

УДК 631.461.5:633.31

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТОКИНИНОВ В КОРНЕВОЙ СИСТЕМЕ ИНОКУЛИРОВАННОЙ ЛЮЦЕРНЫ

МАМЕДОВ К. Ю., МАРЬЕНКО В. Г., ШИЛЬНИКОВА В. К.
(Кафедра микробиологии)

В корнях бобовых растений, особенно инокулированных клубеньковыми бактериями, содержание ауксиноподобных веществ повышено, что, по мнению ряда исследователей [8], имеет большое значение для симбиотической азотфиксации. Очевидно, высокий уровень ауксинов в зоне активного инфицирования (верхняя и средняя части корня в первые сроки инокуляции) определяет растяжение клеток растения-хозяина и способствует внедрению клеток ризобий в ткань корня. Вместе с тем известно, что и цитокинины, синтезируемые клубеньковыми бактериями, играют важную роль в пролиферации клубеньковой ткани [1, 6, 15], что растения рода *Ardisia*, самостоятельно не синтезирующие цитокинины [17], снабжаются ими в результате жизнедеятельности микросимбионта.

Однако, если ауксины способствуют внедрению ризобий в корень, то цитокинины свою основную роль, очевидно, выполняют уже в процессе формирования клубеньков.

В связи с этим представляло интерес в соответствии с установленными нами ранее [9, 11] закономерностями ярусного и зонального распределения клубеньков в процессе инфицирования определить уровень и распределение цитокининов в ткани корней небактеризованной и бактеризованной люцерны. Одновременно проводилась проверка опытных штаммов на вирулентность, ауксинную и цитокининную активность.

Объекты и методы исследований

Использованы 8 штаммов *Rhizobium meliloti*: две культуры (441 и 87) получены из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, 6 — выделены из клубеньков люцерны сорта АзНИХИ-262, выращенной в хлопково-люцерновом севообороте на светло-каштановой почве Азербайджана. Вновь выделенные штаммы клубеньковых бактерий люцерны идентифицированы по морфолого-культуральным и симбиотическим признакам. Проверку клубеньковых бактерий люцерны на вирулентность осуществляли в стерильных опытах на агаризованной среде С. А. Ковровцевой [2], а также в микровегетационных стерильных опытах, где растения выращивали на песке и инокулировали 3-суточной монокультурой клубеньковых бактерий. О вирулентности штаммов судили по сроку появления первых клубеньков. К вирулентным относили культуры, образующие визуально различимые клубеньки через 8—10 сут, к слабовирулентным — на 16—20-е сутки. Повторность опыта 3-кратная, в каждой повторности 10 растений.

Способность штаммов синтезировать соединения типа ауксинов устанавливали по методу Р. Х. Турецкой [7], в опыте использовали

3-суточные культуры клубеньковых бактерий, выращенные на бобовом агаре. Кининную активность определяли по методу О. Н. Кулаевой [3, 4]. В колбы объемом 250 мл, содержащие 50 мл бобового отвара, вносили 3-суточный инокулят, выращенный на бобовом агаре. Инкубацию проводили на качалке при 28° в течение 6 сут. Дальнейший ход работы описан нами ранее [5].

Опыт по определению кининной активности у культур клубеньковых бактерий проводился в следующих вариантах: диски, увлажненные водой (контроль); диски, увлажненные раствором активного кинетина (1 мкг на чашку); в остальных случаях — диски из листьев ячменя, увлажненные испытуемыми растворами. В качестве биотеста использовали ячмень сорта Московский. Повторность опыта 2-кратная. Визуальные различия в окраске дисков отмечали на 3-и сутки. Количественное определение концентрации хлорофилла в дисках проводили на 6-е сутки. Оптическую плотность полученных растворов устанавливали на спектрофотометре.

Для определения содержания цитокининов в различных зонах корня люцерны сорта АзНИХИ-262 выращивали в колбах емкостью 250 мл, содержащих 50 мл агаризованной среды С. А. Ковровцевой, из стерилизованных серной кислотой и пророщенных в стерильных чашках Петри семян. Анализировали верхнюю часть корней (приблизительно на 1 см выше конца корня и на несколько миллиметров ниже шейки корня), боковые корни и корневые кончики (на расстоянии примерно 1 см от конца корня) 7- и 15-суточных растений, небактеризованных и бактеризованных активным вирулентным 441 штаммом. Варианты и повторность опыта были такими же, как при изучении кининной активности. Количественное определение хлорофилла в дисках проводили на 6-е сутки. Оптическую плотность полученных растворов определяли на спектрофотометре. Концентрацию хлорофилла вычисляли по формуле Винтерманс и Де Монте [12].

