

ВПЛИВ СИНТЕТИЧНОГО ПОЛІСАХАРИДУ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ СИМБІОЗУ ТА АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ Й КАТАЛАЗИ У РОСЛИН ГОРОХУ І СОЇ

Кругова О.Д., Мандровська Н.М., Коць С.Я.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська 31/17, м. Київ, 03022, Україна

Досліджували вплив синтетичного полісахариду МОД-19 на ефективність симбіотичної азотфіксації у рослин гороху і сої, а також на активність ферментів антиоксидантної системи захисту – пероксидази і каталази.

*Показано, що в рослинах гороху і сої, вирощених з насіння, обробленого перед посівом бульбочковими бактеріями (горох – *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263 б, соя – *Bradyrhizobium japonicum* 634 б) та неспецифічним для цих бобових культур синтетичним полісахаридом МОД-19, спостерігається посилення процесів метаболізму, про що свідчать зміни морфологічних і функціональних показників симбіотичних систем: збільшуються біомаса рослин і кількість корневих бульбочок, подовжується період активного функціонування бульбочок за рахунок їх вторинного утворення на бокових коренях та підвищується азотфіксувальна активність. У цих рослин, крім того, зростає рівень активності окислювально-відновних ферментів – пероксидази і каталази.*

Ключові слова: симбіоз, бульбочкові бактерії, горох, соя, синтетичний полісахарид, пероксидаза, каталаза

У практиці сучасного рослинництва дедалі більшого поширення набувають аналоги фітогормонів – фізіологічно активні речовини синтетичного і природного походження, які успішно використовуються як регулятори росту для підвищення врожайності рослин та покращення якості продукції рослинництва. Специфічними ефекторами здатні виступати полісахариди бульбочкових бактерій, які впливають на генетичний апарат симбіонтів, виконуючи роль сигнальних молекул ініціації симбіозу [12]. Можливо, під дією саме цих речовин у процесі морфогенезу бульбочок відбувається активація ряду рослинних генів, які “мовчать” у коренях неінокульованих бактеріями рослин.

Гормональне регулювання симбіотичної азотфіксації є важливою і разом з тим малодослідженою проблемою. Вивчення цих процесів дасть можливість краще зрозуміти механізми таких ключових етапів симбіозу, як формування, функціонування і старіння корневих бульбочок бобових рослин, та цілеспрямовано регулювати означені процеси. Однак до останнього часу питання про механізми регуляції, що забезпечують взаємодію партнерів симбіозу, залишається відкритим.

Однією з важливих складових відповіді рослинних клітин на зовнішні стресові впливи, такі, зокрема, як процес інфікування бульбочковими бактеріями бобових рослин, є продукування активних форм кисню. Внутрішньоклітинний вміст радикалів кисню перебуває під багаторівневим контролем антиоксидантної системи захисту, яка включає в себе, зокрема, ферменти – пероксидазу і каталазу [5-7, 10, 16]. Як недавно стало відомо, перекис водню може брати участь у передачі сигналу в момент розвитку окислювального стресу і таким чином індукувати гени цитозольної пероксидази [11, 14].

Раніше ми встановили зміни інтенсивності фізіологічних процесів у бобових рослин за екзогенної обробки останніх біологічно активними речовинами як природного походження [1, 3], так і синтетичними [2]. Так, було показано, що при сумісній обробці проростків гороху активним штамом бульбочкових бактерій і синтетичним полісахаридом МОД-19 підвищується ефективність симбіозу за рахунок утворення більшої кількості бічних коренів [4]. Це дало нам підставу припустити, що полісахариди неризобіального походження, як і глікополімери ризобій, здатні імітувати дію фітогормонів і впливати на формування і функціонування симбіозу.

Метою даної роботи стало дослідження активності ферментів антиоксидантної системи захисту – пероксидази і каталази – в рослинах гороху і сої під впливом полісахариду неризобіального походження МОД-19 та зв'язку між цими процесами та ефективністю симбіозу.

