

УДК 581.557:577.175.1

## ДИНАМІКА ВМІСТУ ФІТОГОРМОНІВ ЦИТОКІНІНОВОЇ ПРИРОДИ У КОРЕНЯХ І БУЛЬБОЧКАХ СОЇ НА РАННІХ ЕТАПАХ ФОРМУВАННЯ БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ

О.О. ГРИЩУК, С.Я. КОЦЬ, М.В. ВОЛКОГОН

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: shuminka@rambler.ru

Досліджено динаміку вмісту зеатину та зеатинрибозиду в коренях і бульбочках рослин сої *Glycine max* (L.) Merr., інокульованої штамами й Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* із різними симбіотичними характеристиками. Показано, що інокуляція насіння сої азотфіксувальними батареями приводить до збільшення пулу цитокінінів у коренях і кореневих бульбочках на початкових етапах формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу. Встановлено обернену залежність азотфіксувальної активності ризобій-інокулянтів від вмісту зеатинрибозиду в бульбочках сої, а також прямий зв'язок між вмістом зеатинрибозиду і зеатину в бульбочках на 28-му добу після появи сходів сої.

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

Урожайність сільськогосподарських культур великою мірою визначається належним їх забезпеченням мінеральним азотом. Тому інтенсифікація біологічної фіксації молекулярного азоту бобовими культурами за використання ефективних азотфіксувальних мікроорганізмів особливо актуальна в умовах сучасного розвитку сільськогосподарського виробництва.

Здатність рослин родини бобових формувати симбіотичні взаємовідносини з ризобіальними мікроорганізмами приводить до морфогенезу високоспеціалізованого органа — азотфіксувальної кореневої бульбочки [6, 20]. Утворення і функціонування останньої потребує складної регуляції на генетичному й біохімічному рівнях, у тім числі за участі регуляторів росту рослин, зокрема фітогормонів [4, 19].

Мікроорганізми, що перебувають у симбіозі та асоціаціях із рослинами, здатні до синтезу фітогормонів [5, 10, 14, 15] і використовують їх як посередників у взаємодії з рослиною. Ця властивість є важливим чинником у становленні й подальшому функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу [2, 3, 10, 18].

Серед відомих на сьогодні класів гормонів рослин важливе місце у встановленні симбіотичних взаємозв'язків посідають цитокініни (ЦК), зокрема зеатин і зеатинрибозид. Із літератури відомо, що основний вплив фітогормонів цитокінінкової природи виявляється в регуляції поділу та диференціації клітин [19]. Вважають, що цитокініни беруть участь у процесі утворення й росту корневих бульбочок унаслідок акти-

вації клітинного циклу та генів, асоційованих із ним, а також низки генів ранньої нодуляції, зокрема *ENOD2* [13, 17], *ENOD12A* [13], *ENOD40* [12, 19, 24]. При цьому важливе значення має не лише концентрація ЦК, а й їх співвідношення з іншими гормональними сполуками. Так, цитокініни разом з ауксинами діють комплексно на поділ корових клітин кореня [23], можуть слугувати медіаторами змін його клітинної стінки, пов'язаних з утворенням інфекційної нитки всередині деформованого кореневого волоска і наступним проникненням бактерій у кору кореня [9].

Важливу роль фітогормонів цитокінінової природи в ініціації утворення корневих бульбочок було продемонстровано за використання  $\text{nod}^-$ -штамів мікроорганізмів, нездатних до синтезу Nod-факторів, яким перенесли ген секреції *транс*-зеатину [17]. Доведено, що синтез зеатину індукував утворення неколонізованих мікроорганізмами бульбочкоподібних структур на коренях *Medicago sativa*, а також, що цитокініни імітують деякі морфогенетичні ефекти Nod-факторів [17]. У досліджах із використанням екзогенних цитокінінів встановлено здатність останніх до стимуляції утворення псевдобульбочкових структур на коренях як бобових, так і небобових рослин, зокрема *Nicotiana tabacum* (тютюн звичайний) [11], *Alnus glutinosa* (вільха чорна) [27], *Pisum sativum* (горох посівний) [24], *Macroptilium atropurpureum* (квасоля темно-пурпурова) [26], *Medicago sativa* (люцерна посівна) [13, 17].

