

АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ТА ЕНЗИМІВ АСКОРБАТ – ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛУ У СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМАХ *GLYCINE MAX* – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ЗА ДІЇ ПОСУХИ

Т.П. Маменко, Ю.О. Хоменко, С.Я. Коць

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна
e-mail: t_tamenko@ukr.net

Мета. Дослідити вплив посухи на активність ключових антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, глутатіонредуктази, аскорбатпероксидази) у корневих бульбочках сої за інокуляції штамами і Tn5-мутантами *B. japonicum* із контрастними симбіотичними властивостями. **Методи.** Мікробіологічні, фізіологічні, біохімічні, газова хроматографія, спектрофотометрія. **Результати.** Симбіотичні системи, утворені за участю сої та активного штаму *B. japonicum* 646, а також Tn5-мутанта B1-20 вирізняються адаптаційними змінами активності антиоксидантних ензимів за дії зневоднення, що супроводжується збереженням ефективності роботи їх симбіотичного апарату. У симбіотичних системах, утворених за участю сої та малоактивного Tn5-мутанта 107 і неактивного штаму *B. japonicum* 604к, виявлено різноспрямовані зміни активності ензимів у бульбочках за дії посухи та слабке відновлення їх активності у післястресовий період. **Висновки.** Формування захисних реакцій рослин сої у симбіозі із *B. japonicum* за дії посухи пов'язано з активацією супероксиддисмутази, змінами активності ензимів аскорбат – глутатіонового циклу та залежить від здатності симбіотичної системи реалізувати свій адаптаційний потенціал в умовах стресу.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, соя (*Glycine max* (L.) Merr.), супероксиддисмутаза, глутатіонредуктаза, аскорбатпероксидаза, посуха.

Ефективність роботи симбіотичних систем, утворених за участю бобових рослин та бульбочкових бактерій, в умовах стресу залежить від здатності макро- і мікросимбіонтів у симбіозі індукувати захисні механізми та реалізувати свій симбіотичний потенціал [1, 2, 3, 4]. Вплив стресових чинників індукує зміни метаболізму, порушує оптимальний перебіг фізіологічних процесів [5, 6, 7]. Це, з одного боку, може негативно відзначитись на формуванні і функціонуванні симбіозу, а з іншого – стимулювати включення захисних механізмів, що сприятимуть перебудові метаболізму та розвитку адаптації до дії стресу.

Важливе значення в адаптації рослин до дії несприятливих чинників навколишнього середовища, в тому числі і посухи, належить біохімічним системам захисту. Серед них значна увага приділяється з'ясуванню ролі антиоксидантних систем у метаболізмі і формуванні стійкості рослин за дії стрес-факторів [8, 9, 10]. Антиоксидантні системи беруть участь у нейтралізації активних форм кисню (АФК), накопичення яких у рослинній клітині за дії стресу ініціює процеси окиснювальної деструкції мембранних структур. Водночас доведено, що АФК можуть також висту-

пати в ролі сигнальних молекул, які беруть участь в активації захисних систем за дії стресу, зокрема, індукувати синтез ферментів антиоксидантів [6, 11, 12].

Основним ініціатором вільнорадикального окиснення ліпідів мембран вважається супероксид, що генерується в багатьох спонтанних та ензиматичних реакціях окиснення, причому продуктами його вторинного перетворення можуть бути синглетний кисень, гідроксильний радикал, пероксид водню, органічні пероксиди та їх радикали [11, 12]. Тому ключовим ензимом захисту живих організмів від окиснювальної деструкції вважають супероксиддисмутазу (СОД), яка каталізує утворення з аніон-радикалів супероксиду пероксиду водню і кисню [9, 13]. Для утилізації пероксиду водню (H_2O_2) включається комплекс ензимів: каталаза, родина пероксидаз, а також ензими аскорбат-глутатіонового циклу – аскорбатпероксидаза (АПО) і глутатіонредуктаза (ГР) [8, 10, 14].

Існує три ізоформи СОД (CuZn-СОД, Fe-СОД і Mn-СОД) у рослинних клітинах, які відрізняються за наявністю металу в активному центрі ензиму, та усі вони виявлені у рослинних фракціях корневих бульбочок бобових рослин [15]. Різна локалізація ізоензимів СОД у тканинах корневих бульбочок обумовлює їх специфічні функції. Зокрема, CuZn-СОД переважає у апексі бульбочок, особливо в інфекційних нитках, у цитозолі, розташованому поряд із клітинними оболонками, і апопласті. Функція CuZn-СОД може бути пов'язана із ростом клітинних стінок у меристемах, інфекційних нитках і апопласті, а також із відповіддю рослин на бактеріальну інфекцію. Mn-СОД присутній у інфікованих клітинах корневих бульбочок і бере участь у процесах, пов'язаних із захистом і функціонуванням симбіозу у зрілих бульбочках. Fe-СОД локалізований виключно у стромі хлоропластів, його функції менш за все вивчено у бобових рослин. Бактероїди містять Mn-СОД у цитозолі та CuZn-СОД у периплазматичному просторі. Ці ензими кодуються відповідними бактеріальними *sodA* і *sodC* генами [15].