Матеріали і методи. Стерильне насіння гороху сорту Витязь та сої сорту Мар'яна інокулювали перед посівом суспензією бульбочкових бактерій з титром 10^7 - 10^8 клітин: гороху – *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263 б, сої – *Bradyrhizobium japonicum* 634 б. Насіння бобових після одноденної експозиції з бульбочковими бактеріями перед посівом обробляли також 3 %-

ним розчином синтетичного полісахариду МОД-19, синтезованого співробітником Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ П.Г. Дульневим [17].

Рослини вирощували з додаванням до ґрунту (чорнозем опідзолений) поживної суміші Гельрігеля із 0,25 норми мінерального азоту (сіль $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$). Схеми вегетаційних дослідів включали в себе варіанти вирощування рослин із застосуванням інокуляції і без неї, з обробкою полісахаридом МОД-19, а також з сумісною обробкою бульбочковими бактеріями і полісахаридом.

Вплив полісахариду та бактеризації на фізіологічні процеси в рослинах гороху і сої оцінювали за показниками ефективності симбіотичної азотфіксації, кількістю корневих бульбочок на головному і бічних коренях, нітрогеназною активністю (за відновленням ацетилену), а також за показниками накопичення надземної маси. Сумісну дію полісахариду МОД-19 та бульбочкових бактерій на окисно-відновні процеси у листі, корінні та бульбочках рослин гороху і сої оцінювали за показниками активності в цих органах пероксидази і каталази.

Активність пероксидази визначали з гваяколом з урахуванням рекомендацій, розроблених для бобових культур [15]. Інтенсивність рожевого забарвлення вимірювали при 440 нм через 15 хв після додавання перекису водню. Активність пероксидази виражали в мікромолях окисленого гваяколу на 1 г маси сирої речовини листків, коренів та бульбочок.

Каталазну активність у корневих бульбочках, листі та корінні в різні фази онтогенезу рослин гороху і сої визначали за методикою, описаною Frensis et Alexander [13], при співвідношенні наважка рослинного матеріалу – об'єм буфера як 1:10 – для листя і коріння та 1:25 – для бульбочок. Реакцію розкладання H_2O_2 каталазою проводили протягом 5 хв і припиняли додаванням водного розчину H_2SO_4 в об'ємному співвідношенні 1:9. У контрольному варіанті досліді водний розчин H_2SO_4 вносили перед додаванням рослинного екстракту. Кількість H_2O_2 в реакційному середовищі до початку і в кінці досліді визначали йодометричним методом, який використовується для оцінки каталазної активності рослинних екстрактів. Для цього після припинення реакції в середовище додавали 2 мл H_2O_2 , 0,5 мл 25 %-ного водного розчину йодистого калію та кілька крапель 10 %-ного розчину молібдату амонію. Йод, який виділився, титрували 0,2N розчином тіосульфату натрію в присутності крох-

малю. Активність фермента виражали в міліграмах H_2O_2 , розкладеного за 1 хв з розрахунку на 1 г сирової маси.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що ефективність азотфіксації симбіотичними системами гороху і сої суттєво зростає за комплексного застосування препарату полісахаридної природи з бульбочковими бактеріями.

З аналізу одержаних результатів видно (табл. 1), що синтетичний полісахарид МОД-19 позитивно впливає на процеси бульбочкоутворення у рослин гороху та сої. У варіантах, коли застосовували сумісну інокуляцію ризобіями та обробку насіння перед посівом полісахаридом МОД-19, суттєво зростає кількість кореневих бульбочок порівняно з контролем. Показано, що при застосуванні синтетичного полісахариду, як і за обробки насіння природним полісахаридом бактозолом, найбільша кількість бульбочок утворилася на бічних коренях (табл. 1, фаза цвітіння рослин). У варіантах з обробкою насіння полісахаридом утворення бульбочок відбувається не тільки на початку росту рослин, а й у процесі їхньої вегетації. Такі бульбочки є молодими, тому активна азотфіксація у цих рослин триває і в періоді їхнього цвітіння та утворення бобів. Раніше нами було показано, що обробка проростків гороху 3%-ним розчином полісахариду МОД-19 спричиняла ростову активність коренів [4]. Зважаючи на це, зростання чисельності і маси кореневих бульбочок у наших дослідах відбувалося головним чином за рахунок додаткового утворення бічних коренів під впливом даного полісахариду. Так, сумарна кількість бульбочок гороху у варіанті з інокуляцією і обробкою МОД-19 (табл. 1, вар. 4) перевищувала показники контролю (табл. 1, вар. 1 – без інокуляції, без полісахариду) у 2,3 раза, а на сої – у 2,6 раза.

