

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Известия ТСХА, выпуск 2, 2014 год

УДК 581.1:58.07.071

ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС РАСТЕНИЙ ГОРОХА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*

Г.П. АКИМОВА¹, М.Г. СОКОЛОВА¹, В.В. ВЕРХОТУРОВ², С.Л. БЕЛОПУХОВ³

О Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
² Иркутский государственный технический университет,
³ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

В работе проведена оценка изменений в содержании индолилуксусной кислоты, цитокининов в корнях сортов и мутантов гороха, отличающихся по нодуляции, при инфицировании Rhizobium leguminosarum. Растения гороха (Pisum sativum L.) сортов Марат, Тордаг и мутантов K511 и K1005 выращивали в вегетационных сосудах. Инокуляцию проводили при посеве водной суспензией 3-суточной культуры клеток клубеньковых бактерий Rhizobium leguminosarum bv. viciae эффективного штамма 250a. Растения инокулировали путем орошения семян водным смывом культуры бактерий с твердой среды в концентрации 2×10^7 кл/мл из расчета 1 мл на корень. В качестве контроля использовали одновозрастные неинокулированные растения. Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ на приборе «Милхром». Полученные данные позволяют предполагать, что успешное развитие симбиотических отношений в растениях гороха обеспечивается высоким уровнем фитогормонов в корнях и в надземных органах на разных этапах инфицирования. Фитогормоны могут индуцировать начало делений клеток коры корня на стадии образования клубеньков, дальнейшая дифференциация клубеньков и дальнейшая их функциональная активность, по-видимому также зависят от баланса фитогормонов и обеспечиваются последующими гормональными сигналами на уровне целого растения.

Ключевые слова: фитогормоны, цитокинины, индолилуксусная кислота, горох.

Немаловажным стимулом для изучения бобово-ризобияльного симбиоза является его большая практическая значимость. Целый ряд бобовых относится к числу ключевых сельскохозяйственных культур, выращивание которых на экологически чистом «биологическом азоте» — весьма актуальная задача. Долгое время единственным способом повышения интенсивности симбиотической азотфиксации был подбор штаммов клубеньковых бактерий, используемых для предпосевной обработки (инокуляции). Однако в настоящее время одной из важных задач является селекция бобовых культур и использование мутантов бобовых растений (в частности, гороха) для изучения различных тонких физиологических процессов и механизмов эффективности симбиоза [7, 14].

Фитогормоны (ФГ) принимают активное участие во многих метаболических процессах в растении [3, 8-10, 23]. Развитие и функционирование бобово-ризобиального симбиоза — сложная высокоспециализированная система, требующая высокой степени регуляции физиологических процессов растения-хозяина и микросимбионта с участием фитогормонов [5, 17]. Известно, что инфицирование приводит к изменению уровня фитогормонов в корнях и клубеньках бобовых растений [15, 22]. Показано, что несколько стадий образования клубеньков могут индуцироваться в результате изменения гормонального статуса растения. В частности, ауксин и цитокинины могут выступать в роли триггеров деления клеток коры корня в процессе формирования клубеньков и экспрессии генов ранних белков-нодулинов (ENOD) [18, 19, 20, 21].

Однако до сих пор остается неясным вопрос о связи между содержанием ФГ в корневых клубеньках и их ростом, а также роли каждого из партнеров симбиоза (растения-хозяина и клубеньковых бактерий) в изменении гормонального статуса инокулированного растения. Изучение влияния гормонов на формирование и функционирование симбиотической системы на примере сортов и мутантов гороха с измененной структурой стебля и разной степенью нодуляции позволяет установить особенности гормонального баланса, роли фитогормонов в бобово-ризобиальном симбиозе и пути повышения активности симбиоза бобовых растений с клубеньковыми бактериями.

Целью исследования явилась оценка изменений в содержании индолилуксусной кислоты (ИУК), цитокининов (ЦК) в корнях сортов и мутантов гороха, отличающихся по нодуляции, при инфицировании *Rhizobium leguminosctnim*.

