

# **АКТИВНІСТЬ ОКИСНО-ВІДНОВНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА БІЛКОВИЙ СКЛАД КОРЕНІВ СОЇ НА РАННІХ ЕТАПАХ ФОРМУВАННЯ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМ.**

**Г.М. ДРОЗДЕНКО<sup>1</sup>, П.М. МАМЕНКО<sup>2</sup>, ЖЕМОЙДА А.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Уманський державний педагогічний університет ім. П.Г. Тичини 20300 Умань, вул. Садова, 2

<sup>2</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України 03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Симбіотична взаємодія між бобовими рослинами і бульбочковими бактеріями є складним фізіологічним процесом, який регулюється системою сигналіngu між макро- і мікросимбіонтами.

Аналогічно патогенезу інвазія ризобій у клітини корневих волосків бобових викликає інтенсифікацію окислювальних процесів у рослинних клітинах, що супроводжується підвищенням вмісту активних форм кисню, які, у свою чергу, суттєво впливають на проникнення бактерій у рослинні тканини. На думку ряду авторів окислювальний «вибух» на початкових стадіях формування бобово-ризобіального симбіозу може виконувати двояку роль: гальмування захисних реакцій організму при проникненні ризобій, чи, навпаки, активація механізму захисту при несприятливих умовах для симбіозу.

Формування бобово-ризобіального симбіозу також супроводжується трансформацією партнерами симбіозу власних фізіолого-біохімічних процесів метаболізму, і, в першу чергу, складу протеїнів відповідно до потреб взаємовигідного співіснування.

Отже, фізіологічна взаємодія партнерів симбіозу активізує каскад біохімічних реакцій, спрямованих на подолання захисних реакцій рослинного організму на інвазію бактерій та формування ефективних механізмів обміну метаболітами між макро- і мікросимбіонтами.

Разом із тим питання впливу ризобій із різноманітними симбіотичними властивостями на характер фізіологічної відповіді рослини-хазяїна на інокуляцію та особливості формування симбіотичних систем залишається маловивченим.

Таким чином, метою нашої роботи було дослідження активності окисно-відновних ферментів та складу протеїнів коренів сої за інокуляції штамми і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* із контрастними симбіотичними властивостями.

У роботі використано активний (646) та неактивний (604к) штами *B. japonicum* із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ НАНУ), а також Tn5-мутанти штаму 646 – активні 9-1 і 21-2 та малоактивні 107 та 113, отримані методом транспозонового мутагенезу у відділі симбіотичної азотфіксації ІФРГ.

Під час дослідження азотфіксувальної активності (АФА) симбіотичних

систем сої нами було відмічено, що до 15-ї доби після появи сходів АФА була повністю відсутня. Симбіотичні системи сформовані ефективними штамми та Tn5-мутантами починали фіксувати атмосферний азот на 18 добу після появи сходів. У цей час у варіантах з інокуляцією активними штамом 646 та Tn5-мутантами *V. japonicum* 9-1 та 21-2 було відзначено незначну АФА, яка продовжувала зростати, і на 23-тю добу становила 0,28, 0,30 і 0,32 мкмоль  $C_2H_4$ /(рослину×год) відповідно. На 25 добу зазначені штам і Tn5-мутанти в симбіозі з рослинами сої суттєво відрізнялися за рівнем АФА при цьому значно (в 5–20 разів) перевищували за цим показником малоактивні Tn5-мутанти 107 і 113.

Дослідження активності гваяколпероксидази (ГП) у коренях рослин сої показало, що активність даного ферменту у всіх без винятку варіантах, де застосовували інокуляцію рослин, була вищою порівняно із контролем (без інокуляції). Підвищення рівня активності ГП у коренях бактеризованих рослин було відмічено вже на 15-ту добу після появи сходів. У цей період активність ГП у коренях сої, інокульованої Tn5-мутантом 21-2, була найвищою, що можна пояснити формуванням удвічі більшої кількості бульбочок, порівняно із іншими інокульованими варіантами. Варто зауважити, що у даному варіанті процес формування симбіотичного апарату на наступних фазах розвитку симбіозу сповільнювався. Відзначений на початкових етапах тісний зв'язок між рівнем ГП та вірулентністю штамів було підтверджено і надалі. Так, у штамів 604к і 646 та малоактивних Tn5-мутантів 107 і 113 максимальне зростання рівня ГП спостерігалось на 18-ту, а у Tn5-мутанта 9-1 – на 23-тю добу, що прямо корелювало з їх нодуляційною активністю ( $r = 0,83$ ) протягом цього періоду. На 25-ту добу відзначали зменшення інтенсивності бульбочкоутворення, а також зниження і рівня ГП. Саме завдяки такій особливості гваяколпероксидаза регулює вміст гормону, що відіграє важливу роль при формуванні симбіотичних систем. Отже, активність ГП не залежала від азотфіксувальної активності мікросимбіонта, проте за динамікою співпадала з формуванням бульбочок на коренях сої, що може свідчити про зв'язок нодуляційної активності штаму-інокулянта з активністю даного фермента.

