

УДК 579.841.3:579.222.3:577.175.122

СПОСОБНОСТЬ ШТАММОВ И Tn5-МУТАНТОВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* К СИНТЕЗУ ИУК И АБК IN VITRO

С.Я. КОЦЬ, Н.В. ВОЛКОГОН, Е.А. ГРИЩУК

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17
e-mail: volkogon@ifrg.kiev.ua*

Рассмотрена способность штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* с измененными симбиотическими характеристиками к синтезу индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот in vitro. Установлено, что высокоактивные штаммы и Tn5-мутанты *Bradyrhizobium japonicum* обладают повышенной способностью к синтезу ИУК в чистой культуре, а биосинтез АБК не зависит от эффективности штаммов.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-мутанты, индолил-3-уксусная кислота, абсцизовая кислота.

Исследование физиологических процессов, связанных с функционированием симбиотических систем бобовых растений как важнейшей составляющей круговорота азота в природе, не теряет своей актуальности и в наши дни. Большое практическое значение процесса симбиотической азотфиксации, особенно в современных условиях развития аграрного сектора экономики, заключается в интенсификации и оптимизации производства сельскохозяйственной продукции за счет снижения энергетических и материальных затрат на изготовление минеральных азотных удобрений и уменьшения негативного влияния последних на экологическую ситуацию в агроценозах.

Известно, что уровень эффективности бобово-ризобияльного симбиоза определяется генотипами обоих партнеров — клубеньковых бактерий и растения-хозяина. В связи с этим параллельно с направленной селекцией сортов зернобобовых культур проводятся также поиск и отбор комплементарных им штаммов микроорганизмов, что ставит очередные задачи перед исследователями, требует разработки новых и усовершенствования существующих методологических подходов для их решения [9]. Среди современных методов получения штаммов клубеньковых бактерий одним из наиболее эффективных считают транспозоновый мутагенез [5, 17], дающий возможность изменять симбиотические характеристики микроорганизмов, что очень важно при изучении механизмов образования и функционирования бобово-ризобияльного симбиоза [1, 14, 22].

Рядом исследователей показано [6, 12], что предпосевная бактериализация семян оказывает комплексный положительный эффект на макросимбионт. Среди составляющих, которые влияют на рост и развитие растений, кроме активного связывания азота атмосферы выделяют способность бактерий к синтезу веществ гормональной природы [2, 11]. Био-

синтез фитогормонов считается одним из главных свойств ризосферных, эпифитных и симбиотических микроорганизмов [7, 11, 19]. Так, гиперсинтез фитогормонов патогенными бактериями приводит к разбалансировке гормональной системы растений и возникновению целого ряда заболеваний [16, 19, 24]. Непатогенные, ассоциированные с растениями бактерии, которые находятся в ризосфере, стимулируют рост растений за счет секреции в ризосферу веществ ауксиновой природы, в частности, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) [2, 19].

Участие эндогенных фитогормонов в процессах инфицирования бобовых растений клубеньковыми бактериями, формировании и функционировании симбиотических систем не вызывает сомнения. В то же время открытым остается вопрос селекции и отбора перспективных комплементарных штаммов бактерий с учетом способности микроорганизмов синтезировать вещества гормональной природы.

Целью нашей работы было изучение способности штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* различной эффективности к синтезу фитогормонов ИУК, абсцизовой кислоты (АБК) *in vitro*, возможности использования исследуемых характеристик штаммов для их отбора и дальнейшего применения в сельскохозяйственном производстве.

Методика

Для проведения запланированных исследований были отобраны штаммы и Tn5-мутанты *Bradyrhizobium japonicum* (табл. 1), эффективность и симбиотические характеристики которых предварительно оценены сотрудниками отдела симбиотической азотфиксации Института физиологии растений и генетики НАН Украины в лабораторных, вегетационных и полевых опытах [3, 4].