Аскорбат – глутатіоновий цикл найбільш детально вивчений у цитозолі корневих бульбочок. Так, у мітохондріях корневих бульбочок було виявлено чотири ензими цього шляху [16, 18]. Для мітохондрій бульбочок сої припускається модель, у якій H_2O_2 , що утворюється у внутрішній мембрані бульбочки, знешкоджується за допомогою мембранозв'язаної АПО. Аскорбат відновлюється за допомогою монодегідроаскорбату, дегідроаскорбату і глутатіонредуктази у цитозолі. Ензими аскорбат – глутатіонового циклу були виявлені також у пероксисомах гороху, тому, ймовірно, цей шлях функціонує і в пероксисомах бульбочок [18]. Доведено, що аскорбат – глутатіоновий шлях утилізації H_2O_2 є основним для функціонування бульбочок [16, 17]. Ключовий ензим цього шляху – АПО повсюди зустрічається у бульбочках, особливо в інфікованих і паренхімних клітинах. У інфікованих клітинах АПО захищає леггемоглобін та інші білки від H_2O_2 . Тоді як у паренхімі клітин бульбочок ензим може брати участь у створенні дифузійного бар'єру для кисню, контролюючи таким чином його надходження в інфіковану зону [17].

Незважаючи на значну кількість даних щодо участі антиоксидантних ензимів у формуванні і функціонуванні бобово – ризобіального симбіозу, досі до кінця не з'ясований механізм цього явища [1, 2, 3, 4]. Проведення

подальших досліджень у даному напрямку дозволить з'ясувати додаткові аспекти формування захисних реакцій та особливості функціонування симбіотичних систем за стресової дії посухи.

Тому метою роботи було вивчити вплив посухи на активність ключових антиоксидантних ензимів (СОД, АПО і ГР) у корневих бульбочках сої за інокуляції штамми і Tn5-мутантами *B. japonicum* із контрастними симбіотичними властивостями.

Матеріали і методи. У роботі використано штами *B. japonicum* із музейної колекції азотфіксуючих мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ НАНУ) – 646 (активний, вірулентний) та 604к (неактивний, високовірулентний), а також Tn5-мутанти – В1-20 (активний, вірулентний) та 107 (малоактивний, вірулентний), отримані методом транспозонового мутагенезу у відділі симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАНУ. Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на твердому манітно – дріжджовому середовищі протягом 7 діб при 26 – 28°C до початку стаціонарної фази росту. Перед посівом простерилізоване 70 % етанолом і промите під проточною водою протягом 1 год насіння інокулювали суспензіями бульбочкових бактерій різної ефективності (титр суспензії становив 10^8 кл/мл).

Рослини сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Либідь вирощували у 10-кілограмових посудинах Вагнера в піщаній культурі із внесенням поживної суміші Гельрігеля з 0,25 норми азоту [19] за природнього освітлення та оптимального водозабезпечення (60 % повної вологості (ПВ)).

Комбіновану модельну посуху створювали впродовж 12-ти діб, одночасним зменшенням поливу рослин до 40 % ПВ, починаючи з фази двох справжніх листків та поступовим переведенням поливу до 30 % ПВ у фази трьох справжніх листків та бутонізації – початку цвітіння. Після припинення дії посухи вологість піску у посудинах доводили до 60 % ПВ (відновлення поливу) у фазу масового цвітіння. Контролем слугували інокульовані ризобіями рослини сої, що зростали за оптимального поливу (60 % ПВ).

Нодуляційну здатність бульбочкових бактерій оцінювали за підрахунком кількості та маси корневих бульбочок. Азотфіксувальну активність (АФА) – ацетиленовим методом [20] на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США) з полуменево-іонізаційним детектором. Розділення газів проводили на колонці (Supelco Porapak N) за температури термостата 55°C і детектора – 150°C. Газом-носієм був гелій (20 мл за 1 хвилину). Об'єм аналізованої проби газової суміші становив 1 см³. Як стандарт використовували чистий етилен (Sigma-Aldrich, № 536164, США).

Для отримання ензимного екстракту наважку рослинного матеріалу (0,2 г) розтирали у фарфоровій ступці з 4 мл 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,5), який містив 2 мМ етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА), 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (PMSF), 5 мМ β-меркаптоетанол і 1% (в/о) полівінілпіролідон. Гомогенат центрифугували при 10 000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С. Супернатант використовували для визначення активності ензимів за допомогою спектрофотометра «Smart Spec Plus» (США).