Підсилення здатності до бульбочкоутворення під впливом полісахариду МОД-19 сприяло зростанню симбіотичної азотфіксації у рослин гороху і сої. Якщо у інокульованих рослин гороху в порівнянні з неінокульованими вона збільшилась на 50 %, то у сої її зростання становило 360 %. Сумісна обробка бульбочковими бактеріями і полісахаридом МОД-19 сприяла підвищенню нітрогеназної активності рослин гороху у 1,8-1,9 раза порівняно з обробкою окремо кожним із цих препаратів. За даних умов, азотфіксувальна активність у рослин сої збільшилась у 2,7 раза при обробці бульбочковими бактеріями та у 3,9 раза – обробці лише полісахаридом. Слід зауважити, що рослини сої, порівняно з горохом, виявились

Таблиця 1. Показники ефективності симбіотичної азотфіксації у рослин гороху і сої при застосуванні синтетичного полісахариду та інокуляції бульбочковими бактеріями

Варіант досліджу	Надземна маса, г	Кореневі бульбочки, од.			Азотфіксувальна активність, нмольС ₂ Н ₄ на рослину за 1 годину
		головний корінь	бічні корені	сумарна кількість	
Горох					
Контроль (без інокуляції, без препарату)	7,3 ± 0,2	15 ± 2	52 ± 3	67 ± 4	1090 ± 34
Інокуляція, без препарату	7,4 ± 0,3	26 ± 5	96 ± 4	122 ± 7	1540 ± 44
Без інокуляції, обробка МОД-19	8,6 ± 0,2	20 ± 2	85 ± 7	103 ± 7	1489 ± 68
Інокуляція, обробка МОД-19	10,4 ± 0,2	19 ± 1	140 ± 12	159 ± 8	2906 ± 99
Соя					
Контроль (без інокуляції, без препарату)	15,6 ± 1,2	14 ± 1	31 ± 3	45 ± 3	390 ± 9
Інокуляція, без препарату	16,9 ± 1,1	39 ± 3	69 ± 5	108 ± 9	1420 ± 70
Без інокуляції, обробка МОД-19	16,2 ± 1,1	18 ± 1	34 ± 2	52 ± 4	980 ± 43
Інокуляція, обробка МОД-19	23,6 ± 1,6	31 ± 2	86 ± 7	117 ± 8	3840 ± 14

більш чутливими до одночасної інокуляції та обробки полісахаридом. Надземна маса рослин гороху за сумісної дії інокуляції й полісахариду була на 40 % більшою, ніж у контролі, а рослин сої – на 50 %. Кожен із препаратів окремо сприяв зростанню маси надземної частини рослин відносно контролю лише на 10-12 %.

Відомо, що у рослин основними регуляторами процесів розвитку і життєдіяльності є гормони. Важливим етапом у регуляції рівня індолілоцтової кислоти (ІОК), що належить до ауксинів, є її незворотна окислювальна деградація за участю пероксидаз. Незважаючи на те, що пероксидаза – поліфункціональний фермент, підвищення її активності в рослинних тканинах розглядається як відповідь на збільшення в них вмісту ендogenousного ауксину [9]. Відомо, що у бобових ІОК контролює ріст коренів і морфогенез бульбочок. Таким чином, рівень активності пероксидази в рослинах може опосередковано свідчити про вміст у них більшої чи меншої кількості ауксинів [8].

