicum* 107, 113 (відповідно 0,065 і

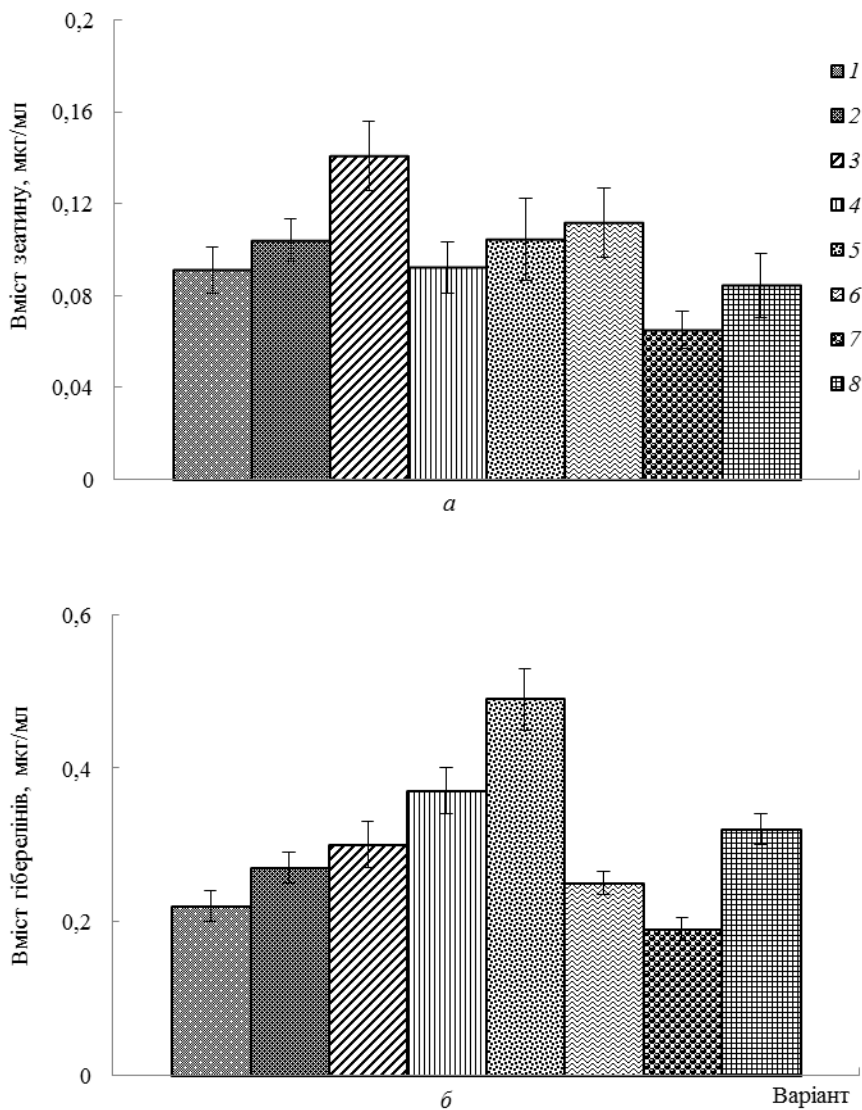


Рис. 3. Вміст зеатину (а) і гіберелінів (б) у культуральних рідинах штамів і Tn5-мутантів *B. japonicum* різної ефективності на 8-му добу культивування:

1 — *B. japonicum* 646; 2 — *B. japonicum* 6346; 3 — *B. japonicum* 604к; 4 — *B. japonicum* T66; 5 — Tn5-мутант 9-1; 6 — Tn5-мутант T21-2; 7 — Tn5-мутант 107; 8 — Tn5-мутант 113

0,084 мкг/мл). Високоактивні вихідний штам *B. japonicum* 646, штам-стандарт *B. japonicum* 6346, штам *B. japonicum* Т66, як і Тп5-мутанти 9-1 і Т21-2, продукували зеатин у межах 0,091—0,112 мкг/мл, що може вказувати на пряму залежність між активністю штаму та його здатністю продукувати цитокініни.

Із літератури відомо, що крім бактерій роду *Bradyrhizobium* зв'язком між активністю мікроорганізмів та їх здатністю до синтезу цитокінінів характеризуються також бактерії родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* [2, 9]. Це свідчить про важливу роль цитокінінів у формуванні симбіотичних та асоціативних систем. Доведено, що основний вплив фітогормонів цитокінінової природи виявляється в регуляції поділу й диференціації клітин [14]. Вважають, що цитокініни беруть участь у процесах утворення та росту корневих бульбочок унаслідок активації клітинного циклу і генів, асоційованих із ним, а також низки генів ранньої нодуляції, зокрема ENOD2, ENOD12A, ENOD40 [11, 14].

Крім вмісту зеатину в культуральних рідинах ми також дослідили пул гіберелінів *in vitro*. Згідно з отриманими результатами, залежності між їх рівнем у культуральних рідинах та ефективністю штамів і Тп5-мутантів *B. japonicum* не виявлено (див. рис. 3, б). Високий вміст гіберелінів у культуральній рідині мали високоактивний штам Т66, Тп5-мутант 9-1, а також малоактивний Тп5-мутант 113, що становив відповідно 0,37; 0,49 і 0,32 мкг/мл.