Широке застосування генетичних методів у сучасній біології рослин і мікробіології уможливило створення низки модельних систем для дослідження рослинно-мікробних взаємодій [19]. Зокрема з використанням транспозонового мутагенезу [7, 22] отримано штами *Bradyrhizobium japonicum* зі зміненими симбіотичними характеристиками, що має велике практичне значення при вивченні механізмів утворення і функціонування симбіозу [2, 7, 16, 28].

Метою нашої роботи було дослідження динаміки вмісту зеатину та зеатинрибозиду в коренях і бульбочках рослин сої за інокуляції насіння штамами й Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності, встановлення зв'язку між вмістом цитокінінів у коренях і бульбочках та азотфіксувальною активністю штамів.

## Методика

Дослідження проводили з рослинами сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Мар'яна (селекція Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, Селекційно-генетичного інституту та Інституту землеробства НААН), інокульованими різними за ефективністю штамами *B. japonicum*: 646 (вихідний штам, високоактивний), 604к (неактивний), Т66 (високоактивний) та Tn5-мутантами штаму 646: 9-1 (високоактивний), Т21-2 (високоактивний), 113 (малоактивний) із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України.

Рослини сої вирощували в умовах вегетаційного дослідження в посудинах Вагнера на промитому річковому піску за 60 % ПВ і природного освітлення, по 6 рослин у кожній. Джерело мінерального живлення — поживна суміш Гельригеля, збагачена мікроелементами молібденом, бором, манганом і міддю та збіднена на азот — 0,25 норми (1 норма азоту відповідає  $708 \text{ мг Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  на 1 кг субстрату).

Перед посівом простерилізоване 70 %-м етанолом і промите під проточною водою протягом 1 год насіння інокулювали суспензіями бульбочкових бактерій, концентрація яких становила  $10^7$  клітин/мл. Зразки рослин для аналізу відбирали на 11-, 13-, 15-, 20-ту, 28-му, 34-ту та 47-му доби після появи сходів.

Активність процесу азотфіксації визначали ацетиленовим методом [21] на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США).

Вміст цитокинінів у коренях і бульбочках рослин сої знаходили методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [1, 8]. Для цього фітогормони з рослинної наважки екстрагували 96 %-м етанолом; етанольний екстракт випарювали на ротаційному випарнику (HEIDOLPH Laborota 4000 efficient, Німеччина) і повторно розчиняли в 1,5 мл спирту. Екстракт очищували хроматографією на пластинках із силікагелем «Merck» (№ 105554, Німеччина) у різних системах розчинників: хлороформ ( $R_f = 0$ ), аміак 12,5 % ( $R_f = 1$ ) та етилацетат : оцтова кислота (19 : 1). Після очищення зони, що збігались за  $R_f$  із нанесеними раніше стандартами цитокинінів, знімали й елюювали *n*-бутанолом. Елюати зеатину і зеатинрибозиду рехроматографували на пластинках із шаром оксиду алюмінію «Merck» (№ 105550, Німеччина) в системі розчинників хлороформ : оцтова кислота (19 : 1). Кількісно фітогормони визначали за допомогою сканувального спектроденситометра «Camag TLC Scanner» (Швейцарія).

Експериментальні дані оброблено статистично методом дисперсійного аналізу з використанням ПЕОМ із залученням пакета спеціальних програм Microsoft Excel'10.