Протягом вегетаційного періоду ми визначили активність гваякол – пероксидази в листках, коренях і бульбочках досліджуваних рослин. Одержано дані щодо активності цього ферменту у фазу цвітіння рослин як одну з визначальних в онтогенезі. Як видно з даних табл. 2, активність пероксидаз була вищою в інокульованих рослинах. Так, активність ферменту в листі та корінні інокульованих рослин сої була у 1,3 раза, а в бульбочках – у 4,4 раза вища, ніж у відповідних органах неінокульованих рослин.

У листі і корінні рослин сої загальний рівень активності пероксидази у порівнянні з аналогічними варіантами рослин гороху виявився нижчим (табл. 2). Слід зауважити, що в бульбочках і гороху, і сої активність пероксидази була найвищою. Отримані результати можуть свідчити про специфічну функцію пероксидаз бульбочок як органел із високим рівнем окисно-відновних процесів.

Високий рівень активності пероксидази в інокульованих рослинах, а також оброблених полісахаридами підтверджують положення про зміну фітогормонального статусу рослин (зокрема, більший вміст ІОК) як відповідь на інфікування бульбочковими бактеріями. Можливо, такий самий вплив мають і полісахариди, але вони діють як біологічно активні речовини.

Відомо, що у симбіотичних системах після утворення бактероїдів синтез ауксину істотно зменшується. Підтримання високого рівня пероксидазної активності в бульбочках гороху і сої у фазу

Таблиця 2. Активність пероксидази в різних органах рослин гороху та сої при застосуванні полісахариду та інокуляції бульбочковими бактеріями (фаза бутонізації – початку цвітіння рослин)

Варіант досліді	Активність пероксидази, мкмоль гваяколу / г маси сирової речовини за 1 хв.		
	листя	коріння	бульбочки
Горох			
Контроль (без інокуляції, без препарату)	77 ± 7	91 ± 11	109 ± 9
Інокуляція, без препарату	168 ± 9	198 ± 10	206 ± 17
Без інокуляції, обробка МОД-19	177 ± 8	198 ± 11	202 ± 16
Інокуляція, обробка МОД-19	215 ± 11	219 ± 14	358 ± 19
Соя			
Контроль (без інокуляції, без препарату)	85 ± 7	119 ± 8	53 ± 6
Інокуляція, без препарату	110 ± 4	152 ± 11	232 ± 11
Без інокуляції, обробка МОД-19	59 ± 2	93 ± 4	203 ± 7
Інокуляція, обробка МОД-19	87 ± 3	143 ± 11	270 ± 10

Таблиця 3. Активність каталази в різних органах рослин гороху та сої при застосуванні полісахариду та інокуляції бульбочковими бактеріями (фаза бутонізації – початку цвітіння рослин)

Варіант досліді	Активність каталази, мг H ₂ O ₂ / г маси сирової речовини		
	листя	коріння	бульбочки
Горох			
Контроль (без інокуляції, без препарату)	14 ± 0,6	13 ± 0,4	160 ± 7,0
Інокуляція, без препарату	18 ± 0,7	15 ± 0,6	180 ± 8,0
Без інокуляції, обробка МОД-19	19 ± 0,4	14 ± 0,5	208 ± 10,0
Інокуляція, обробка МОД-19	20 ± 0,9	10 ± 0,3	300 ± 12,0
Соя			
Контроль (без інокуляції, без препарату)	64 ± 2,0	1,6 ± 0,1	202 ± 11,0
Інокуляція, без препарату	60 ± 1,9	1,2 ± 0,1	228 ± 12,0
Без інокуляції, обробка МОД-19	112 ± 4,3	2,4 ± 0,1	260 ± 9,0
Інокуляція, обробка МОД-19	130 ± 4,7	3,2 ± 0,2	332 ± 14,0

цвітіння рослин за умови обробки полісахаридом МОД-19, як це спостерігалось в наших дослідах, ймовірно свідчить про те, що інфікування рослин бульбочковими бактеріями і синтез ауксинів у цей період ще тривають.