Активність АПО (КФ 1.11.1.11) визначали за зменшенням оптичної густини при довжині хвилі 290 нм протягом 2 хв у результаті окиснен-

ня аскорбату ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [14]. Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,1 мМ ЕДТА, 0,2 мМ аскорбат, 0,1 мМ H_2O_2 . Реакцію ініціювали додаванням 150 мкл супернатанта. Активність ГР (КФ 1.6.4.2) – за зменшенням оптичної густини при довжині хвилі 340 нм протягом 2 хв у результаті окиснення НАДФ·Н ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в присутності окисненого глутатіону [10]. Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,8), 0,12 мМ НАДФ·Н, 0,5 мМ окиснений глутатіон. Реакцію ініціювали додаванням 100 мкл супернатанта. Активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали за здатністю ензиму інгібувати фотохімічне відновлення нітросинього тетразолія [9]. Реакційна суміш містила 50 мМ фосфатний буфер (рН 7,8), 13 мМ метіонін, 2 мкМ рибофлавін, 63 мкМ *p*-нітросиній тетразолій, 0,1 мМ ЕДТА і 100 мкл ферментного екстракту. Реакція протікала протягом 15 хв за інтенсивності світла 70 мкмоль квантів/($\text{m}^2 \text{ c}$) освітлення флуоресцентними лампами потужністю 15 Вт. Оптичну густину вимірювали при 560 нм. Вміст загального розчинного протеїну у ферментному екстракті визначали за Бредфорд [21]. Повторність визначень 5 – 7-ми кратна. Одержані дані оброблені статистично з використанням критерію Стьюдента. Значення $P \leq 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці. У табл. 1, 2 та на рис. 1 – 3 результати представлені у вигляді середніх значень для $n = 5 - 7$ зі вказівкою на середні квадратичні відхилення ($M \pm m$). У роботі використовувались реактиви іноземних виробників: Reanal (Угорщина), Merck (Німеччина), Calbiochem (Німеччина).

Результати. Досліджено, що за тривалої дії посухи у симбіотичній системі, утвореній за участю сої та активного штаму *B. japonicum* 646, відбувалось зменшення кількості та маси кореневих бульбочок майже удвічі від контролю. При цьому їх АФА знижувалась до 60 % (табл. 1, 2). За таких умов вирощування у симбіотичній системі, утвореній за участю активного Тп5-мутанта В1-20, не спостерігали зниження кількості бульбочок на коренях сої, однак їх маса була удвічі меншою від контрольних рослин, а АФА пригнічувалась також до 60 %. Нами не зафіксовано утворення бульбочок на коренях сої, інокульованої малоактивним Тп5-мутантом 107, за помірної дії посухи у фазу трьох справжніх листків. За жорстких умов дефіциту вологи (фаза бутонізації) у даній симбіотичній системі було виявлено лише по одній бульбочці на рослину, маса якої та АФА на 99 % були нижчими від контролю. Впродовж дії зневоднення не виявлено суттєвого зниження кількості кореневих бульбочок та їх маси у симбіотичній системі, утвореній за участю сої та високовірулентного неактивного штаму *B. japonicum* 604к (табл. 1, 2).

Після поновлення поливу рослин, у фазу масового цвітіння, у симбіотичній системі, утвореній за участю сої та активного штаму ризобій 646, маса кореневих бульбочок та їх кількість на рослині були відповідно на 30 % і 50 % нижчими від контрольних рослин. При цьому їх азотфіксувальна функція відновлювалась лише частково і була на 40 % нижче за контрольний рівень (табл. 1, 2). За умов відновленого поливу у сої, інокульованої активним Тп5-мутантом В1-20 спостерігалось навіть незначне зростання кількості бульбочок на рослину, однак їх маса та АФА були нижче контролю на 20 і 28 % відповідно. Нами не зафіксовано помітних

Таблиця 1

**Вплив посухи на формування симбіотичного апарату сої,
інокульованої контрастними за симбіотичними властивостями
штамами і Tn5-мутантами *V. japonicum***

Варіант	Фаза онтогенезу					
	трьох справжніх листків		бутонізації		масового цвітіння	
	п о с у х а					відновлення поливу
	Б У Л Ь Б О Ч К И					
	кількість, шт./ рослину	маса, г/рослину	кількість, шт./ рослину	маса, г/рослину	кількість, шт./ рослину	маса, г/рослину
Штам 646	41,3 ± 2,5	0,29 ± 0,02	43,3 ± 2,6	0,46 ± 0,03	105,6 ± 6,3	0,88 ± 0,05
Штам 646 + посуха	33,0 ± 1,9	0,21 ± 0,01	23,6 ± 1,4	0,22 ± 0,01	49,3 ± 3,0	0,60 ± 0,04
Tn5-мутант В1-20	29,6 ± 1,7	0,24 ± 0,01	31,3 ± 1,8	0,29 ± 0,02	62,6 ± 3,8	0,53 ± 0,03
Tn5-мутант В1-20 + посуха	22,6 ± 1,4	0,15 ± 0,008	29,0 ± 1,7	0,15 ± 0,01	66,0 ± 4,0	0,42 ± 0,03
Tn5-мутант 107	2,0 ± 0,1	0,17 ± 0,007	2,0 ± 0,1	0,27 ± 0,01	2,0 ± 0,1	0,48 ± 0,03
Tn5-мутант 107 + посуха	відсутні бульбочки	відсутні бульбочки	1,0 ± 0,06	0,0046 ± 0,0001	1,0 ± 0,06	0,0044 ± 0,0002
Штам 604к	45,6 ± 2,7	0,14 ± 0,008	62,3 ± 3,7	0,15 ± 0,008	248,3 ± 14,9	0,61 ± 0,04
Штам 604к + посуха	49,0 ± 2,9	0,09 ± 0,005	60,0 ± 3,6	0,1 ± 0,006	110,0 ± 6,6	0,30 ± 0,02

Примітка: Тут і у табл. 2 (M ± m, n = 5-7), дані порівняно з контролем вірогідні при P ≤ 0,05.