## Результати та обговорення

Під час дослідження азотфіксувальної активності симбіотичних систем сої виявлено, що на 15-ту добу після появи сходів рослини, насіння яких було інокульоване високоактивним Tn5-мутантом T21-2, вирізнялись найбільшим показником активності азотфіксації, яка надалі продовжувала зростати і на 20-ту добу становила 2,71 мкмоль  $C_2H_4$ /(рослину · год) (рис. 1). На 28-му добу після появи сходів найвищі значення азотфіксувальної активності спостерігали у корневих бульбочках сої за викорис-

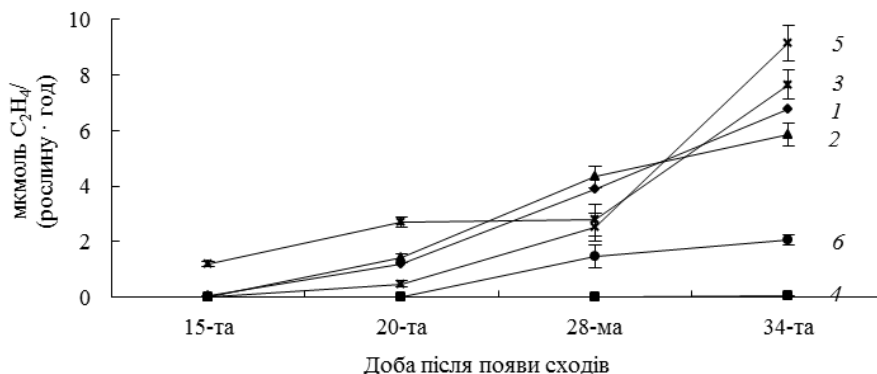


Рис. 1. Азотфіксувальна активність (мкмоль  $C_2H_4$ /(рослину · год)) рослин сої за інокуляції різними за ефективністю штаммами й Tn5-мутантами *B. japonicum*:

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

тання високоактивних штамів *B. japonicum* T66, 646 і Tn5-мутантів T21-2, 9-1. На 34-ту добу після появи сходів ці варіанти з високоактивними штамми й Tn5-мутантами істотно відрізнялись і перевищували за зазначеним показником варіанти з використанням неактивного штаму 604к та малоактивного Tn5-мутанта 113.

Вміст цитокінінів у коренях і кореневих бульбочках сої визначали як на початкових етапах формування симбіотичного апарату, так і в період його активного функціонування. Кількісний аналіз зеатину в коренях сої показав зростання вмісту цього гормону майже в усіх варіантах порівняно з контрольними рослинами без інокуляції (табл. 1). На 11-ту добу після появи сходів найбільшим вмістом зеатину характеризувалися корені рослин, інокульованих транспозоновими мутантами *B. japonicum* 9-1 і 113, на 13-ту добу — зростання його вмісту в коренях сої відмічено у рослин, інокульованих штамми 646 і 604к. Починаючи з 15-ї доби після появи сходів, у коренях сої спостерігали незначне зменшення пулу зеатину (див. табл. 1).

Різке зростання вмісту зеатину на 34-ту добу після появи сходів імовірно можна пояснити активним функціонуванням азотфіксувального апарату сої. При цьому пул цього гормону в рослинах, інфікованих Tn5-мутантами *B. japonicum*, був істотно вищим, ніж у контрольних та інокульованих вихідним штамом 646 рослинах (див. табл. 1).

Визначення рівня зеатину в бульбочках досліджуваних рослин сої показало, що найвищий його вміст спостерігався на 15-ту добу вегетації (табл. 2) — період, який у наших дослідженнях характеризувався активним ростом і морфогенезом цих органів. Виявлений факт узгоджується з даними Ньюкомба та співавт. [25], за якими найвищий рівень цитокінінів зосереджується у молодих і тих, що розвиваються, бульбочках, що підтверджує зазначену нами раніше роль цитокінінів у клітинному поділі й диференціації [19]. Особливо активний біосинтез зеатину відмічено у бульбочках рослин, бактеризованих високоактивними штамми 646, T66 і Tn5-мутантами *B. japonicum* 9-1, T21-2.