Поряд із пероксидазою в клітинах рослин функціонує інший антиоксидантний фермент – каталаза, який сприяє швидкій утилізації перекису водню, що утворюється за суттєвого зростання активності окислювальних процесів. Горох і соя різняться між собою за типом головної сполуки, в формі якої симбіотично фіксований азот транспортується з кореневих бульбочок. Горох належить до групи рослин з амідтранспортуючим, а соя – з уреїдтранспортуючим типами азотного обміну. Каталаза в бульбочках уреїдтранспортуючих рослин (соя) розкладає перекис водню, який утворюється із сечової кислоти. У бульбочках рослин, які транспортують аміди (горох) каталаза ні прямо, ні опосередковано не пов'язана з утворенням транспортних форм симбіотично фіксованого азоту. Порівняльне вивчення каталазної активності в листі, корінні та бульбочках гороху і сої показало (табл. 3), що активність ферменту в бульбочках та листі рослин, які транспортують уреїди, була, як правило, в декілька разів вищою, ніж у тих, що транспортують аміди. У варіантах досліду, коли насіння обробляли полісахаридом МОД-19 та бульбочковими бактеріями, рівень каталазної активності майже вдвічі перевищував показники активності цього ферменту в листі, корінні та бульбочках неінокульованих рослин (табл. 3), що може бути пов'язано з підвищенням рівнем окисно-відновних процесів у рослин, оброблених зазначеними препаратами.

Результати досліджень дають підстави зробити висновок, що в рослинах гороху та сої, вирощених з насіння, яке оброблялося бульбочковими бактеріями та неспецифічним для даних бобових культур полісахаридом, підвищується рівень метаболічних процесів: підсилюються процеси бульбочкоутворення, зростає азотфіксувальна активність бульбочок і подовжується період їх активного функціонування до фази плодоутворення за рахунок вторинного утворення бульбочок на бокових коренях. Одержані дані вказують на можливість підсилення ефективності симбіозу синтетичними глікополімерами неризобіального походження, які, ймовірно, виступають індукторами нодуляційних процесів та ризогенезу. При цьому висока активність оксидаз (пероксидази і каталази) є необхідною умовою активного функціонування симбіотичних систем

бобових рослин незалежно від типу азотного обміну.

1. Кругова О.Д., Мандровська Н.М., Багнюк В.М., Григорюк І.П. Ефективність симбіотичної азотфіксації сої за дії бактеріального екзополісахариду // Доп. НАН України. – 2000. – № 2. – С. 184-187.

2. Кругова Е.Д., Дульнев П.Г. Оптимизация симбиотической азотфиксации гороха синтетическим цитокинином // Физиол. и биохим. культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 5. – С. 500-506.

3. Кругова О.Д., Мандровська Н.М., Охріменко С.М. Вплив бактеріального екзополісахариду на ефективність симбіотичної азотфіксації рослин гороху і сої // Физиол. и биохим. культ. растений. – 2002. – Т. 34, № 3. – С. 239-244.

4. Мандровська Н.М., Кругова О.Д., Охріменко С.М. та ін. Дія синтетичного полісахариду на ріст бульбочкових бактерій і ризогенез рослин гороху // Агроекол. журн. – 2005. – № 4 – С. 47-51.

5. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. – М.: Изд-во ВИНТИ, 1989. – Т. 6. – 168 с.

6. Мерзляк М.Н. Активированный кислород в жизнедеятельности растений // Соросовский образовательный журн. – 1999. – № 9. – С. 20- 26.

7. Рубин Б.А., Арциховская Е.Б., Аксенова В.П. Биохимия и физиология иммунитета растений. –М.: Высшая школа, 1973. – 318 с.

8. Федорова Е.Э., Альжапарова Ж.К., Жизневская Г.Я. и др. Фитогормоны в корневых клубеньках сои // Физиология растений. – 1992. – Т. 39, № 2. – С. 224-230.

9. Федорова Е.Э., Жизневская Г.Я., Калиберная З.В. и др. Метаболизм ИУК при установлении симбиоза между *Phaseolus vulgaris* и *Rhizobium phaseoli* // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 2. – С. 231-235.