Таблиця 2

**Вплив посухи на азотфіксувальну активність корених
бульбочок сої, інокульованої контрастним за симбіотичними
властивостями штамами і Tn5-мутантами *V. japonicum*,
мкмоль C₂H₄ / (рослину · год)**

Варіант	Фаза онтогенезу				
	двох справжніх листків	трьох справжніх листків	бутонізації	масового цвітіння	
	оптимальний полив	п о с у х а			відновлення поливу
Штам 646	0,113 ± 0,034	2,81 ± 0,26	2,28 ± 0,21	5,88 ± 0,29	
Штам 646 + посуха	-	1,51 ± 0,23	0,82 ± 0,11	3,59 ± 0,27	
Tn5-мутант В1-20	0,123 ± 0,043	1,77 ± 0,17	1,63 ± 0,21	2,88 ± 0,16	
Tn5-мутант В1-20 + посуха	-	1,06 ± 0,16	0,59 ± 0,18	2,05 ± 0,26	
Tn5-мутант 107	0,016 ± 0,005	0,32 ± 0,02	0,52 ± 0,14	1,13 ± 0,14	
Tn5-мутант 107 + посуха	-	відсутні бульбочки	0,004 ± 0,0002	0,004 ± 0,0008	

змін у роботі симбіотичного апарату рослин сої, інокульованої малоактивним Tn5-мутантом 107 у післястресовий період, а також значне зниження процесів нодуляції за інокуляції сої неактивним штамом ризобій 604к.

Зафіксовано незначні зміни активності СОД у корневих бульбочках сої, інокульованої активним штамом *B. japonicum* 646 і Tn5-мутантом В1-20 впродовж дії зневоднення та після відновлення поливу рослин, що вказує на незначний розвиток окиснювальних процесів у даних симбіотичних системах (рис. 1). У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та малоактивного Tn5-мутанта *B. japonicum* 107, відбувалась різка інтенсифікація активності СОД у корневих бульбочках за тривалого дефіциту вологи у фазу бутонізації та відновлення його активності до рівня контролю після дії стресу. Це свідчить про розвиток стрес-захисних реакцій рослин у симбіозі за дії дефіциту вологи та швидке відновлення роботи захисної системи у післястресовий період.

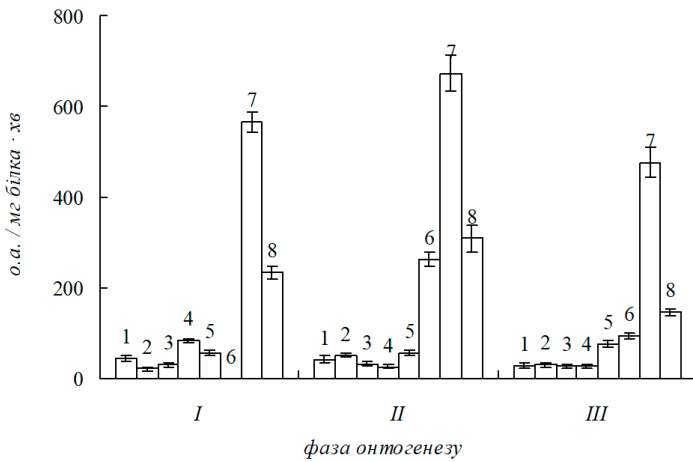


Рис. 1. Вплив посухи на активність супероксиддисмутази у корневих бульбочках сої, інокульованої контрастними за симбіотичними властивостями штаммами і Tn5-мутантами *B. japonicum*.

Тут і на рис. 2, 3: 1 – штам 646, 2 – штам 646 + посуха, 3 – Tn5-мутант В1-20, 4 – Tn5-мутант В1-20 + посуха, 5 – Tn5-мутант 107, 6 – Tn5-мутант 107 + посуха, 7 – штам 604к, 8 – штам 604к + посуха. I, II – відповідно 7-ма й 12-та доба зневоднення у фазі трьох справжніх листків і бутонізації, III – 5-та доба відновлення поливу у фазу масового цвітіння. ($M \pm m$, $n = 5-7$), дані порівняно з контролем вірогідні при $P \leq 0,05$.

За інокуляції сої неактивним штамом 604к виявлено пригнічення активності ензиму впродовж дії посухи та після відновлення поливу рослин (рис. 1). Такі дані вказують на очевидні порушення метаболізму рослин за розвитку окиснювальних процесів, спричинених посухою, а також про неспроможність антиоксидантної системи утилізувати наслідки стресу та відновити свою роботу у післястресовий період.