Здатність до біосинтезу гіберелінів притаманна епіфітним і ризосферним бактеріям — представникам родів *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium* тощо [9, 12]. Гібереліни є вкрай важливими регуляторами росту та розвитку рослин [15]. Крім того, показано, що екзогенні гібереліни можуть стимулювати ріст і розвиток власне бактерій [9]. Речовини гіберелінової природи пришвидшують ріст, сприяють азотфіксації, утворенню протеолітичних ферментів деякими бактеріями [9, 17]. Не виключено, що активний синтез гіберелінів ризобіями сприяє ефективнішому процесу становлення і функціонування бобово-ризобіального симбіозу.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що синтезувати гібереліни і зеатин здатні не лише штамми *B. japonicum*, а й їх Тп5-мутанти. При цьому, якщо між біосинтезом зеатину й активністю ризобій простежується пряма залежність, то для гіберелінів такої залежності не виявлено. Цей факт, можливо, пояснюється більшим внеском цитокінінів у встановлення мікробно-рослинних взаємовідносин. Разом з тим роль гіберелінів у регуляції бобово-ризобіального симбіозу вивчена ще недостатньо.

1. Грищук 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. — 44, № 5. — С. 408—416.
2. Грищук О.О., Волкогон М.В., Коць С.Я. Здатність штамів та Тп5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності до синтезу фітогормонів в умовах *in vitro* // С.-г. мікробіологія: здобутки та перспективи. Зб. наук. праць, Чернігів: Вид-во Чернігів. ЦНТІ. — 2011. — С. 168—173.
3. Коць С.Я., Волкогон М.В., Грищук О.О. Спосібність штаммов і Тп5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* к синтезу ИУК и АБК *in vitro* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — 42, № 6. — С. 491—496.

4. Коць С.Я., Мельник В.М., Даценко В.К. Транспозоновий мутагенез як ефективний метод отримання нових штамів бульбочкових бактерій // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2009. — Вип. 1 (16). — С. 6—18.
5. Маліченко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М., Коць С.Я. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — 39, № 5. — С. 409—418.
6. Муромцев Г.С. Гиббереллины. — М.: Наука, 1984. — 208 с.
7. Онищук О.П., Воробьев Н.И., Проворов Н.А., Симаров Б.В. Симбиотическая активность ризобий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) с генетическими модификациями системы транспорта дикарбоновых кислот // Экологическая генетика. — 2009. — 7, № 2. — С. 3—10.
8. Савинский С.В., Драгозов И.В., Педченко В.К. Определение зеатина, индоллил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений. — 1991. — 23, № 6. — С. 611—619.
9. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы-продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохимия и микробиология. — 2006. — 42, № 2. — С. 133—143.
10. Bashan Y., Holduin G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB // Soil Biol. Biochem. — 1998. — 30, N 8/9. — P. 1225—1228.
11. Bauer P., Ratet P., Crespi M.D. et al. Nod-factors and cytokinins induce similar cortical cell divisions, amyloplast deposition and MsENOD12A expression patterns in alfalfa roots // Plant J. — 1996. — 10. — P. 91—105.
12. Bottini R., Cassan F., Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — 65, N 5. — P. 497—503.
13. Child J.J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. association with nonleguminous plant cell cultures // Nature. — 1975. — 253. — P. 350—351.
14. Ferguson B.J., Mathesius U. Signaling interactions during nodule development // J. Plant Growth Reg. — 2003. — 22, N 1. — P. 47—72.
15. Fleet C.M., Sun T.P. A DELLAcate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis // Curr. Opin. Plant Biol. — 2005. — 8. — P. 77—85.
16. Green B., Bouchier C., Fairhead C. et al. Insertion site preference of Mu, Tn5, and Tn7 transposons // Mob. DNA. — 2012. — 3, N 1. — P. 1—3.
17. Kapoor K., Sharma V.K. Effect of growth-promoting chemicals on growth, nitrogen fixation and heterocyst frequency of a blue-green alga // Z. Allg. Mikrobiol. — 1981. — 21, N 4. — P. 305—311.
18. Rengel Z. Breeding for better symbiosis // Plant Soil. — 2002. — 245. — P. 147—162.
19. Tsurumaru H., Yamakawa T., Tanaka M., Sakai M. Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* Is-1 with altered compatibility with Rj2-soybean cultivars // Soil Sci. Plant Nutr. — 2008. — 54. — P. 197—203.
20. Whitaker J.R., Granum P.E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm // Anal. Biochem. — 1980. — 109, N 1. — P. 156—159.

Отримано 25.12.2012

СПОСОБНОСТЬ ШТАММОВ И Tn5-МУТАНТОВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* К СИНТЕЗУ ЗЕАТИНА И ГИББЕРЕЛЛИНОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Е.А. Грищук, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследована способность штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* с различными симбиотическими характеристиками к синтезу зеатина и гиббереллинов в чистой культуре. Показано, что активные штаммы и Tn5-мутанты *B. japonicum* обладают повышенной способностью к синтезу зеатина в условиях in vitro, а биосинтез гиббереллинов не зависит от эффективности микроорганизмов.

ABILITY OF STRAINS AND Tn5-MUTANTS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* TO ZEATIN AND GIBBERELLINS SYNTHESIS IN VITRO

O.O. Gryshchuk, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The ability of strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with modified symbiotic characteristics to synthesize zeatin and gibberellins in pure culture was studied. It was shown that active strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* possess increased capability to synthesize zeatin in vitro, while biosynthesis of gibberellins had no relation with microorganisms efficiency.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-mutants, zeatin, gibberellins.