Методика исследования

Исследования проводили в условиях станции искусственного климата Сибирского института физиологии и биохимии растений (Фитотрон СИФИБР СО РАН) при температуре воздуха днем 22°C, ночью 17°C и относительной влажности 60%. Интенсивность освещения 200 Вт/м² при 16-часовом фотопериоде. Растения гороха (*Pisum sativum* L.) сортов Марат, Торсдаг и мутантов K511 и K1005 выращивали в вегетационных сосудах на прокаленном речном песке с внесением питательной смеси Гельригиля (со сниженной в 5 раз стартовой дозой минерального азота для инокулированных растений) и комплекса необходимых микроэлементов. Сорт гороха Торсдаг и его мутанты K511 (низкорослый, образующий клубеньки) и K1005 (бесклубеньковый карлик) любезно предоставлены К.К. Сидоровой (ИЦиГ СО РАН).

Исходный сорт гороха Торсдаг. Растения высокорослые, хорошая нодуляция, высокая нитрогеназная активность, устойчивость к нитратам. Один из наиболее урожайных сортов по вегетативной массе и зерну. Мутант K511 индуцирован химическим мутагеном этилметансульфонатом из сорта Торсдаг. Растения низкорослые, междуузлия укорочены, стебель утолщен, размеры листочков и бобов уменьшены. Продуктивность немного меньше исходного сорта. Клубенькообразование хорошее, нитрогеназная активность немного ниже или на уровне исходного сорта. Мутант K1005 индуцирован этилметансульфонатом из мутанта K511. Растения низкорослые, низко продуктивные, бесклубеньковые. Отсутствие клубеньков проявляется при выращивании с азотом и без азота [12, 13].

Инокуляцию проводили при посеве водной суспензией 3-суточной культуры клеток клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicecte* эффективно-

го штамма 250а, полученного из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Санкт-Петербург, Пушкин). Растения инокулировали путем орошения семян водным смывом культуры бактерий с твердой среды в концентрации 2×10^7 кл/мл из расчета 1 мл на корень. В качестве контроля использовали одновозрастные неинокулированные растения.

Содержание ИУК и ЦК определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Милихром» с УФ-детектором и микроколоной КАХ-2 с сорбентом Сепарон C_{18} , размер частиц 5 мкм [4, 11]. Выделение и очистку эндогенной ИУК проводили по Савинскому [11], используя пластинки «Silufol». Проявляли первый раз хлороформом, второй раз — 12,5% аммиаком. Далее разделяли в системе растворителей: этилацетат-уксусная кислота (20:1). В качестве стандарта использовали спиртовой раствор ИУК (Sigma, США).

Для определения содержания цитокининов материал гомогенизировали 80% этанолом и экстрагировали им в соотношении 1:10 в течение 18 ч при температуре 4°C, с добавлением диэтилдитиокарбамата натрия и порошка растворимого поливинилпирролидона 10% от навески для сорбции фенолов (Calbiochem, Германия). Супернатант отделяли центрифугированием, упаривали до водного остатка, подщелачивали до pH = 8 и трижды экстрагировали водонасыщенным бутанолом-1. Бутанольный экстракт упаривали досуха, растворяли в 95% этаноле.

Для очистки проб использовали пластинки Silufol-254 UV (Kavalier, Чехия). Тонкослойную хроматографию ЦК проводили в системе бутанол-1 : ледяная уксусная кислота : вода (4:1:1) [2, 6]. Зоны зеатина и зеатинрибозида на хроматограмме объединяли, элюировали 70% этанолом и упаривали досуха. Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ на приборе «Милихром» (ЭкоНова, Россия): детектор ультрафиолетовый, длина волны 268 нм, колонка Silasorb SPH-5 C18 с эффективностью 4000 теоретических тарелок, размер 2 x 75 мм. Элюэнт: ацетонитрил — вода — уксусная кислота (55:44:1), объем пробы 5 мкл. Идентификацию зеатина и зеатинрибозида осуществляли сравнением времен удерживания стандартных зеатина и зеатинрибозида (Sigma, США). Данные, представленные для ЦК, характеризуют суммарное содержание зеатина и зеатинрибозида.