Культуру медленнорастущих клубеньковых бактерий выращивали на маннитно-дрожжевой среде в течение 7 сут при 26–28 °С. Культуральные среды были выровнены по оптической плотности, что соответствовало практически одинаковому количеству клеток в суспензии (10⁹ кл/мл). Содержание белка в культуральной среде микроорганизмов определяли по методике Витакера [23] измерением поглощения суспензии

ТАБЛИЦА 1. Симбиотические характеристики штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum*

Штамм, Tn5-мутант	Азотфиксирующая активность	Вирулентность
<i>B. japonicum</i> 6346	Высокая	Высокая
<i>B. japonicum</i> 646	Высокая	Высокая
<i>B. japonicum</i> 604к	Низкая	Высокая
<i>B. japonicum</i> T66	Высокая	Высокая
Tn5-мутанты штамма <i>B. japonicum</i> 646		
<i>B. japonicum</i> 9-1	Высокая	Средняя
<i>B. japonicum</i> 21-2	Высокая	Высокая
<i>B. japonicum</i> 107	Низкая	Высокая
<i>B. japonicum</i> 113	Низкая	Высокая

ями света с длиной волны 235 и 280 нм на спектрофотометре BIORAD SmartSpecPlus (США). Содержание белка рассчитывали по формуле

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

где C — концентрация белка, мг/мл; D_{235} , D_{280} — оптические плотности раствора при пропускании света с длиной волны соответственно 235 и 280 нм.

Для определения фитогормонов в культуральной жидкости бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость в дальнейшем использовали для определения содержания ИУК и АБК методом количественной спектроденситометрической тонкослойной хроматографии [8]. Экстракцию гормонов из культуральной жидкости бактерий проводили трижды в распределительных воронках этиловым эфиром уксусной кислоты (в соотношении 1 : 1 по объему). Перед экстракцией рН культуральной жидкости доводили с помощью 0,1 н HCl до 2,8 [21]. Этилацетатную фракцию упаривали на ротационном испарителе (HEIDOLPH Laborporta 4000 efficient, Германия) и перерастворяли в аликвоте 96 %-го этанола. В дальнейшем этанольный экстракт очищали последовательным хроматографированием на пластинках с оксидом кремния «Merck № 105554» (Германия) в разных системах растворителей: хлороформ ($R_f = 0$), аммиак 12,5 % ($R_f = 1$), этилацетат : уксусная кислота (19 : 1) ($R_f = 0,7...0,9$). После очистки зоны, совпадающие по R_f с нанесенными ранее стандартами ауксинов и АБК, снимали и элюировали в течение 24 ч этилацетатом. Элюат гормонов рехроматографировали на пластинках с оксидом кремния «Merck № 105554» (Германия) в системе растворителей хлороформ : этилацетат : уксусная кислота (100 : 100 : 1). Количественное определение фитогормонов осуществляли на сканирующем спектроденситометре «Camag TLC Scanner» (Швейцария).

Экспериментальные данные обработаны статистически методом дисперсионного анализа с использованием ПЭВМ и пакетов специальных программ Microsoft Excel'03, Statgraphics Plus 3.0.

Результаты и обсуждение

В опытах использовали культуру микроорганизмов, находящуюся на стационарной фазе роста, что подтверждено рядом тестов, в частности, по определению оптической плотности суспензий и содержания белка.

Как видно из данных табл. 2, на стационарной фазе роста микроорганизмов практически отсутствовали различия между вариантами. Следует отметить несколько повышенное содержание белка в культуральных жидкостях активных штаммов и Tn5-мутантов *B. japonicum* по сравнению с малоактивными Tn5-мутантами *B. japonicum* 107 и 113, а также неактивным штаммом *B. japonicum* 604к.

Определение содержания ИУК в культуральной жидкости штаммов и Tn5-мутантов *B. japonicum* различной эффективности выявило четкую зависимость между активностью штамма и его способностью к биосинтезу ИУК в чистой культуре (табл. 3).

