

УДК 581.557:579.22

ВПЛИВ ПОСУХИ НА ВМІСТ РОЗЧИННОГО БІЛКА В КОРЕНЯХ СОЇ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ ШТАМАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* З РІЗНИМИ СИМБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Ю.Ю. КОНДРАТЮК, О.Р. РИБАЧЕНКО, П.М. МАМЕНКО, С.Я. КОЦЬ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: kondratyuk_yulya@ukr.net*

Досліджено особливості кількісного вмісту білків у коренях сої, інокульованої штамми *Bradyrhizobium japonicum* з різними симбіотичними характеристиками, за умов ґрунтової посухи. Показано, що властивості ризобій опосередковано впливають на масу коренів, кількість розчинного білка в коренях сої та процеси відновлення після дії посухи. У коренях сої, інокульованої активним штамом ризобій, вміст білка після відновлення поливу зростає більшою мірою, ніж у контрольних варіантах та при застосуванні неактивного штаму. Ймовірно, утворені на коренях симбіотичні структури сприяють швидшому відновленню інтенсивності процесу біосинтезу білка в разі повернення до оптимального водного режиму.

Ключові слова: Glycine max (L.) Merr., Bradyrhizobium japonicum, мікробно-рослинний симбіоз, азотфіксація, білки, посуха.

Процес симбіотичної фіксації азоту особливо чутливий до змін умов навколишнього середовища, зокрема таких, як дефіцит вологи, недостатнє освітлення, низькі та високі температури, засолення, вміст у ґрунті елементів мінерального живлення тощо [7, 8, 16]. Посуха, у свою чергу — один з абіотичних чинників довкілля, що найбільше впливає на сільськогосподарське виробництво і може призводити до втрат значної частини врожаю культурних рослин та зниження його якості [12, 14].

У рослинному організмі нестача води запускає каскад регуляторних процесів, які зумовлюють зміни експресії генів і метаболізму рослин, наслідком чого є формування адаптивних реакцій рослин за несприятливих умов [10, 13]. Симбіотична фіксація азоту — фізіологічний процес бобових рослин, який одним із перших піддається адаптивним змінам у бульбочках під час посухи [15, 17].

Протеом клітини як динамічний об'єкт зазнає істотного впливу посухи, реагує змінами кількості та складу білків, які на тих чи інших етапах можуть залучатися до каскаду адаптивних реакцій і подолання негативних наслідків дії стресового чинника [4]. Відбувається синтез як неспецифічних білкових молекул, властивих різним організмам незалежно від характеру стресора, так і специфічних, які утворюються лише в певних органах чи за дії певного шкодочинного агента. Процеси формування відповіді рослин на стрес і з'ясування ролі білків у забезпеченні їх стійкості — відкрите питання, відповідь на яке має як теоретичне, так і практичне значення. Разом із тим молекулярні механізми впливу недо-

статнього зволоження ґрунту й адаптації до нього азотфіксувальних систем на сьогодні залишаються нерозкритими, чим зумовлена важливість досліджень білкових профілів різних тканин і симбіотичних утворень бобових рослин за дії на них посухи.

Метою нашої роботи було дослідження змін вмісту білків у коренях сої, інокульованої штамами *B. japonicum* із різними симбіотичними властивостями, в умовах водного стресу.

Методика

Вегетаційні досліди проводили на майданчику Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Рослини сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Васильківська вирощували у піщаній культурі у 14-кілограмових посудинах Вагнера (на промитому річковому піску вологістю 30 і 60 % ПВ) за природних освітлення, температури та вологості повітря. Джерелом мінерального живлення слугувала суміш Гельригеля [1], що містила 0,25 норми азоту.

Насіння сої перед посівом стерилізували 70 %-м етанолом, промивали в проточній воді та інокульовали штамами *Bradyrhizobium japonicum* із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, що різнилися за симбіотичними характеристиками: штам 646 — вірулентний високоактивний та штам 604к — високовірулентний неактивний. Інкубували насіння з бактеріями протягом 1 год. Контролем слугували рослини без інокуляції.

Для проведення досліджень зразки коренів і бульбочок сої відбирали упродовж вегетації у фази бутонізації, початку цвітіння та масового цвітіння рослин. Посуху створювали після першого відбору зразків зменшенням поливу рослин до вологості субстрату 30 % і відновлювали оптимальний полив до 60 % після другого відбору зразків. Відібрані зразки коренів та бульбочок заморожували в рідкому азоті, розтирали до порошкоподібного стану і зберігали до використання. Для отримання білкових екстрактів наважки коренів ресуспендували в буфері, що містив 0,175 М *трис*-HCl, 5 % додецилсульфату натрію, 15 % гліцерину, 0,3 М дитіотриетолу [3]. Білки екстрагували протягом 1 год за 4 °С й осаджували протягом 1 год за –20 °С із чотирма об'ємами попередньо охолодженого ацетону. Осад двічі промивали попередньо охолодженим 80 %-м ацетоном. Отримані білкові осадки підсушували і розчиняли в 30 мМ *трис*-HCl (рН 8,5).