Результаты и их обсуждение

Все исследованные культуры клубеньковых бактерий люцерны независимо от степени их вирулентности (вирулентные культуры Л3, Л4, Л6 образуют клубеньки на 8—10-е сутки, слабовирулентные Л1, Л2, Л5 — на 16—20-е сутки) обладали способностью продуцировать

Таблица 1

Влияние ауксиноподобных веществ, продуцируемых *Rhizobium meliloti*, на образование корешков у фасоли сорта Латвия 800

Вариант	Число корешков		Длина корешков	
	шт.	% к контролю	мм	% к контролю
Вода (контроль)	2,6	100	40,2	100
Гетероауксин, мг/л:				
0,005	3,3	12,69	90,5	225,1
0,0005	6,3	242,3	102	253,7
0,00005	2,5	96,15	50,1	124,6
<i>Rhizobium meliloti</i> :				
штамм 441	2,9	111,5	70,2	174,6
» 87	4,4	169,2	70,5	175,3
» Л1	2,7	103,8	40,4	100,4
» Л2	3,8	146,1	50,2	124,8
» Л3	3,3	126,9	70,2	174,6
» Л4	3,1	119,2	41,0	101,9
» Л5	3,7	142,3	60,4	150,2
» Л6	5,3	203,8	90,7	225,6

Влияние экстрактов культуральных жидкостей *Rhizobium meliloti* на содержание хлорофилла в дисках из листьев ячменя (мг/дм²)

Вариант	Общий хлорофилл	Вариант	Общий хлорофилл
Вода (контроль)	0,2073	Штамм Л1	0,3567
Кинетин:		» Л2	0,2658
1 мкг/чашку	0,4110	» Л3	0,2903
<i>Rhizobium meliloti</i> :		» Л4	0,3460
штамм 441	0,3789	» Л5	0,4312
» 87	0,2771	» Л6	0,3812

ауксины, но интенсивность образования этих веществ была различной (табл. 1). Среди вирулентных штаммов обнаружен наиболее активный продуцент ауксинов (Л6) и культуры со средней активностью (Л3, Л4). Наряду с этим среди слабовирулентных культур обнаружены как активные продуценты ауксинов (Л2, Л5), так и штаммы, обладающие этой способностью в наименьшей степени (Л1). Мнения исследо-

Т а б л и ц а 3

Влияние экстрактов (из 1 г сырой массы) различных частей корней люцерны на содержание хлорофилла в дисках из листьев ячменя (мг/дм²)

Вариант	Общий хлорофилл	Вариант	Общий хлорофилл
Вода (контроль)	0,1798	15-дневные небактеризованные растения:	
Кинетин, 1 мкг на чашку	0,3651	верхняя часть корней	0,2724
7-дневные небактеризованные растения:		боковые корни	3,7366
верхняя часть корней	0,1371	корневые кончики	0,3142
корневые кончики	0,2452	15-дневные бактеризованные растения:	
7-дневные бактеризованные растения:		верхняя часть корней	0,2880
верхняя часть корней	0,0917	боковые корни	1,0803
корневые кончики	0,1008	корневые кончики	0,5209

вателей о связи вирулентности штамма со степенью его ауксинной активности противоречивы [14, 18, 19]. Однако есть основания полагать, что ауксин усиливает вирулентность ризобий в присутствии растения-хозяина. При проверке культур на кининную активность установлено, что все штаммы продуцируют цитокинины в разной степени (табл. 2). Способность продуцировать цитокинины у ризобий люцерны, как и у ризобий фасоли и сои [5], не коррелирует с вирулентностью. Так, среди слабовирулентных культур встречаются штаммы с наибольшей (Л5) и наименьшей (Л2) кининной активностями.

У небактеризованных 7-дневных растений (табл. 3) содержание цитокининов наиболее высокое в апикальной части корня. При бактеризации уровень цитокининов у проростков этого возраста снижается, что, очевидно, связано с усиленным выделением корневой системой растений не только корневых выделений, стимулирующих размножение клубеньковых бактерий, но и ингибиторов процесса инфицирования [9, 12, 16], особенно в зоне апекса [13]. Не исключено, что метаболизм цитокининов и ингибиторов каким-то образом взаимосвязан.

В апексе 15-дневных проростков, особенно бактеризованных, уровень цитокининов наиболее высок. В этот период ингибиторы процесса инфицирования в среду не выделяются [9] — процесс внедрения

ризобий в ткань уже завершился и в апексе вновь нормализуется синтез цитокининов. Нарушение же цепей метаболизма (синтеза цитокининов-ингибиторов) перемещается в зону боковых корней, куда к этому времени переносится центр внедрения клубеньковых бактерий, как это отмечалось нами ранее [9, 11] при установлении явлений ярусности и зональности действия клубеньковых бактерий [9].

