

УДК 576.851.155+547.857+543.9

БИОХИМИЯ

Академик АН ЛатвССР Р. А. КУКАЙН, А. Я. КЛИНЦАРЕ,
Д. Х. МУЦЕНИЕДЕ, В. П. ОШКАЯ

**ОБНАРУЖЕНИЕ ЦИТОКИНИНОВ ВО ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ФРАКЦИЯХ ПУРИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ RHIZOBIUM MELIOTI
DANGEARD**

Наряду с работами по обнаружению и изолированию цитокининов из растительного материала⁽¹⁾ в последнее время появились данные о содержании этих характерных для высших растений гормональных соединений в некоторых микроорганизмах — в отдельных видах фитопатогенных^(2, 3) и клубеньковых⁽⁴⁻⁶⁾ бактерий. Биохимия цитокининов клубеньковых бактерий вызывает особый интерес, так как эти микроорганизмы, осуществляя симбиоз с бобовыми растениями, участвуют в биологической фиксации атмосферного азота. Можно предполагать, что цитокинины клубеньковых бактерий играют определенную роль не только при инокуляции^(7, 8), но и в других стадиях симбиотического процесса. Однако вопросы об участии пуринов, особенно цитокининов, во взаимном обмене веществ между клубеньковыми бактериями и растением-хозяином до сих пор практически не исследовались.

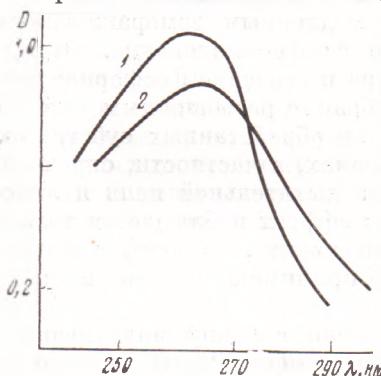


Рис. 1. У.-ф. спектры пуриновых соединений. 1 — соединение I,
2 — соединение II

Нами разрабатывается систематический анализ низкомолекулярных пуриновых соединений микроорганизмов^(9, 10) с последующей биологической проверкой цитокининовой активности обнаруженных веществ. Используя такой химико-биологи-

ческий подход в данной работе, мы пытались выяснить вопрос: не выделяет ли активный штамм K 785 клубеньковых бактерий люцерны при их выращивании в синтетической питательной среде экзоцеллюлярных производных пурина, обладающих цитокининовой активностью.

7,5 л центрифугата суспензии клубеньковых бактерий, которые выращивались 6 суток по методике⁽¹⁰⁾, концентрировали при pH 7,0 до 750 мл, подщелачивали аммиаком до pH 8,5 и экстрагировали *n*-бутанолом (800+500+300 мл), который отгонялся досуха. Остаток обрабатывали 50 мл 0,5*N* соляной кислотой, отфильтрованный раствор подщелачивали до pH 8,5 и экстрагировали *n*-бутанолом (50+25+25 мл). Остаток после отгонки *n*-бутанола растворяли в 0,5—1,5 мл диметилсульфоксида и разделяли восходящей хроматографией на бумаге в системе растворителей бутанол — аммиак — вода (3 : 1 : 1). Из участков хроматограмм, имеющих значения в пределах 0,15—0,25 и 0,45—0,60, вырезались пятна веществ (соответственно I и II), абсорбирующие у.-ф. свет и дающие положительную реакцию с нитратом серебра по Летхэмму⁽¹¹⁾, и элюировали кипящим этил-ацетатом для повторного хроматографирования на бумаге. Для характеристики соединений I и II в табл. 1 приведены их значения *R*, в нескольких системах растворителей.

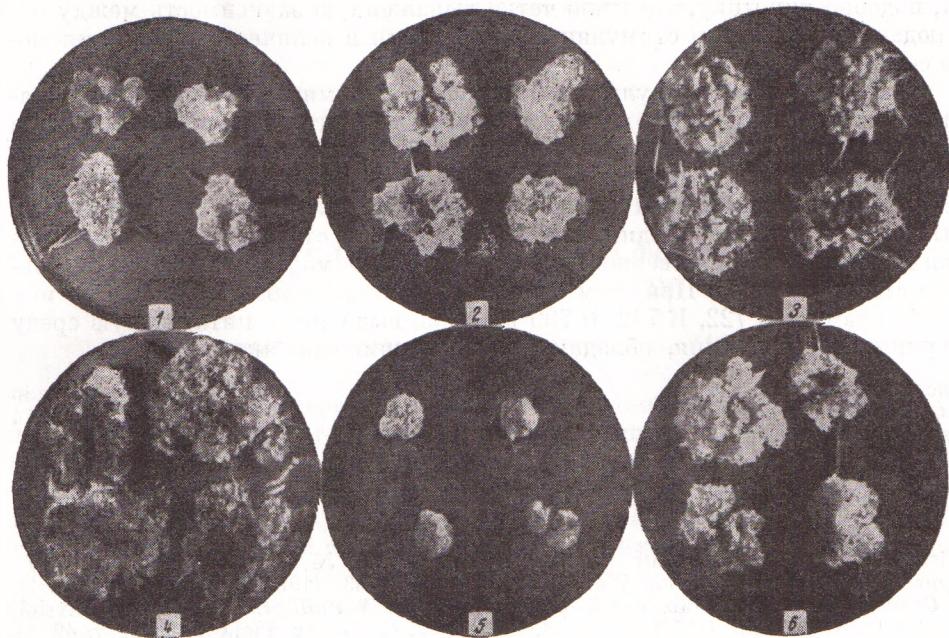


Рис. 2. Влияние различных количеств цитокинина (соединения II), изолированного из 2,5 л (1), 5,0 (2), 7,5 (3) и 15 л (4) среды роста штамма К 785 на рост каллюса. Контроль в отсутствие (5) и в присутствии (6) 25 мкг кинетина на 1 л