Так, культуральные жидкости высокоактивных штаммов *B. japonicum* 646, T66, а также Tn5-мутанта *B. japonicum* 21-2 характеризовались наибольшим содержанием ИУК — соответственно 2,49; 2,29 и 2,99 мкг/мл, в то время как количество ИУК, синтезированной малоактивными Tn5-

ТАБЛИЦА 2. Показатели оптической плотности и содержания белка в культуральной среде штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* на стационарной фазе роста культуры

Вариант	Оптическая плотность D_{600}	Содержание белка, мг/мл
<i>B. japonicum</i> 6346	2,17 ± 0,16	3,130 ± 0,09
<i>B. japonicum</i> 646	2,21 ± 0,18	3,137 ± 0,11
<i>B. japonicum</i> 604к	1,98 ± 0,14	3,106 ± 0,13
<i>B. japonicum</i> T66	1,91 ± 0,09	3,152 ± 0,12
<i>B. japonicum</i> 9-1	1,99 ± 0,08	3,133 ± 0,09
<i>B. japonicum</i> 21-2	2,12 ± 0,13	3,138 ± 0,11
<i>B. japonicum</i> 107	1,92 ± 0,15	3,126 ± 0,08
<i>B. japonicum</i> 113	1,97 ± 0,19	3,132 ± 0,17
НСР _{0,05}	0,12	0,19

мутантами *B. japonicum* 107 и 113, неактивным штаммом *B. japonicum* 604к, было в 1,7–4,3 раза меньше (соответственно 1,45; 0,88 и 0,70 мкг/мл).

Как уже отмечалось, способность синтезировать ИУК свойственна большому количеству ризосферных бактерий, в том числе и бактериям рода *Bradyrhizobium* [13, 18], что подтверждает “ауксиновую” гипотезу инфицирования бактериями корней растений, базирующуюся на предположении, что клубеньковые бактерии проникают в ткани корней благодаря синтезу ИУК [11, 19]. По данным Спаепена и соавт. [20], существует шесть путей биосинтеза ИУК ризобиями, а отдельные роды микроорганизмов способны одновременно использовать два и больше путей биосинтеза. Уровень же образования ИУК зависит от задействованных путей биосинтеза данного фитогормона, экспрессии и расположения соответствующих генов, их регуляторных последовательностей, а также наличия ферментов, способных к трансформации свободных активных форм ИУК в неактивные запасные формы — конъюгаты [15, 20].

Полученные нами результаты относительно способности бактерий рода *Bradyrhizobium* к синтезу АБК не подтвердили зависимости между ее уровнем в культуральной среде и эффективностью штаммов и Tn5-мутантов *B. japonicum* (см. табл. 2). Известно, что АБК ингибирует образование клубеньков на корнях бобовых растений [10], хотя ее роль в

ТАБЛИЦА 3. Содержание ИУК и АБК в культуральной среде штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* различной эффективности на стационарной фазе роста культуры

Вариант	Содержание ИУК, мкг/мл	Содержание АБК, мкг/мл
<i>B. japonicum</i> 6346	1,12±0,07	0,008±0,001
<i>B. japonicum</i> 646	2,49±0,14	0,016±0,003
<i>B. japonicum</i> 604к	0,70±0,04	0,009±0,001
<i>B. japonicum</i> T66	2,29±0,11	Следы
<i>B. japonicum</i> 9-1	1,73±0,06	0,003±0,001
<i>B. japonicum</i> 21-2	2,99±0,17	Следы
<i>B. japonicum</i> 107	1,45±0,05	Следы
<i>B. japonicum</i> 113	0,88±0,04	0,006±0,001

процессах формирования и функционирования симбиотического аппарата окончательно не выяснена.

Таким образом, результаты наших исследований позволяют сделать вывод о прямой связи между активностью штаммов, Tn5-мутантов *B. japonicum* и их способностью синтезировать ИУК in vitro, а также о перспективности использования показателей биосинтеза фитогормонов, в частности ИУК, бактериями в чистой культуре в селекции эффективных штаммов ризобий и создания на их основе бактериальных препаратов комплексного действия.