Досліджено, що активність АПО у корневих бульбочках інокульованої сої зростала впродовж дії посухи незалежно від симбіотичних властивостей бульбочкових бактерій (рис. 2). Активність АПО у корневих бульбочках сої, за інокуляції активним штамом ризобій 646 та активним

Tn5-мутантом В1-20, помітно зростала вже за помірної дії посухи у фазу трьох справжніх листків. За жорстких умов дефіциту вологи у фазу бутонізації активність ензиму незначно зростала від контролю в межах відповідних варіантів та швидко відновлювалась до рівня контрольних рослин у післястресовий період.

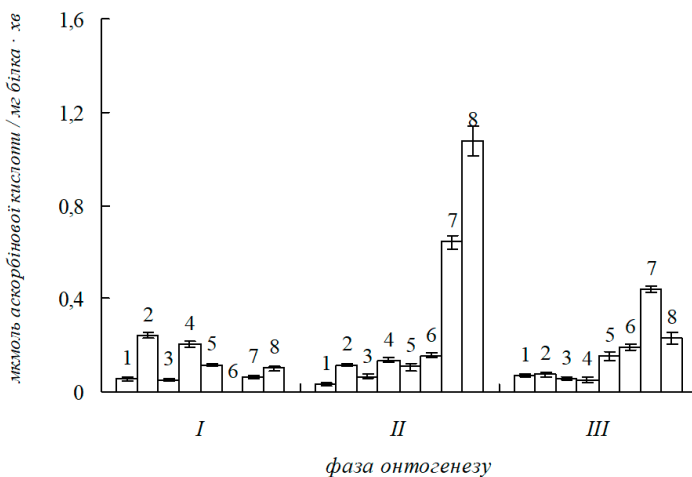


Рис. 2. Вплив посухи на активність аскорбатпероксидази у корневих бульбочках сої, інокульованої контрастним за симбіотичними властивостями штамми і Tn5-мутантами *B. japonicum*.

Отримані дані свідчать про активну реакцію ензиму на зневоднення вже на початкових етапах дії стресового чинника, а також про спроможність захисної системи рослин сої у симбіозах із *B. japonicum* активного штаму 646 і Tn5-мутанта В1-20 подолати розвиток окиснювальних процесів за подальшого впливу стресу та швидко відновити свою роботу у післястресовий період.

У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та малоактивного Tn5-мутанта *B. japonicum* 107 відмічено несуттєве підвищення активності АПО у корневих бульбочках за тривалого зневоднення та після відновлення поливу рослин (рис. 2). Зафіксовані зміни активності ензиму спостерігались на фоні різкого підвищення активності СОД у корневих бульбочках за дії стресу і можуть свідчити про неспроможність АПО максимально ефективно включитися у роботу та брати участь у знешкодженні окиснювальних процесів.

У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та неактивного штаму *B. japonicum* 604к, зафіксовано різке зростання активності АПО за тривалого дефіциту вологи та пригнічення її активності після дії стресу (рис. 2). З одного боку, така реакція ензиму може свідчити про його включення у роботу саме за жорстких умов зневоднення. З іншого – пригнічення активності ензиму у післястресовий період вказує на суттєве порушення його функціонування у неефективній симбіотичній системі.

Досліджено, що антиоксидантний ензим ГР виявився більш чутливим до втрат води, ніж СОД і АПО, оскільки його активність у корневих бульбочках коливалась впродовж дії посухи та зростала після відновлення поливу рослин майже в усіх симбіотичних системах (рис. 3).

У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та активного штаму ризобій 646, активність ГР у корневих бульбочках знижувалась за помірної дії посухи, досягала рівня контролю за тривалого зневоднення та незначно зростала у післястресовий період (рис. 3). Зниження активності ензиму свідчить про його неспроможність максимально ефективно включитися у роботу на початкових етапах дії стресу. Однак підвищення рівня активності ензиму до контролю за тривалої дії посухи та післястресовий період вказує на відновлення його роботи та ефективне функціонування аскорбат – глутатионового циклу у даній симбіотичній системі.

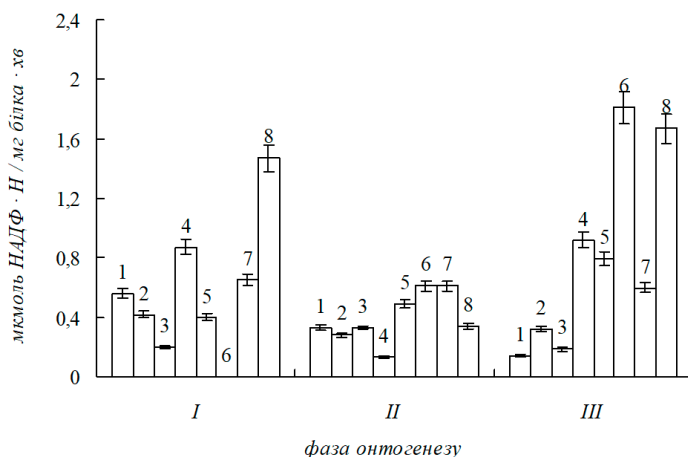


Рис. 3. Вплив посухи на активність глутатіонредуктази у корневих бульбочках сої, інокульованої контрастним за симбіотичними властивостями штамами і Tn5-мутантами *B. japonicum*.