Вещества I и II на бумажных хроматограммах с реагентами Летхема (¹¹), Вуда (¹²), Драгендорфа (¹³), нитратом серебра и ванилином (¹⁴) или дихроматом натрия (¹⁵) и двуххлористой ртутью и эозином (¹⁶) давали характерные цветные реакции пуриновых соединений. В у.-ф. спектрах поглощения соединений, элюированных из пятен хроматограмм 0,1N соляной кислотой, имеются максимумы поглощения: I — при 262 и II — при 265 нм (рис. 1), которые также указывают на пуриновую природу этих соединений (¹⁷).

Цитокининовую активность обнаруженных пуриновых метаболитов I и II клубеньковых бактерий штамма K 785 проверяли специфическим биотестом на каллюсобразование сердцевинной ткани стебля табака (¹, ¹⁸). Использовали табак *Nicotiana tabacum* cv. «Bashi — Baghli — Samsun», вы-

Таблица 1
Значения R_f пуриновых соединений

Системы растворителей	Значение R_f соединений	
	I	II
n-Бутанол — аммиак — вода (3 : 1 : 1)	0,26	0,55
n-Бутанол, насыщенный водой	0,33	0,72
Изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2)	0,41	0,62
Вода	—	0,45

размножение каллюса проводили в чашках Петри. Испытуемые соединения прибавляли к питательной среде (¹⁹) тканевых культур перед ее автоклавированием в виде вырезанных из хроматограмм пятен I и II.

Оказалось, что соединение I не проявляет цитокининовую активность, но под влиянием соединения II наблюдалось увеличение веса и размеров каллюса сердцевинной ткани табака по сравнению с контролем (рост тканей в отсутствие и присутствии кинетина) (рис. 2). Пуриновое соединение

II, подобно кинетину, показало четко выраженную зависимость между наблюдаемым эффектом стимуляции роста ткани и количеством применяемого соединения.

Таким образом, в результате проведенного химико-биологического анализа можно сделать вывод, что клубеньковые бактерии люцерны штамма K 785 во время роста выделяют в среду их культивирования два пуриновых соединения, одно из которых (II) является цитокинином. По вышеописанной схеме анализа был исследован ряд других культур на их способность выделять пуриновые соединения. В зависимости от физиологического-биохимических особенностей проверяемых штаммов были модифицированы отдельные стадии анализа. При этом нами было установлено, что *Rhizobium meliloti*, штаммы K 722, K 742, K 799 и M 633, выделяет в питательную среду пуриновые соединения, обладающие цитокининовой активностью.

Институт микробиологии
им. Августа Кирхенштейна
Академии наук ЛатвССР
Рига

Поступило
6 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. Skoog, R. Y. Schmitz, Plant Physiol., v. 6B, N. Y., 1972, p. 181. ² D. Klämbt, Wiss. Zs. Univ. Rostock, Math.-Naturwiss. Reihe, B. 16, № 4/5, 623 (1967). ³ C. D. Upper, J. P. Helgeson et al., Plant Physiol., v. 45, 543 (1970). ⁴ M. Giannattasio, S. Coppola, Giorn. Bot. Ital., v. 103, 11 (1969). ⁵ D. A. Phillips, J. G. Torrey, Physiol. plantarum, v. 23, 1057 (1970). ⁶ D. A. Phillips, J. G. Torrey, Plant Physiol., v. 49, 11 (1972). ⁷ T. A. Lie, Nodulation of Leguminous Plants, Wageningen, 1964, p. 26. ⁸ B. И. Сабельникова, А. С. Жижина, М. М. Волоскова, Изв. АН МолдССР, сер. биол. и хим. наук, № 3, 48 (1971). ⁹ Б. П. Ошкая, Д. Х. Муценеце и др., Изв. АН ЛатвССР, № 9, 107 (1972). ¹⁰ Б. П. Ошкая, Д. Х. Муценеце и др., Изв. АН ЛатвССР, № 5, 81 (1973). ¹¹ D. S. Letham, J. Chromatogr., v. 20, 184 (1965). ¹² T. Wood, Nature, v. 176, 175 (1955). ¹³ E. Tyihak, J. Chromatogr., v. 14, 125 (1964). ¹⁴ M. E. Wright, D. G. Satchell, J. Chromatogr., v. 55, 413 (1971). ¹⁵ M. Reguera, J. Asimov, J. Am. Chem. Soc., v. 72, 5781 (1950). ¹⁶ H. Descimon, Bull. Soc. chim. Biol., v. 49, 452 (1967). ¹⁷ А. Гиллем, Е. Штерн, Электронные спектры поглощения органических соединений, ИЛ, 1957, стр. 194. ¹⁸ C. O. Miller, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, B. 6, Berlin, 1963, S. 194. ¹⁹ E. M. Linsmaier, F. Skoog, Physiol. Plant., v. 18, 100 (1963).