У подальшому виявлено зниження рівня зеатину в кореневих бульбочках сої. Проте на 34-ту добу після появи сходів (фаза бутонізації) у бульбочках рослин зафіксовано зростання пулу цього гормону за винятком варіанта з використанням *B. japonicum* 604к. Найвищий вміст зеатину був у бульбочках сої, інокульованої штамом *B. japonicum* 646 та його високоактивними мутантами 9-1 і T21-2. При цьому встановлено прямий зв'язок між активністю штаму-інокулянта та вмістом зеатину в бульбочках інфікованих рослин. Це дає підставу стверджувати, що внесок останнього у процес регуляції ініціації й розвитку азотфіксувальних бульбочок вагомий.

Крім зеатину ми визначали вміст зеатинрибозиду — запасної і транспортної форми цитокінінів. Коливання рівня зеатинрибозиду в органах такий же важливий чинник гормональної регуляції рослини, як і вміст його активної форми — зеатину.

Виявлено, що рівень зеатинрибозиду в коренях рослин сої найвищий саме на початкових етапах формування симбіотичних взаємовідносин (11-та доба після появи сходів) (табл. 3). Найбільшим вмістом запасної форми зеатину характеризувались корені рослин, бактеризованих неактивним, проте високовірулентним штамом 604к, а також високоактивним і високовірулентним штамом 646. У подальшому в процесі веге-

ТАБЛИЦЯ 1. Вміст зетину (мг/г сирої речовини) у коренях рослини сої за інюкуляції штабами й Tn5-мутантами *V. жоронісит*

Варіант	Доба після появи сходів							
	11-га	13-га	15-га	20-га	28-ма	34-га	47-ма	
Контроль (без інюкуляції)	0,96±0,17	1,00±0,86	0,97±0,94	0,91±0,33	1,21±0,07	1,47±0,10	1,50±0,11	
Штам <i>V. жоронісит</i>								
646	1,30±0,12	3,23±0,27	1,22±0,98	1,29±0,11	2,21±0,21	9,34±0,65	1,35±0,09	
604к	1,31±0,15	2,66±0,24	1,79±0,14	1,06±0,78	1,72±0,15	13,66±0,96	1,57±0,11	
T66	0,94±0,23	2,24±0,19	1,59±0,13	1,08±0,81	1,53±0,11	16,84±1,18	0,66±0,05	
Tn5-мутант								
9-1	1,37±0,11	1,08±0,74	1,50±0,09	1,17±0,96	1,08±0,38	16,00±1,12	0,72±0,05	
T21-2	1,28±0,12	1,42±0,12	1,15±0,08	1,01±0,79	1,01±0,45	22,29±1,56	0,66±0,05	
113	1,54±0,12	2,05±0,18	1,13±0,09	1,23±0,12	0,99±0,58	19,27±1,53	2,63±0,18	

ТАБЛИЦЯ 2. Вміст зетину (мг/г сирої речовини) у бульбочках рослини сої за інюкуляції штабами й Tn5-мутантами *V. жоронісит*

Варіант	Доба після появи сходів							
	15-га	20-га	28-ма	34-га	47-ма			
Контроль (без інюкуляції)	—	—	—	—	—			
Штам <i>V. жоронісит</i>								
646	20,03±1,92	5,07±0,46	2,50±0,22	9,62±0,67	7,03±0,49			
604к	13,24±1,27	7,36±0,66	2,95±0,27	1,18±0,08	13,67±0,96			
T66	26,99±2,04	5,71±0,51	3,97±0,36	7,31±0,02	11,35±0,79			
Tn5-мутант								
9-1	66,18±4,79	8,04±0,72	2,61±0,23	12,47±0,87	12,17±0,85			
T21-2	23,53±1,75	8,28±0,75	4,53±0,41	11,99±0,84	21,34±1,49			
113	13,87±1,24	12,02±1,08	6,68±0,60	8,17±0,01	13,17±0,92			

ТАБЛИЦЯ 3. Вміст зеатинрибозиду (нг/г сирої речовини) у коренях рослин сої за інюкуляції різними за ефективністю штамами й Тп5-мутантами *V. жорюсіт*