У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та активного Tn5-мутанта В1-20, активність ГР у корневих бульбочках зростала за помірної дії стресу, знижувалась за жорстких умов вирощування та знову підвищувалась після відновлення поливу рослин (рис. 3). На нашу думку, зниження активності ГР за тривалого зневоднення пов'язане із швидким виснаженням пулу ензиму, що обумовлено активним включенням його у роботу вже на початкових етапах дефіциту вологи. Разом із тим, підвищення рівня його активності у післястресовий період на фоні швидкого відновлення активності АПО і СОД у корневих бульбочках, може свідчити про ефективне включення його у роботу захисної системи рослин.

За умов тривалої посухи у рослинах сої, інокульованої малоактивним Tn5-мутантом 107, спостерігалось незначне зростання активності ГР у корневих бульбочках, подібно до активності АПО, на фоні підвищеної активності СОД. Крім того різка інтенсифікація активності ензиму у післястресовий період вказує про його надмірну чутливість до умов вирощування (рис. 3).

У симбіотичній системі, утвореній за участю сої та неактивного штаму ризобій 604к, виявлено підвищення активності ГР у корневих бульбочках за помірною дефіциту вологи, зниження активності ензиму за тривалого зневоднення та різку інтенсифікацію після відновлення поливу рослин (рис. 3). Така реакція ензиму на дію стресу свідчить про активне вклю-

чення його у роботу на початкових етапах зневоднення та порушення його функціонування за тривалого дефіциту вологи. Різке зростання активності ГР у післястресовий період відбувалось на фоні зниження активності СОД і АПО у корневих бульбочках, що вказує на суттєве порушення функціонування антиоксидантної системи та неспроможність цієї симбіотичної системи мобілізувати власні захисні механізми та адаптуватись до стресових умов вирощування.

Обговорення. Нетривалість стаціонарного стану водного балансу рослин обумовлена нестійкістю факторів середовища, динамічністю метаболічних процесів в окремих клітинах і тканинах [22]. Зміни у водному балансі відображаються на рівні і спрямованості фізіологічних процесів, зокрема, змінюється інтенсивність процесів фотосинтезу та дихання, оптимальний перебіг вуглеводневого, азотного й нуклеїнового обмінів, змінюється активність ферментів тощо [22, 23]. Втрата води рослинним організмом ініціює зміни у генній експресії, які зумовлюють зміни регуляторних процесів та метаболізму рослин, що призводить до формування адаптивного потенціалу рослин у несприятливих умовах зростання [23].

Аналіз отриманих результатів показав, що ефективність роботи симбіотичного апарату сої у симбіозі із *V. japonicum* за дії посухи суттєво пригнічувалась, про що свідчить зниження процесів нодуляції та азотфіксації, особливо у симбіотичній системі з малоактивним Tn5-мутантом 107. Після поновлення поливу рослин відбувається ефективніше відновлення симбіотичного апарату у сої, інокульованої активним Tn5-мутантом B1-20, порівняно із інокуляцією активним штамом 646. Однак загальний рівень АФА корневих бульбочок у симбіотичній системі, утвореній за участю активного штаму *V. japonicum* 646, був вище, ніж у симбіотичній системі із Tn5-мутантом B1-20 впродовж онтогенезу. У післястресовий період не зафіксовано відновлення АФА корневих бульбочок сої, за інокуляції малоактивним Tn5-мутантом 107, та пригнічення нодуляційної здатності ризобій за інокуляції сої неактивним штамом 604к.

Адаптація рослин до несприятливих факторів навколишнього середовища пов'язана із формуванням стрес-захисних реакцій, які супроводжуються змінами обміну речовин та структурними перебудовами рослинних клітин. Вивченню активності СОД за дії стресу приділяється особлива увага дослідників, оскільки вона є первинною ланкою захисту від окиснювальних пошкоджень, зупиняючи окиснення клітинних макромолекул ще на стадії ініціації [9, 13]. Доведено, що активність СОД може змінюватись різноспрямовано: в одних випадках відмічено її збільшення, в інших – зниження, що залежить від напруженості дії стресового фактору (інтенсивності та тривалості впливу стресу), а також від адаптаційної здатності рослинного організму [9, 13].

Активація СОД за дії несприятливих чинників є відповіддю на збільшення продукції радикалів супероксиду, що забезпечує захист клітин і тканин рослин від окиснювальних пошкоджень. Збільшення активності ензиму за стресових впливів різноманітної природи може бути обумовлено активацією його латентних форм і (чи) синтезом нових молекул ензиму. Однак при досягненні певного рівня окиснювального стресу відбувається зниження активності ензиму. Причини зниження активності СОД

можуть бути різноманітні, наприклад, виснаження пулу ензиму внаслідок посиленого його витрачання на утилізацію радикалів супероксиду, а також зниження синтезу і (чи) підвищення деградації молекул СОД [13].