Динаміка активності аскорбатпероксидази (АП) мала дещо інший характер. Так, суттєві відмінності за активністю даного фермента між різними варіантами спостерігали лише з 18-ої доби після появи сходів, тобто з моменту, коли відзначено початок фіксації атмосферного азоту симбіотичними системами соя – *V. japonicum*. Найвищу активність АП спостерігали у коренях рослин, інокульованих активними штамом та транспозоновими мутантами. На 23 та 25 доби рівень АП у цих варіантах перевищував контроль та варіанти із застосуванням неактивного штаму *V. japonicum* 604к, а також малоактивних Tn5-мутантів 107 і 113 в 4–6 та 1,5–2 рази, відповідно. Відмічено прямий зв'язок між активністю АП та нітрогенази на 23-тю ( $r = 0,92$ ) та 25-ту ( $r = 0,98$ ) доби після появи сходів.

При аналізі гелів електрофоретичного розділення білкових екстрактів коренів із бульбочками сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами різної

активності, нами не було відзначено значних відмінностей у якісному і кількісному складі отриманих білкових екстрактів у період формування симбіотичної системи і за відсутності у неї азотфіксувальної активності.

Із-поміж усіх досліджуваних зразків відрізнявся лише варіант без інокуляції. На 12-ту добу після появи сходів вміст низькомолекулярних білків у діапазоні від 10 до 40 кД був значно нижчим, порівняно з вмістом протеїнів у коренях інфікованих рослин.

Різниця у кількісному складі білків на початку інфекційного процесу в варіанті без інокуляції порівняно з інокульованими варіантами свідчить про те, що початок інфікування у всіх інокульованих рослин супроводжується активним синтезом низькомолекулярних протеїнів, які, ймовірно, відповідають за регулювання нодуляційного процесу. У коренях 21-добових рослин сої, інфікованої активними штамом 646 та Tn5-мутантами 9-1 та 21-2, нами відмічено значне зростання загального вмісту білка. У даний період симбіотичні системи, сформовані цими ризобіями, найбільш активно фіксували азот. Незначне збільшення загального білка відзначене у коренях рослин, інокульованих малоактивними Tn5-мутантами 107 та 113 та неактивним штамом 604к. Також у всіх варіантах з інокуляцією ми спостерігали збільшення вмісту поліпептиду із молекулярною масою 15 кД, незалежно від активності мікросимбіонта. Вміст даного поліпептиду у варіанті без інокуляції не змінювався, порівняно із 12-ти добою і був значно меншим, ніж у коренях інокульованих рослин.

На нашу думку однією з причин відсутності відмінностей у якісному і кількісному складі білків коренів сої, інокульованої штамми і Tn5-мутантами *V. japonicum* різної ефективності, на 12-ту добу після появи сходів є ідентичний перебіг фізіологічних процесів, пов'язаних із формуванням симбіотичної системи. Значне збільшення вмісту протеїнів у коренях сої на 21-шу добу за інокуляції активними ризобіями ймовірно є наслідком активного синтезу білків, відповідальних за роботу нітрогеназного комплексу.

Таким чином, інокуляція рослин сприяє суттєвому підвищенню активності ГП, яка, будучи високою на етапі утворення симбіозу, знижується із завершенням його формування. Рівень активності цього фермента залежить від нодуляційної активності мікросимбіонта. Із початком азотфіксації у коренях рослин сої активується робота АП, активність якої в подальшому корелює з інтенсивністю роботи азотфіксувального апарату.

Інокуляція рослин викликає експресію генів і активний синтез протеїнів, відповідальних за формування симбіозу. При цьому даний процес не залежить від симбіотичних властивостей мікроорганізмів. Лише активізація функціонування азотфіксуючого апарату спричинює збільшення загального вмісту протеїнів у коренях рослин, інфікованих активними ризобіями. Отримані результати можуть свідчити про схожість фізіологічної відповіді рослини-хазяїна на інокуляцію мікроорганізмами, що відрізняються за симбіотичними властивостями, в період формування симбіотичних систем.