Варіант	Доба після появи сходів							
	11-га	13-га	15-га	20-га	28-ма	34-га	47-ма	
Контроль (без інюкуляції)	6,60±0,54	5,30±0,41	4,34±0,12	3,51±0,28	2,36±0,18	1,65±0,14	1,13±0,08	
Штам <i>V. жорюсіт</i>								
646	9,91±0,68	7,69±0,52	4,50±0,23	4,36±0,34	3,42±0,21	4,64±0,32	1,48±0,10	
604к	11,07±0,49	6,16±0,34	5,36±0,45	2,82±0,18	3,64±0,29	1,52±0,11	0,87±0,06	
Т66	8,75±0,62	8,56±0,59	4,86±0,37	5,54±0,37	7,72±0,61	4,62±0,32	1,61±0,11	
Тп5-мутант								
9-1	9,58±0,49	5,57±0,27	5,15±0,38	5,38±0,42	6,59±0,36	3,47±0,24	1,97±0,14	
Т21-2	6,60±0,53	7,28±0,48	4,46±0,32	5,68±0,37	4,01±0,25	6,52±0,46	1,05±0,07	
113	7,88±0,67	5,15±0,24	5,34±0,29	5,68±0,45	7,56±0,53	4,77±0,33	1,42±0,10	

ТАБЛИЦЯ 4. Вміст зеатинрибозиду (нг/г сирої речовини) у бульбочках сої за інюкуляції різними за ефективністю штамами й Тп5-мутантами *V. жорюсіт*

Варіант	Доба після появи сходів							
	15-га	20-га	28-ма	34-га	47-ма			
Контроль (без інюкуляції)	—	—	—	—	—			
Штам <i>V. жорюсіт</i>								
646	18,26±0,98	23,09±2,01	8,63±0,54	4,02±0,28	2,11±0,15			
604к	21,47±1,68	17,66±1,24	8,31±0,67	3,42±0,10	3,05±0,21			
Т66	23,88±1,52	20,89±1,87	8,01±0,61	4,99±0,07	2,04±0,14			
Тп5-мутант								
9-1	74,51±5,63	27,59±2,11	9,38±0,76	4,77±0,33	2,57±0,18			
Т21-2	11,87±1,06	15,38±1,38	11,06±0,73	4,55±0,32	3,47±0,24			
113	27,19±1,85	22,89±1,16	11,56±0,81	4,91±0,06	2,46±0,17			

тації рослин відмічено поступове зниження рівня зеатинрибозиду (див. табл. 3).

Високий вміст цього гормону на початкових етапах розвитку азотфіксувального апарату виявлено також під час визначення його пулу в бульбочках інокульованих рослин сої (табл. 4). На 28-му добу після появи сходів найвищий рівень зеатинрибозиду зафіксовано в корневих бульбочках, утворених як високоактивними Tn5-мутантами 9-1, T21-2, так і малоактивним 113. На 34-ту добу найбільший вміст зеатинрибозиду був у бульбочках сої, утворених високоактивним штамом 646 та його Tn5-мутантами, які переважали варіант із використанням штаму 604к.

У результаті проведених досліджень показано, що вміст цитокінінів (зеатину і зеатинрибозиду) в бульбочках набагато перевищував рівень цих гормонів у коренях рослин сої, що підтверджено даними різних авторів щодо вмісту зазначених фітогормонів у різних органах інших бобових рослин [12, 19].

Аналізом результатів стосовно рівня зеатинрибозиду в бульбочках сої виявлено чіткий негативний зв'язок цього показника з азотфіксувальною активністю симбіотичних систем сої та позитивний із вмістом у бульбочках активної форми цитокінінів — зеатину на 28-му добу після появи сходів (рис. 2, 3).