Результаты и их обсуждение

Анализ данных показал, что содержание ИУК и ЦК в корнях сортов Марат и Торсдаг и мутанта K511 значительно увеличивалось при инокуляции (табл. 1). Из таблицы видно, что уровень ИУК и ЦК значительно ниже у мутантов по сравнению с исходным сортом, особенно у бесклубенькового мутанта K1005.

Содержание ИУК при инокуляции значительно возросло у сортов Марат, Торсдаг и мутанта K511, при этом у сорта Торсдаг оно было наибольшим. У бесклубенькового мутанта увеличения в содержании ИУК в исследуемой фазе массового цветения не наблюдалось.

Содержание ЦК в корнях в варианте без инокуляции снижалось по мере роста растений и в фазу массового цветения было наименьшим. В варианте с инокуляцией уровень ЦК по всем исследуемым фазам развития растений намного выше, при этом в фазе массового цветения он был максимальным. У бесклубенькового мутанта K1005 увеличения в содержании ЦК в варианте с инокуляцией не наблюдалось.

В надземной части растений гороха содержание фитогормонов было значительно выше, чем в корнях (табл. 2), а уровень ИУК и ЦК у сортов Марат и Торсдаг

Таблица 1

**Содержание ИУК и цитокининов (мкг/г сырого вещества)
в корнях инокулированных и неинокулированных растений гороха**

Сорт, мутант	Фаза развития	Контроль		Инокуляция	
		ИУК	цитокинины	ИУК	цитокинины
Марат	4-5 листьев	1,64	2,75	3,31	3,86
	9-10 листьев	1,00	1,60	2,44	3,28
	Массовое цветение	1,23	0,97	2,03	5,25
Торсдаг	9-10 листьев	2,31	2,30	4,52	4,60
	Массовое цветение	1,25	1,98	3,65	6,54
Мутант K511	9-10 листьев	1,21	1,88	2,04	2,10
	Массовое цветение	1,15	0,76	1,78	3,32
Мутант K1005	Массовое цветение	0,82	0,97	1,11	0,96

Примечание. Стандартные ошибки не превышали 10%.

Таблица 2

**Содержание фитогормонов (мкг/г сырого вещества)
в надземной части гороха в фазе массового цветения**

Сорт, мутант	Контроль		Инокуляция	
	ИУК	цитокинины	ИУК	цитокинины
Марат	7,30	4,40	9,64	6,24
Торсдаг	6,50	4,77	9,33	6,41
Мутант K511	4,78	3,85	7,34	5,18
Мутант K1005	4,57	3,23	4,50	5,40

Примечание. Стандартные ошибки не превышали 10%.

был выше, чем у мутантов. Самое низкое содержание гормонов наблюдали у бесклубенькового мутанта K1005.

Инокуляция повышала уровень фитогормонов у всех сортов и мутантов, кроме содержания ИУК у мутанта K1005.

Известно, что в процессе онтогенеза многих растений активность эндогенных ауксинов и цитокининов в листьях растет от фазы всходов до бутонизации, а затем уменьшается [1, 16]. Уровень и баланс ФГ изменяется: понижается биосинтез ЦК в корнях и их транспорт в листья.

Инокуляция клубеньковыми бактериями увеличивала содержание ФГ как в корнях, так и в надземной части у нодулирующих сортов и мутантов гороха до фазы массового цветения, приводя к новому уровню и балансу ФГ, способному обеспечить, вероятно, не только нормальное протекание процессов цветения растений, но и эффективную симбиотическую фиксацию азота. Однако у мутантов уровень гормонов инфицированных растений изменялся в меньшей степени, это сказывалось на нарушении нодуляции, что особенно наглядно наблюдали у бесклубенькового мутанта.

В последнее время обсуждается роль ауксинов и ЦК на ранних стадиях взаимодействия симбионтов — в механизмах «сигналинга», связанного с инфицированием растения и формированием клубеньков, в частности, с процессами индукции деления клеток внутренней коры корня [18, 20-22]. Но эти начальные этапы развития симбиотических отношений тесно связаны и могут существенно влиять на дальнейшие более поздние процессы развития и функционирование симбиоза, а также на продуктивность растений.