10. Шевякова Н.И., Стеценко Л.П., Мещерякова А.Б., Кузнецов В.В. Изменение активности пероксидазной системы в процессе стрессиндуцированного формирования САМ // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 5. – С. 670-677.

11. Buffard D., Eshault K., Kondorosi A. Role of plant defence in alfalfa during symbiosis // World J. Microbiol. Biotechnol. – 1996.

– Vol. 12. – P. 175-188.

12. Denarie J., Cullimore J. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: new class of signalling molecules mediating recognition and morphogenesis // *Cell*. – 1993. – Vol. 74. – P. 951-954.

13. Frensis A.J., Alexander M. Catalase activity and nitrogen fixation in legume root nodules // *Can. J. Microb.* – 1972. – Vol. 18. – P. 861-868.

14. Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A., Stewart C.R. Evidence for chilling – induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide // *Plant Cell*. – 1994. – Vol. 6. – P. 65-74.

15. Salzwedel J.L., Dazzo T.B. pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and their cellfree supernatants // *Mol. Plant. – Microbe Interactions*. – 1993. – Vol. 6, № 1. – P. 127-134.

16. Yoshimura K., Jabuta J., Ishikawa T., Shigeoka S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 123. – P. 223-233.

17. Пат. 520317 Україна Спосіб отримання полімерних матеріалів / П.Г. Дульнев, С.Г. Кондратенко, Т.В. Чернишенко. – Опубл. 16.12.02, Бюл. № 12.

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОЗА И АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ У РАСТЕНИЙ ГОРОХА И СОИ

Кругова Е.Д., Мандровская Н.М., Коць С.Я.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

Исследовали влияние синтетического полисахарида МОД-19 на эффективность симбиотической азотфиксации растений гороха и сои, а также на активность ферментов антиоксидантной системы защиты - пероксидазы и каталазы.

*Показано, что в растениях гороха и сои, выращенных из семян, обработанных перед посевом клубеньковыми бактериями (горох - *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 2636, соя - *Bradyrhizobium japonicum* 6346) и неспецифическим для данных бобовых культур синтетическим полисахаридом МОД-19, наблюдается усиление процессов метаболизма, о чём свидетельствуют изменения морфологических и функциональных показателей симбиотических систем: увеличивается биомасса растений и количество корневых клубеньков на корнях, удлиняется период активного функционирования клубеньков за счёт вторичного их образования на боковых корнях, усиливается их азотфиксирующая активность. У этих растений, кроме того, возрастает уровень активности окислительно-восстановительных ферментов – пероксидазы и каталазы.*

Ключевые слова: симбиоз, клубеньковые бактерии, горох, соя, синтетический полисахарид, пероксидаза, каталаза

THE INFLUENCE OF SYNTHETIC POLYSACCHARIDE ON BOTH EFFICIENCY OF SYMBIOSIS AND PEROXIDASE AND CATALASE ACTIVENESS OF PEA AND SOYA BEANS

Krugova E.D., Mandrovska N.M., Kots S.Ya.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

The influence of synthetic polysaccharide MOD-19 on the efficiency of nitrogen fixation of pea and soya plants as well as on ferment activity of the antioxidative defense system – peroxidase and catalase was investigated.

*It has been shown that the metabolic process intensifying is observed in pea and soya plants grown from the seeds, wich had been tilled before sowing by nodule bacterium (pea - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263b and soya beans - *Bradyrhizobium japonicum* 634b) and by nonspecific for these bean cultures polysaccharide MOD-19. This has been proved by morphological and functional haracteristics of these systems, the increasing of plant biomass and nodules quantiity on the roots. The active functioning period of nodules is elongating at the expense of secondary nodules formation on the side roots and their nitrogen activity increased. Rising of the oxidative ferment activity level for peroxydase and catalase was found in these plants.*

Key words: symbiosis, nodule bacterium, pea, soya beans, synthetic polysaccharide, peroxidase, catalase.