На 34-ту добу після появи сходів пул зеатинрибозиду порівняно з попередньо відібраними зразками зменшувався за одночасного зростання в симбіотичних системах сої рівня зеатину. Це очевидно обумовлено інтенсивним перетворенням зеатинрибозиду на активну форму у фазу бутонізації.

Отже, нами встановлено, що інокуляція насіння сої азотфіксувальними бактеріями *B. japonicum* супроводжується збільшенням пулу цитокінінів, зокрема зеатину й зеатинрибозиду, як у коренях, так і в корневих бульбочках на початкових етапах формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу. При цьому вміст цитокінінів у бульбочках був набагато вищим, ніж у коренях. Встановлено обернений зв'язок між вмістом зеатинрибозиду у бульбочках та

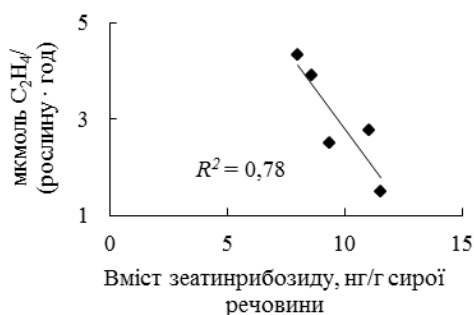


Рис. 2. Залежність між вмістом зеатинрибозиду в корневих бульбочках та азотфіксувальною активністю симбіотичних систем сої на 28-му добу після появи сходів

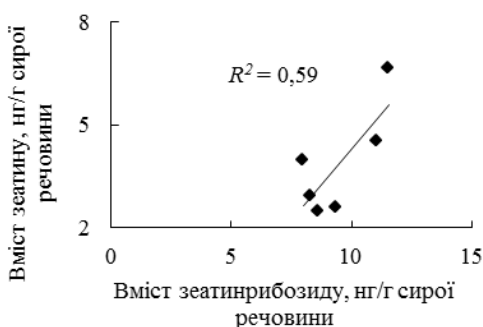


Рис. 3. Залежність між вмістом зеатинрибозиду та зеатину в бульбочках рослин сої, інокульованої різними за ефективністю штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* (28-ма доба після появи сходів)

азотфіксувальною активністю бульбочкових бактерій ( $R^2 = 0,78$ ) і прямий зв'язок між вмістом зеатинрибозиду й рівнем зеатину ( $R^2 = 0,59$ ) на 28-му добу після появи сходів.

1. Волкогон В.В., Волкогон М.В., Дімова С.Б. Рістстимульовальні мікроорганізми / Експериментальна ґрунтова мікробіологія / Ред. В.В. Волкогон. — К.: Аграрна наука, 2010. — С. 383—416.
2. Волкогон М.В., Маменко П.М., Коць С.Я. Баланс ІОК та зеатину в рослинах сої за інюкуляції насіння різними штамми й мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 5. — С. 408—416.
3. 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.
4. Дерфлинг У. Гормоны растений. Системный подход / Пер. с нем. Н.С. Гельман; Под ред. В.И. Кефели. — М.: Мир, 1985. — 304 с.
5. Коць С.Я., Волкогон М.В., Гришук О.О. Способность штаммов и Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* к синтезу ИУК и АБК in vitro // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — 42, № 6. — С. 491—496.
6. Коць С.Я., Моргул В.В., Патыка В.Ф. и др. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобийный симбиоз. — К.: Логос, 2010. — Т. 1. — 508 с.
7. 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.
8. Савинский С.В., Драгозов И.В., Педченко В.К. Определение зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Там же. — 1991. — 23, № 6. — С. 606—614.
9. Федорова Е.Э., Жизневская Г.Я., Альжаппарова Ж.К., Измайлов С.Ф. Фитогормоны в азотфиксирующих клубеньках бобовых растений // Там же. — № 5. — С. 426—438.
10. 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.
11. Arora N., Skoog F., Alien O.N. Kinetin-induced pseudonodules on tobacco roots // Amer. Bot. — 1959. — 46. — P. 610—613.
12. Badenoch-Jones J., Rolfe B.G., Letham D.S. Phytohormones, *Rhizobium* mutant, and nodulation in legumes: V. Cytokinin metabolism in effective and ineffective pea root nodules // Plant Physiol. — 1984. — 74. — P. 239—246.
13. 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.
14. Bauer W.D. Infection of legumes by rhizobia // Annu. Rev. Plant Physiol. — 1981. — 32. — P. 407—449.
15. 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.
16. 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, N 4. — P. 377—386.
17. Cooper J.B., Long S.R. Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion // Plant Cell. — 1994. — 6. — P. 215—225.
18. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria // Crit. Rev. Microbiol. — 1995. — 21, N 1. — P. 1—18.
19. Ferguson B.J., Mathesius U. Signaling interactions during nodule developmental // J. Plant Growth Regul. — 2003. — 22, N 1. — P. 47—72.
20. Gage D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperature legumes // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2004. — 68. — P. 280—300.
21. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. — 1968. — 43. — P. 1185—1207.
22. Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics // Annu. Rev. Genet. — 2003. — 37. — P. 3—29.
23. Libbenga K.R., Harkes P.A.A. Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum* L. // Planta. — 1973. — 114, N 1. — P. 17—29.