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что успешное развитие симбиотических отношений в растениях гороха обеспечивается высоким уровнем ИУК и ЦК как в корнях, так и в надземных органах на разных этапах инфицирования. Помимо того что они могут индуцировать начало делений клеток коры корня на стадии образования клубеньков [1, 20, 21], дальнейшая дифференциация клубеньков и дальнейшая их функциональная активность, по-видимому, также зависят от баланса фитогормонов и обеспечиваются последующими гормональными сигналами на уровне целого растения.

Библиографический список

1. *Акимова Г.П., Соколова М.Г.* Содержание цитокининов на начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза и влияние гипотермии // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 5. С. 668-673.
2. *Емельянов В.В., Кирчихина Н.Л., Ласточкин В.В., Чиркова Т.В.* Гормональный баланс проростков пшеницы и риса в условиях аноксии // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 922-929.
3. *Кулаева О.Н., Кузнецов В.В.* Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 4. С. 626-640.
4. Методические рекомендации по определению фитогормонов. Киев: АН Укр. ССР, 1988. 78 с.
5. *Павлова З.Б., Добродумова В.В., Кравченко Л.В., Лутова Л.А.* Характеристика некоторых симбиотических мутантов гороха по признакам, связанным с гормональным статусом // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 799-804.
6. *Полевой В.В., Полевой А.В.* Эндогенные фитогормоны этиолированных проростков кукурузы // Физиология растений. 1992. Т. 39. С. 1165-1174.
7. *Проворов Н.А., Воробьев П.П.* Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза // СПб.: Информ-Навигатор, 2012. 400 с.
8. *Прусакова Л.Д., Кефели В.П., Белопухов С.Л., Вакуленко В.В., Кузнецова С.А.* Роль фенольных соединений в растениях // Агрехимия. 2008. № 7. С. 86-96.
9. *Розов С.М., Загорская А. А., Дейнеко Е.В., Шумный В.К.* Ауксин: регуляция и возможные пути ее модуляции // Успехи совр. биологии. 2013. № 2. С. 115-123.

10. Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. 2009. Т. 56. №2. С. 295-319.
11. Савинский С.В., Кофман И.Ш., Кофанов В.И., Стасевская П.П. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиология и биохим. культ. растений. 1987. Т. 19. № 2. С. 195-200.
12. Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю. Исследование симбиотических мутантов гороха // Генетика. 1997. Т. 33. № 5. С. 656-659.
13. Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарук В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрохимические аспекты // Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, Гео, 2006. 134 с.
14. Тихонович П.Л., Проворов П.А. Симбиозы растений и микроорганизмов // СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2009. 210 с.
15. Федорова Е. Э., Жизневская Г.Я., Калиберная З.В., Артеменко Е.П., Измайлов С. Ф., Гуськов А.В. Метаболизм ИУК при установлении симбиоза между *Phaseolus vulgaris* и *Rhizobium phaseoli* // Физиол. раст. 2000. 47. № 2. С. 231-235.
16. Чайлохан М.Х. Регуляция цветения высших растений (Гормональная регуляция онтогенеза растений). М.: Наука, 1984. С. 9-28.
17. Bauer P., Cobad I., Fruglier F., Poirier S., McKhann H.I., Ratet P., Brown S., Crespi M., Kondorosi A. Role of plant hormones and carbon/nitrogen metabolism in controlling nodule initiation on alfalfa roots // Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. St. Petersburg; Dordrecht; Boston; London, 1995. P. 443.
18. DeMason D.A., Chawla R. Roles of auxin during morfogogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*) // Planta. 2004. 218. P. 435-448.
19. Fei H., Vessey J.K. Involvement of cytokinin in the stimulation of nodulation by low concentration of ammonium in *Pisum sativum* // Physiologia Plantarum. 2003. V. 118. Issue 3. P.447-457.
20. Ferguson B.J., Mathesius U. Signaling interaction during nodule development // J. Plant Growth Regul. 2003. V. 22. P. 53-68.
21. Hirsch A.M., Fang Y., Asad S., Kapulnik Y The role of phytohormones in plant-microbe symbiosis // Plant Soil. 1997. 194, 171-184.
22. Hirsch A.M., Fang Y Plant hormones and nodulation: what's the connection? // Plant Molec. Biology. 1994. 26, 5-9.
23. Moskalenko A.I., Belopukhov S.I., Ivlev A.A., Boev V.I. General procedure for the synthesis of spirocyclic 3-hydroxy- and 3-oxotetrahydrofurans containing carbo- and heterocyclic fragments // Russian Journal of Organic Chemistry. 2011. V. 47. № 7. P. 1091-1096.