Концентрацію сумарного білка в екстрактах визначали за методом Бредфорда [11].

Усі дослідження проводили в п'яти повтореннях. Статистичний аналіз даних виконано за допомогою пакета Statistica 7.0. Вірогідність різниці між контрольними й дослідними варіантами оцінено за *t*-критерієм Стьюдента ($p \leq 0,05$). На рисунку наведено усереднені дані зі стандартним відхиленням.

Результати та обговорення

Водний дефіцит у рослинах спричинюють погіршення забезпечення водою коренів, висока інтенсивність транспірації, дія високих і низьких температур, ушкодження рослин шкідниками та хворобами, надмірна інсоляція, засолення. Корінь — перший орган рослинного організму,

який зазнає негативного впливу ґрунтової посухи. Вважають, що у відповідь на зміну водного потенціалу середовища корені індукують хімічний і гідравлічний стресові сигнали, а також здатні рости у напрямку до води [2]. За помірної нестачі субстратної вологи наростає коренева маса, що забезпечує інтенсивніше вбирання води коренем рослини унаслідок збільшення площі поглинання [6].

Ми дослідили показники наростання маси коренів сої, інокульованої активним і неактивним штамами *V. japonicum*, за умов водного стресу. Вивчення динаміки росту кореневої системи (таблиця) показало, що до початку дії водного стресу у фазу бутонізації рослини всіх інокульованих варіантів мали більшу кореневу масу порівняно з контрольними, причому ці показники певною мірою залежали від симбіотичних властивостей штаму-інокулянта.

Разом із тим результати підтвердили, що посуха чинить негативний ефект як на рослини сої контрольних варіантів, так і інокульованих ризобіями. Водночас рослини, інокульовані активним штамом ризобій, мали найбільшу кореневу масу за обох варіантів водозабезпечення. Після відновлення оптимального водного режиму спостерігали швидкий приріст кореневої маси рослин, що зазнавали дії посухи у фазу масового цвітіння сої, причому інокуляція насіння активним штамом ризобій сприяла тому, що показники маси коренів цих рослин (6,84 г/рослину) практично виходили на рівень рослин, вирощених за оптимальних умов (6,88 г/рослину).

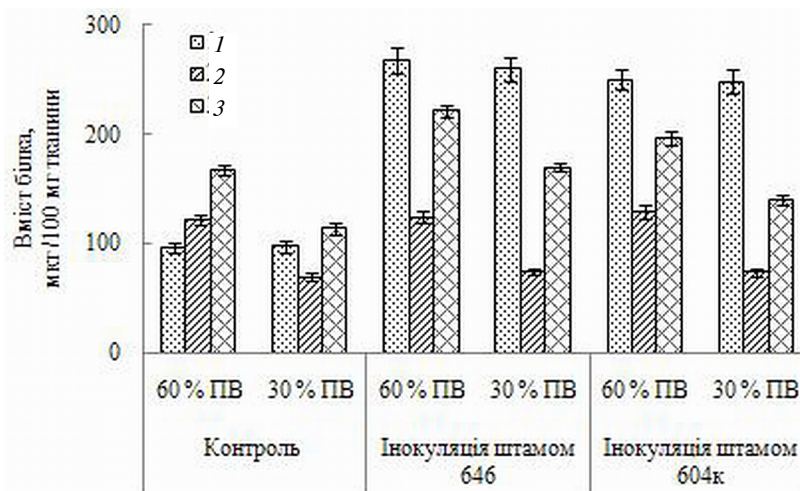
Білкові компоненти загальних механізмів адаптаційних процесів у коренях сої, задіяні в шляхах передачі сигналів, вуглеводному обміні, метаболізмі амінокислот, синтезі стресових молекул тощо, на сьогодні недостатньо досліджені, оскільки вчені більшу увагу приділяли вивченню змін фізіологічних і метаболічних процесів у листках [9]. Тому ми проаналізували зміни вмісту білків у коренях сої, інокульованої штамми *V. japonicum* із різними симбіотичними властивостями, за недостатнього водозабезпечення (30 % ПВ).