Итак, синтез цитокининов в корневой системе бактеризованных растений снижается в период, предшествующий внедрению клубеньковых бактерий в ткань корня, что может быть связано с усилением продуцирования корнем ингибиторов процесса инфицирования в это время. Локализация цитокининов в корневой системе бактеризованных растений 7- и 15-суточного возраста подтверждает ранее установленные нами явления зональности и ярусности действия клубеньковых бактерий в процессе инфицирования растения-хозяина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зикманис П. Б. Определение цитокининов в культуральной жидкости клубеньковых бактерий *Rhizobium meliloti* D-208. «Изв. АН ЛатвССР», 1975, № 7, с. 69—74. — 2. Ковровцева С. А. Влияние типа почвы и влажности на рост и размножение клубеньковых бактерий. Тр. ВНИИ с.-х. микробиол., 1933, т. 5, с. 98—104. — 3. Кулаева О. Н. Цитокинины и их физиологическое действие. Успехи соврем. биол., 1967, т. 63, вып. 1, с. 28—53. — 4. Кулаева О. Н. Цитокинины, их структура и функция. М., «Наука», 1973. — 5. Нзитабакузе Ж. Б., Марьенко В. Г., Шильникова В. К. Цитокининная активность клубеньковых бактерий фасоли и сои из разных почвенно-климатических зон. «Изв. ТСХА», 1977, вып. 4, с. 229—232. — 6. Ошкая В. П., Муценисце Д. Х., Берзиня С. А. Выделение микроорганизмами производных пурина. Сообщ. II. «Изв. АН ЛатвССР», 1973, № 5, с. 81—86. — 7. Турецкая Р. Х. Метод определения активности веществ, стимулирующих корнеобразование. В кн.: Методы определения регуляторов роста и гербицидов. М., «Наука», 1966. — 8. Чайлахян М. Х., Каладжян Н. Л. Влияние инокуляции клубеньковыми бактериями на содержание регуляторов роста у бобовых растений. «Биол. журн. Армении», 1970, т. 23, № 4, с. 14—26. — 9. Шильникова В. К. Приживаемость клубеньковых бактерий в ризосфере клевера в различные этапы инфицирования. «Изв. ТСХА», 1975, вып. 6, с. 19—29. — 10. Шильникова В. К., Тагиев В. Д. Влияние гетероауксина на инокуляцию и симбиотическую азотфиксацию бобовых. «С.-х. биол.», 1969, т. IV, № 2, с. 255—260. — 11. Шильникова В. К., Ярыгин Л. А., Шатта А. Х. Начальные этапы инфицирования люцерны клубеньковыми бактериями. «Изв. АН СССР», сер. биол., 1975, № 2, с. 307—314. — 12. Шлык А. А. О спектрометрическом определении хлорофиллов «а» и «б». «Биохимия», 1968, т. 33, вып. 2, с. 275—285. — 13. Egeraat A. W. S. M. van. Antonie van Leeuwenhoek. «J. Microbiol. a. Serol.», 1971, vol. 37, N 2, p. 260—261. «Plant a. Soil», 1975, vol. 42, N 2, p. 367—379. — 14. Gianntasio M., Coppola S. «Gazz. bot. ital.», 1969, t. 103, p. 11—17. — 15. Phillips D. A., Torrey J. G. «Physiol. plantarum», 1970, vol. 23, p. 1057—1063. — 16. Ranga Rao V., Subba Rao N. S., Mukerji K. G. «Plant a. Soil», 1973, vol. 39, N 2, p. 449—452. — 17. Rodrigues Pereira A. S., Houtwen P. I. W., Deurenberg-Vos H. W. I., Pey F. «Z. Pflanzenphysiol.», 1972, Bd. 68, N 2, S. 170—177. — 18. Vidhyasekaran P., Balaraman K., Deiveegasundaram M., Rangaswami G. «Curr. Sci.», (India), 1973, vol. 42, N 2, p. 66—67. — 19. Yoshida Sh. «J. Sci. Soil. a. Manure Jap.», 1973, vol. 44, N 9, p. 340—341.

Статья поступила 13 июля 1977 г.

SUMMARY

The content of cytokinins in the roots of alfalfa sprouts bacterized with the active and virulent strain 441 of nodule bacteria of alfalfa varied with the plant age (7- and 15-day-old sprouts), the effect of bacteria and the root zone. Before the nodule bacteria are established in the root tissue, the synthesis of cytokinins in the root system is reduced, which is likely to be connected with the more intensive producing of inhibitors of infection process by the root in this period. The localization of cytokinins in the root system of 7- and 15-day-old bacterized plants confirms the phenomena of zonality and storiness of nodule bacteria action in the process of host-plant infection that were established by us before.