HORMONAL STATUS OF PEA PLANTS INFECTED WITH BACTERIA *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*

G.P. AKIMOVA¹, M.G. SOKOLOVA¹, V.V. VERKHOTUROV², S.L. BELOPUKHOV³

(¹ Siberian institute of physiology and biochemistry of plants of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Science, ² Irkutsk state technical university,
³ RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev)

*The article deals with the assessment of changes in the content of indoleacetic acid and cytokines in roots of pea cultivars and mutants differing in nodulation when infected with *Rhizobium leguminosarum*. Peas plants (*Pisum sativum* L.) represented by Marat and Torsdag cultivars and K511 and K1005 mutants were grown in vegetative pots. Inoculation with *Rhizobium leguminosarum**

um bv. *viceae* (effective strain 250a) was conducted along with the sowing when seeds were treated with water suspension containing 3-day cell culture of nodule bacteria. Seeds were infected with bacteria washed off with water from solid medium at the rate of 1 ml per root, the concentration of the solution being 2x10⁷ kl/ml. *N* on-inoculated plants of the same age were used as a control. Obtained samples were analyzed with the use of high performance liquid chromatography (HPLC) method. The acquired data allow assuming that successful development of symbiotic relationship in pea plants is due to the high level of phytohormones contained in both roots and above-ground plant parts at different stages of infecting. Phytohormones can initiate cell division in root cortex at the stage of nodule formation. Further differentiation of nodules and their functional activity are likely to depend on phytohormones balance and to be provided by the subsequent hormonal signals at the level of the plant in a whole.

Key words: phytohormones, cytokines, indoleacetic acid, pea.

Акимова Галина Петровна — к. б. н., ст. науч. сотр. лаборатории физиологии устойчивости растений ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук. Иркутский научный центр СИФИБР СО РАН (664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317; тел. (3952) 42-82-56, факс (3952) 51-07-54; e-mail: akimova@sifibr.irk.ru).

Соколова Марина Гавриловна — к. б. н., ст. науч. сотр. лаборатории физиологии устойчивости растений ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук. Иркутский научный центр СИФИБР СО РАН (664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317; тел. (3952) 42-82-56, факс (3952) 51-07-54; e-mail: SokolovaMG@sifibr.irk.ru).

Верхотуров Василий Владимирович — д. б. н., проф. Кафедры химии и пищевой технологии им. профессора В.В. Тутуриной ФГБОУ ВПО Иркутский государственный технический университет (664074, Иркутск, ул. Лермонтова, 83).

Белопухов Сергей Леонидович — д. с.-х. н., проф., зав. кафедрой физической и органической химии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: belopuhov@mail.ru).

Akimova Galina Petrovna — PhD. in Biology, senior research scientist of the laboratory of plant resistance physiology, Siberian institute of physiology and biochemistry of plants of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk scientific centre of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science (664033, Irkutsk, Lermontova street, 132; tel. (3952) 42-82-56, fax: (3952) 51-07-54; e-mail: akimova@sifibr.irk.ru).

Sokolova Marina Gavrilovna — PhD. in Biology, senior research scientist of the laboratory of plant resistance physiology, Siberian institute of physiology and biochemistry of plants of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk scientific centre of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science (664033, Irkutsk, Lermontova street, 132; tel. (3952) 42-82-56, fax: (3952) 51-07-54; e-mail: SokolovaMG@sifibr.irk.ru).

Verkhoturov Vasily Vladimirovich — Doctor of Biological Sciences, professor of the department of chemistry and food technology, Irkutsk state technical university (664074, Irkutsk, Lermontova street, 83).

Belopukhov Sergey Leonidovich — Doctor of Agricultural Sciences, professor, head of physical and organic chemistry department, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; e-mail: belopuliov@mail.ru).