Ефективне функціонування СОД значною мірою визначається функціонуванням інших компонентів системи захисту, зокрема, тих, що утилізують H_2O_2 . У ліквідацію пероксиду залучений цілий комплекс ензимів та субстратів. У рослинних клітинах важливим субстратом для відновлення H_2O_2 є аскорбат, тому у системі антиоксидантного захисту значну роль відіграє функціонування аскорбат – глутатіонового циклу [8]. Розпочинає цикл АПО, якій необхідно дві молекули аскорбату для відновлення H_2O_2 до води, що супроводжується утворенням двох молекул монодегідроаскорбату з подальшим швидким утворенням аскорбату та дегідроаскорбату. Відновлення дегідроаскорбату до аскорбату здійснює дегідроаскорбатредуктаза (КФ 1.8.5.1), яка використовує глутатіон як відновник і утворює глутатіон дисульфід. Завершує цикл ГР, яка відновлює глутатіон дисульфід до глутатіону за допомогою НАДФ·Н [8].

Виявлено, що симбіотичні системи, утворені за участю сої та активного штаму *V. japonicum* 646, а також активного Tn5-мутанта В1-20, вирізняються незначними змінами активності антиоксидантних ензимів (СОД, АПО, ГР) у корневих бульбочках впродовж дії зневоднення та швидким відновленням рівня їх активності до контролю у післястресовий період, що супроводжується збереженням ефективності роботи їх симбіотичного апарату.

У корневих бульбочках сої, інокульованої малоактивним Tn5-мутантом *V. japonicum* 107, зафіксовано інтенсифікацію СОД та порушення функціонування аскорбат – глутатіонового циклу за тривалої дії посухи. При цьому відбувалось суттєве пригнічення нодуляційної здатності та АФА симбіотичного апарату сої.

Показано, що за оптимальних умов водозабезпечення рівень активності СОД і АПО у корневих бульбочках сої, інокульованої високовірulentним неактивним штамом *V. japonicum* 604к, був значно вище, ніж у інших досліджуваних симбіотичних системах. Очевидно, це обумовлено особливостями перебігу метаболічних процесів у неефективній симбіотичній системі, у якій зберігається висока нодуляційна здатність, проте відсутня азотфіксувальна функція. Водночас у симбіотичній системі, утвореній за участю сої та неактивного штаму ризобій 604к, зафіксовано пригнічення активності СОД і ГР та підвищення активності АПО у корневих бульбочках за дії посухи та слабке відновлення активності усіх досліджуваних ензимів до контрольного рівня у післястресовий період. Результати свідчать про порушення роботи захисних процесів та низьку здатність рослин у симбіозі з неактивним штамом адаптуватись до стресових умов вирощування.

Отже, формування захисних реакцій рослин сої у симбіозі із *V. japonicum* за дії зневоднення супроводжується активацією СОД, змінами активності ензимів аскорбат – глутатіонового циклу та залежить від здатності симбіотичної системи реалізувати свій адаптаційний потенціал в умовах посухи.

АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ЭНЗИМОВ АСКОРБАТ – ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ *GLYCINE MAX* – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЗАСУХИ

Т.П. Маменко, Ю.А. Хоменко, С.Я. Коць

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина*

Резюме

Цель. Исследовать влияние засухи на активность ключевых антиоксидантных энзимов (супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, аскорбатпероксидазы) в корневых клубеньках сои при инокуляции штаммами и Tn5-мутантами *B. japonicum* с контрастными симбиотическими свойствами. **Методы.** Микробиологические, физиологические, биохимические, газовая хроматография, спектрофотометрия. **Результаты.** Симбиотические системы, созданные при участии сои и активного штамма *B. japonicum* 646, а также Tn5-мутанта В1-20, отличаются адаптационными изменениями активности антиоксидантных энзимов при воздействии обезвоживания, что сопровождается сохранением эффективности работы их симбиотического аппарата. В симбиотических системах, созданных при участии сои и малоактивного Tn5-мутанта 107, а также неактивного штамма *B. japonicum* 604к, обнаружены разнонаправленные изменения активности энзимов в клубеньках при воздействии засухи и слабое восстановление их активности в послестрессовый период. **Выводы.** Формирование защитных реакций сои в симбиозе с *B. japonicum* при воздействии засухи связано с активацией супероксиддисмутазы, изменениями активности энзимов аскорбат – глутатионного цикла и зависит от способности симбиотической системы реализовать свой адаптационный потенциал в условиях стресса.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, соя (*Glycine max* (L.) Merr.), супероксиддисмутазы, глутатионредуктаза, аскорбатпероксидаза, засуха.

ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND ENZYMES OF ASCORBATE – GLUTATHIONE CYCLE IN *GLYCINE MAX* – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* SYMBIOTIC SYSTEMS UNDER DROUGHT CONDITIONS

T.P. Mamenko, Yu.A. Homenko, S.Ya. Kots

*Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,
31/17 Vasylkivska str., Kyiv, 03022, Ukraine*

Summary

Aim. To investigate the effect of drought on the activity of key antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione reductase, ascorbate peroxidase) in the soybean root nodules when inoculated with *B. japonicum* strains and Tn5 mutants with contrasting symbiotic properties. **Methods.** Microbiological, physiological, biochemical, gas chromatography, spectrophotometry. **Results.** Symbiotic systems, formed with the

participation of soybean and the active strain *B. japonicum* 646, as well as the Tn5 mutant B1-20, are differed by adaptive changes in the activity of antioxidant enzymes under the action of dehydration. This is accompanied with saving of work efficiency of their symbiotic apparatus. It is shown that in symbiotic systems formed with the participation of soybean and a low-activity Tn5 mutant 107, as well as an inactive strain of *B. japonicum* 604k, leads to differently directed changes of enzyme activity in nodules under the drought and weak recovery of their activity in the post-stress period. **Conclusions.** Formation of protective reactions of soybeans in symbiosis with *B. japonicum* under the actions of drought is associated with activation of superoxide dismutase, changes in the activity of enzymes of the ascorbate – glutathione cycle and depends from the ability of the symbiotic system to realize its adaptive potential under stress conditions.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), superoxide dismutase, glutathione reductase, ascorbate peroxidase, drought.

1. Kots SY, Morgun VV, Patyka VF et al. [Biological fixation of nitrogen: bean-rhizobial symbiosis]. Kiev: Logos; 2010. 508 p. Ukrainian.
2. Datta A, Singh R, Tabassum S. Isolation, characterization and growth of rhizobium strains under optimum conditions for effective biofertilizer production. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2015; 32(1):199-208.
3. Matamoros M, Dalton D., Ramos J. et al. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol.* 2003; 133: 499-509.
4. Ramalingam A, Kudapa H, Pazhamala LT et al. Proteomics and Metabolomics: Two Emerging Areas for Legume Improvement. *Frontiers in Plant Science.* 2015; 6: 1-21.
5. Kolupaev YuE, Karpets YuV, Oboznyi AI. [Antioxidant system of plants: participation in cellular signaling and adaptation to the action of stressors]. *Visn. Kharkiv national farmer un-th.* 2011; 1(22):6-34. Ukrainian.
6. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002; 7: 405- 410.
7. Yanesi O, Moradi A, Namdari A. Influence of arbuscular mycorrhiza on osmotic adjustment compounds and antioxidant enzyme activity in nodules of salt-stressed soybean (*Glycine max*). *Acta agriculture Slovenica.* 2013; 2(101): 219-230.
8. Konturskaya TO, Palladina TO. [The activity of ascorbate-glutathione cycle enzymes in corn seedlings in conditions of salinization and treatment with adaptogenic preparations]. *Ukr. biochemistry journ.* 2012; 84 (6): 139-144. Ukrainian.
9. Raychaurhuri SS, Deng XW. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The Botanical Review.* 2000; 66(1): 89-98.
10. Yannarelli GG, Fernandez-Alvarez AJ, Santa-Cruz DM. et al. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry.* 2007; 68:505-512.
11. Kreslavsky VD, Los DA, Allahverdiyev SI, Kuznetsov VIV. [Signal role of active forms of oxygen at stress in plants]. *Physiology of plants.* 2012; 59(2): 163-178. Russian.
12. Turpayev KT. [Active forms of oxygen and regulation of gene expression]. *Biochemistry.* 2002; 67(3): 281-292. Russian.
13. Baranenko VV. [Superoxide dismutase in plant cells]. *Cytology.* 2006; 48(60): 465-474. Ukrainian.

14. Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981; 22(5): 867-880.
15. Moran JF, James EK, Rubio MC et al. Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea (*Vigna unguiculata*) root nodules. *Plant Physiol.* 2000; 124: 1381-1394.
16. Dalton DA. Antioxidant defenses of plant and fungi. *Oxidative stress and antioxidant defenses in Biologi.* Ed. J. Ahmad. New York: Chapman and Hall; 1995. p. 298-355.
17. Dalton DA., Baird IM., Langeber L et al. Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soyben (*Glycine max* (L.) Merr.) root nodules. *Plant Physiol.* 1993; 102(1): 481-489.
18. Iturbe-Ormaetxe J, Matamoros MA, Rubio MC. The antioxidant of legume nodule mitochondria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2001; 14: 1189-1196.
19. Grodzinsky AM, Grodzinsky DM. [Brief Directory of Plant Physiology]. Kiev: Science thought; 1964. 388 p. Ukrainian.
20. Hardy RWF., Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 1968; 43(8): 1185-1207.
21. Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilizing: the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; (72): 248-254.
22. Kushnirenko MD. [Water exchange of plants with different water availability due to drought tolerance and productivity]. Chisinau : Shitya; 1989. 229 p. Moldavian.
23. Bray AE. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol.* 1993; 103(5): 1035-1040.

Отримано 21.12.2017