24. Libbenga K.R., van Iren F., Bogers R.J., Schraag-Lamers M.F. The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in *Pisum sativum* L. // Ibid. — P. 29—39.
25. Newcomb W., Syono K., Torrey J.G. Development of an ineffective pea root nodule: morphogenesis, fine structure, and cytokinin biosynthesis // Can. J. Bot. — 1976. — 55. — P. 1891—1907.
26. Relic B., Perret X., Estrada-Garcia M.T. et al. Nod factors of *Rhizobium* are the key to the legume door // Mol. Microbiol. — 1994. — 13. — P. 171—178.
27. Rodriguez-Barrueco C., Bermudez de Castro F. Cytokinin-induced pseudonodules on *Alnus glutinosa* // Physiol. Plant. — 1973. — 29. — P. 277—280.
28. 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.

Отримано 20.06.2012

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ФИТОГОРМОНОВ ЦИТОКИНИНОВОЙ ПРИРОДЫ В КОРНЯХ И КЛУБЕНЬКАХ СОИ НА РАННИХ ЭТАПАХ ФОРМИРОВАНИЯ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

Е.А. Грищук, С.Я. Коць, Н.В. Волкогон

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследована динамика содержания зеатина и зеатинрибозида в корнях и клубеньках растений сои *Glycine max* (L.) Merr., инокулированной штаммами и Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* с различными симбиотическими характеристиками. Показано, что инокуляция семян сои азотфиксирующими бактериями приводит к увеличению пула цитокининов в корнях и корневых клубеньках на начальных этапах формирования и функционирования бобово-ризобиального симбиоза. Установлена обратная зависимость азотфиксирующей активности ризобий-инокулянтов от содержания зеатинрибозида в клубеньках сои, а также прямая связь между содержанием зеатинрибозида и зеатина в клубеньках на 28-е сутки после появления всходов сои.

THE DYNAMICS OF CYTOKININS CONTENT IN ROOTS AND NODULES OF SOYBEAN ON THE EARLY STAGES OF LEGUME-RHIZOBIUM SYMBIOSIS FORMING

O.O. Gryshchuk, S.Ya. Kots, M.V. Volkogon

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

The dynamics of zeatin and zeatin-riboside content in roots and nodules of soybean plants inoculated with strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with various symbiotic characteristics were studied. It was shown that soybean seed inoculation by nitrogen fixing bacteria leads to the increase of cytokinins pool in roots and nodules on the early stages of formation and functioning of legume-rhizobial symbiotic systems. The reverse relationship of nitrogenase activity of rhizobia-inoculums with zeatin-riboside content in nodules of soybean and direct link between the zeatin-riboside content and zeatin content in nodules on 28 day after seedling emergence were revealed.

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