1. Волкогон М.В., Маменко П.М., Коць С.Я. Баланс ИОК та зеатину в рослинах сої за інокуляції насіння різними штаммами й мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 5. — С. 408—416.
2. Волкогон В.В., Сальник В.П. Значення регуляторів росту рослин у формуванні активних азотфіксувальних симбіозів та асоціацій // Там само. — 2005. — 37, № 3. — С. 187—197.
3. Воробей Н.А., Коць С.Я., Маліченко С.М., Якимчук Р.А. Дослідження симбіотичних систем сої, утворених за участю транспозантів *Bradyrhizobium japonicum* // Там само. — 2006. — 38, № 5. — С. 1—9.
4. Даценко В.К., Мельник В.М., Коць С.Я., Омельчук С.В. Фізіологічна взаємодія сої з новими мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // С.-г. мікробіологія: Міжвідомчий тематичний наук. зб. — Чернігів: ЦНТЕІ, 2008. — С. 52—60.
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. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика: Моногр. / В.В. Волкогон, О.В. Надкернична, Т.М. Ковалевська та ін. — К.: Аграр. наука, 2006. — 312 с.
7. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростстимулюючі ризобактерії і їх практичне застосування // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 3. — С. 187—207.
8. Савинский С.В., Драгвозов И.В., Педченко В.К. Определение зеатина, индоллил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Там же. — 1991. — 23, № 6. — С. 606—614.
9. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. — СПб.: Наука, 1998. — 194 с.
10. Федорова Е.Э., Жизневская Г.Я., Альжаппарова Ж.К., Измайлов С.Ф. Фитогормоны в азотфиксирующих клубеньках бобовых растений // Физиология и биохимия культ. растений. — 1991. — 23, № 5. — С. 426—438.
11. 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.
12. Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture // Proc. of the 15th Int. Nitrogen Fixation Congr. and the 12th Int. Conf. of the African Association for Biological Nitrogen Fixation / Ed. by F.D. Dakora, S.B.M. Chimphango, A.J. Valentine et al. — New York; Heidelberg: Springer, 2008. — 353 p.
13. Boiero L., Perrig D., Masciarelli O. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — 74, N 4. — P. 874—880.
14. Camacho M., Burgos A., Chamber-Perez M.A. Nitrogen fixation in transposon mutants from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 impaired in nitrate reductase // J. Plant Physiol. — 2003. — 160 (4). — P. 377—386.
15. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria // Crit. Rev. Microbiol. — 1995. — 21, N 1. — P. 1—18.
16. Grant M.R., Jones J.D.G. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease // Science. — 2009. — 324. — P. 750—752.
17. Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics // Annu. Rev. Genet. — 2003. — 37. — P. 3—29.
18. Jensen J.B., Egsgaard H., Van Onckelen H., Jochimsen B.U. Catabolism of indole-3-acetic acid and 4- and 5-chloroindole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum* // J. Bacteriol. — 1995. — 177. — P. 5762—5766.

19. *Plant Hormones — Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* — Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ., 2004. — 750 p.
20. *Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R.* Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2007. — **31**. — P. 425–448.
21. *Tien T.M., Gaskins M.H., Hubbell D.H.* Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1979. — **37**, N 5. — P. 1016–1024.
22. *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. — **54**. — P. 197–203.
23. *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.
24. *Yamada T.* The role of auxin in plant-disease development // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1993. — **31**. — P. 253–273.

Получено 08.11.2009

ЗДАТНІСТЬ ШТАМІВ І Tn5-МУТАНТІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ДО СИНТЕЗУ ІОК І АБК IN VITRO

С.Я. Коць, М.В. Волкогон, О.О. Гришук

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Розглянуто здатність штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* зі зміненими симбіотичними характеристиками до синтезу індоліл-3-оцтової та абсцизової кислот in vitro. Встановлено, що високоактивні штами й Tn5-мутанти *Bradyrhizobium japonicum* мають підвищену здатність до синтезу ІОК у чистій культурі, а біосинтез АБК не залежить від ефективності штамів.

ABILITY OF STRAINS AND Tn5-MUTANTS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* TO SYNTHESIZE IAA AND ABA IN VITRO

S.Ya. Kots, N.V. Volkogon, E.A. Gryshuk

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

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

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-mutants, indolil-3-acetic acid, abscisic acid.