Аналізом білкових препаратів коренів сої, інокульованої активним і неактивним штамми *V. japonicum*, виявлено істотні зміни кількості сумарного білка у зразках за дії на рослини посухи (рисунок).

Як видно з рисунка, загалом препарати коренів характеризувались більшим вмістом сумарного білка за інокуляції рослин ризобіями незалежно від їх активності. Проте зміни кількості білка у зразках коренів

Динаміка наростання маси кореня рослин сої, інокульованої штамми V. japonicum із різними симбіотичними характеристиками, за умов різного водозабезпечення

Варіант	Водозабезпечення, % ПВ	Маса кореня, г/рослину		
		Фаза розвитку		
		Бутонізація	Початок цвітіння	Масове цвітіння
Контроль	60	4,20±0,09	5,34±0,14	7,11±0,68
	30	–	4,49±0,01	6,17±0,41
Інокуляція <i>V. japonicum</i> 646	60	4,78±0,21	5,82±0,16	6,88±0,20
	30	–	5,31±0,17	6,84±0,09
Інокуляція <i>V. japonicum</i> 604к	60	4,67±0,19	5,67±0,09	6,87±0,39
	30	–	4,50±0,17	6,22±0,38



Динаміка вмісту розчинного білка в коренях сої, інокульованої штамми *B. japonicum* із різними симбіотичними властивостями, за різного водозабезпечення:

1 — фаза бутонізації; 2 — фаза початку цвітіння; 3 — фаза масового цвітіння

контрольного й інокульованих варіантів за оптимального водозабезпечення різнились, що може бути пов'язано як із симбіотичними процесами, так і з загальною реакцією рослин на дію короточасного стресу (ризобіальна інфекція), що характеризується індукцією синтезу стресових, адаптивних та окремих білків, які утворюються в нормі, на фоні пригнічення тотального синтезу білка [5]. Так, у коренях рослин контрольного варіанта спостерігалась тенденція до поступового збільшення кількості сумарного білка протягом усього досліджуваного періоду їх росту. Водночас зразки коренів усіх бактеризованих рослин у фазу бутонізації характеризувались більш як удвічі вищим вмістом білка порівняно з рослинами контрольного варіанта. Ймовірно, це пов'язано з інтенсифікацією біосинтезу білка, зумовленою процесами формування азотфіксувального апарату на коренях сої. Стабілізація процесу пристосування рослин і бактерій спричинювала зменшення кількості розчинного білка в кореневих екстрактах на початку цвітіння рослин за інокуляції ризобіями до рівня контролю. Біогенний азот, що утворюється в процесі симбіотичної фіксації, є чинником, який істотно стимулює подальший приріст білка у коренях бактеризованих рослин на відміну від контрольних, які окрім обмеженого запасу внесеного азоту не мають його альтернативного джерела і характеризуються значно меншим збільшенням вмісту білка у фазу масового цвітіння рослин.

Разом із тим наслідки впливу посушливих умов були однаковими для всіх варіантів досліджених рослин незалежно від їх інокуляції. Нестача вологи в субстраті спричинювала стрімке зниження загального вмісту білка в коренях сої, яка потерпала від дефіциту доступної води, причому в коренях рослин контрольного варіанта і рослин, бактеризованих неактивним штамом, кількість білка зменшувалась приблизно на 42 %, а в коренях сої, інокульованої активним штамом 646 — на 40 % (відносно цієї ж фази росту рослин за оптимального водозабезпечення).

Відновлення поливу сприяло відновленню біосинтетичних процесів, унаслідок чого кількість сумарного білка в зразках коренів рослин контрольного варіанта збільшувалась на 63 %, рослин, інокульованих актив-

ним штамом — на 127, неактивним штамом — на 89 %, тобто стрімкіше відновлення біосинтетичних процесів у коренях інокульованої сої може свідчити про позитивний вплив ризобіальної інфекції взагалі й інокуляції активним штамом *B. japonicum* зокрема на рослини сої, що зазнають впливу посухи.

Отже, симбіотичні характеристики ризобій опосередковано впливають на показники маси коренів: інокуляція насіння сої активним штамом ризобій сприяла найінтенсивнішому приросту кореневої системи і забезпечувала найшвидше відновлення до показників за оптимальних умов після відновлення поливу.

Вміст сумарного білка в коренях рослин, інокульованих штамми ризобій, також певною мірою залежав від симбіотичних властивостей штаму-інокулянта, а дефіцит вологи призводив до зниження загального вмісту білка у коренях сої як контрольного, так і інокульованих варіантів. Разом з тим утворення симбіотичних структур на коренях сої дещо ослаблювало негативні наслідки нестачі вологи та сприяло швидшому відновленню інтенсивності процесу біосинтезу білка після відновлення поливу, особливо в разі застосування активного штаму ризобій.

1. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1973. — 591 с.
2. Жук О.І. Формування адаптивної відповіді рослин на дефіцит води // Физиология и биохимия культ. растений. — 2011. — 43, № 1. — С. 26–37.
3. Кондратюк Ю.Ю., Маменко П.М., Левішко А.С. та ін. Порівняльний аналіз методів екстракції та розділення білків для протеомного дослідження білкових профілів коренів та бульбочок сої // Там само. — 2013. — 45, № 3. — С. 222–229.
4. Косаківська І.В., Блюма Д.А., Устінова А.Ю., Деміревська К. Вплив температурних стресів на кількісні та якісні характеристики білків ріпаку *Brassica napus* var. *oleifera* // Там само. — 2011. — 43, № 6. — С. 492–497.
5. Косаковская И.В. Стрессовые белки растений. — Киев: Укрфитосоциол. центр, 2008. — 154 с.
6. Коць С.Я., Михалків Л.М. Физиология симбиоза та азотне живлення люцерни. — К.: Логос, 2005. — 300 с.
7. Коць С.Я., Моргул В.В., Тихонович И.А. и др. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобийный симбиоз. — Киев: Логос, 2011. — Т. 1. — 404 с.
8. Петриченко В.Ф., Коць С.Я. Симбіотичні системи у сучасному сільськогосподарському виробництві // Вісн. НАН України. — 2014. — № 3. — С. 57–66.
9. Alam I., Sharmin S.A., Kim K.-H. et al. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress // Plant Soil. — 2010. — 333. — P. 491–505.
10. Boyer J.S. Plant productivity and environment // Science. — 1982. — 218, N 4571. — P. 443–448.
11. Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248–254.
12. Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell // Ann. Bot. — 2009. — 103, N 4. — P. 551–560.
13. Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant // Funct. Plant Biol. — 2003. — 30. — P. 239–264.
14. Gil-Quintana E., Larrainzar E., Seminario A. et al. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean // J. Exp. Bot. — 2013. — 64, N 8. — P. 2171–2182.
15. Sinclair T.R., Serraj R. Legume nitrogen fixation and drought // Nature. — 1995. — 378. — P. 334–344.
16. Udvardi M., Poole P.S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses // Annu. Rev. Plant Biol. — 2013. — 64. — P. 781–805.
17. Valentine A.J., Bebedito V.A., Kang Y. Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: from physiology to genomics and beyond // Annu. Plant Rev. — 2011. — 42. — P. 207–248.

Отримано 30.06.2015

ВЛИЯНИЕ ЗАСУХИ НА СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМОГО БЕЛКА В КОРНЯХ СОИ, ИНОКУЛИРОВАННОЙ ШТАММАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* С РАЗЛИЧНЫМИ СИМБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Ю.Ю. Кондратюк, А.Р. Рыбаченко, П.Н. Маменко, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследованы особенности количественного содержания белков в корнях сои, инокулированной штаммами *Bradyrhizobium japonicum* с различными симбиотическими характеристиками, в условиях почвенной засухи. Показано, что свойства ризобий опосредованно влияют на массу корней, количество растворимого белка в корнях сои и процессы восстановления после действия засухи. В корнях сои, инокулированной активным штаммом ризобий, после восстановления полива содержание белка возрастало в большей степени, чем в контрольных вариантах и при использовании неактивного штамма. Вероятно, образованные на корнях симбиотические структуры способствуют более быстрому восстановлению интенсивности процесса биосинтеза белка при возвращении к оптимальному водному режиму.

THE INFLUENCE OF DROUGHT ON THE PROTEIN CONTENT OF SOYBEAN ROOTS UNDER INOCULATION BY *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS WITH DIFFERENT EFFECTIVENESS

Iu.Iu. Kondratiuk, O.R. Rybachenko, P.M. Mamenko, S.Ya. Kots

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

The after rewatering peculiarities of protein content of soybean roots under inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains with different effectiveness under drought conditions was analyzed. It was shown that the properties of rhizobia have an indirect influence on the root mass, quantity of soluble protein and on the processes of recovery after drought stress. The protein content increased after rewatering more rapidly in roots of soybean inoculated by active strain of rhizobia than in the control and inactive variant. Probably symbiotic structures formed on the roots contribute to more rapid recovery of the protein synthesis process under returning to optimal water regime.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, microbe-plant symbiosis, nitrogen fixation, protein, drought.