

УДК 581.138.1

СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ В УЧАСТКАХ КОРНЕЙ ГОРОХА, ПРОЯВЛЯЮЩИХ РАЗНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2007 г. **Г. Г. Васильева, А. К. Глянько,
Н. В. Миронова, В. Н. Шмаков**

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук
(Иркутск, Россия)*

Изучали влияние инокуляции клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) на содержание пероксида водорода (H_2O_2) и активность каталазы в участках корней проростков гороха (*Pisum sativum* L.), имеющих разную чувствительность к ризобияльной инфекции, а также активность каталазы в суспензии клубеньковых бактерий. Установлено, что изучаемые показатели изменяются неодинаково в участках корней, отличающихся по степени восприимчивости к микросимбионту, что может быть связано с регуляторными и защитными механизмами растения-хозяина на начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза. Обнаружено, что активность каталазы в суспензии клубеньковых бактерий в 10-30 раз ниже, чем в корнях растения-хозяина, что свидетельствует о низком содержании H_2O_2 в бактериальных клетках.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, восприимчивость к ризобияльной инфекции, пероксид водорода, каталаза

Бобово-ризобияльный симбиоз является регулируемым физиолого-биохимическим процессом. При нормальном функционировании регуляторных систем растение-хозяин определяет оптимальное при данных внешних условиях количество ризобий в тканях корня, а также ограничивает время и место их проникновения [10, 11, 13, 14]. Известно, что не весь корень бобового растения одинаково восприимчив к инфекции клубеньковыми бактериями. Проникновение ризобий происходит только через зону чувствительную к инфекции. У гороха - это небольшой по размерам участок молодых корневых волосков [5, 7]. Ограничено также и время внедрения ризобий [12], что связано со старением корневых волосков, через которые проникновения не происходит. В дальнейшем увеличение количества клубеньковых бактерий

в тканях корня идёт в основном за счёт их размножения.

В регуляции процессов инфицирования и нодуляции в корнях бобовых на начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза могут, по-видимому, принимать участие биологически активные соединения, такие как: фитогормоны, фенолы, активные формы кислорода (АФК), ферменты - пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза [1-4, 15]. Так, показано, что функциональная активность пероксидазы неодинакова в разных по чувствительности зонах корня гороха [1, 2]. Такая же закономерность обнаружена и в отношении фенольных соединений, обладающих про- или антиоксидантной активностью [6]. Нами показано [3, 4], что в корнях проростков гороха уровень АФК, таких как супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$) и пероксид водорода (H_2O_2), после инокуляции растений гороха ризобиями изменяется в зависимости от эффективности и видоспецифичности клубеньковых бактерий. Сделан вывод, что при формировании симбиотических отношений АФК мо-

гут быть задействованы в регуляции инфицирования корней ризобиями как за счёт прямого антибактериального воздействия, так и путём регуляции функциональной активности защитных систем растения-хозяина.

Однако роль АФК в регуляции начальных этапов бобово-ризобиального симбиоза остаётся мало исследованной. Целью настоящей работы была оценка содержания в разных зонах корня одного из важнейших видов АФК - пероксида водорода, и активности каталазы, разлагающей H_2O_2 до воды и кислорода, а также сравнительная оценка активности каталазы в суспензии клубеньковых бактерий и корнях гороха.

МЕТОДИКА

Исходным материалом служили проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Марат селекции Тулунской государственной селекционной станции (Россия). Проростки выращивали в кюветках на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 22 °С в течение 2-х сут.

Инокуляцию корней проводили суспензией клеток *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* эффективного производственного штамма CIAM 1026 (получен из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, Санкт-Петербург, Россия). После инокуляции кюветы с проростками помещали в термостат для дальнейшего роста. Через 1 и 2 сут корни, начиная с апекса, нарезали на участки 0-5 мм (зона I - зона активного роста (меристема и клетки, перешедшие к растяжению)), 5-20 мм (зона II - адгезии и проникновения ризобий), 20-40 мм (зона III - зрелых корневых волосков), от 40 мм и до семени (зона IV - без корневых волосков) [6]. В полученных зонах корня определяли содержание H_2O_2 и активность каталазы. Контролем служили соответствующие зоны корней неинокулированных проростков.

Для определения содержания H_2O_2 использовали метод основанный на окислении *o*-дианизидина, катализируемом пероксидазой [8]. Для этого навеску растительного материала (0,5 - 1,5 г) замораживали в жидком азоте и растирали в фарфоровых ступках в 5%-й уксусной кислоте (для инактивации каталазы и пероксидазы) при добавлении 0,1 г активированного древесного угля (для связывания металлов). С целью предотвращения распада H_2O_2 все процедуры проводили в условиях затемнения. Гомогенат центрифугировали в течение 5

мин при 3000 г. Надосадочную жидкость титровали до pH 8,0 и снова центрифугировали при пониженной температуре в течение 20 мин при 20000 г. К 5 мл полученного экстракта приливали 5 мл реакционной смеси, которую получали смешиванием 50 мл 1 мкМ раствора пероксидазы в натрий-фосфатном буфере (0,12 М, pH 7,0) с 0,5 мл хромогена (0,2 мМ раствор *o*-дианизидиндигидрохлорида). Использовали пероксидазу и *o*-дианизидиндигидрохлорид производства фирмы "ICN" (США). Оптическую плотность регистрировали при $\lambda = 480$ нм. Для построения калибровочной кривой и расчёта содержания H_2O_2 анализировали стандартные растворы H_2O_2 , полученные разбавлением 35 % раствора H_2O_2 и титрованием в 0,1 н серной кислоте 0,1 н перманганатом калия.

Активность каталазы определяли по методу Баха и Опарина [9]. За единицу активности каталазы (*E*) принимали количество фермента, способное за 1 мин разложить 1 мкмоль H_2O_2 .

Для определения активности каталазы в суспензии клубеньковых бактерий готовили бактериальные экстракты методом ультразвукового диспергирования суспензии в калий-фосфатном буфере [13]. Для этого бактериальную суспензию центрифугировали при 7000 г в течение 10 мин при 4 °С. Осадок бактериальных клеток ресуспендировали в 1 мл охлаждённого во льду фосфатного буфера (50 мМ KH_2PO_4 , 0,1 мМ ЭДТА) и диспергировали на ультразвуковом низкочастотном диспергаторе УЗДН-1 ("Медэкспорт", Россия) в течение 5 мин. Полученный бактериальный экстракт очищали центрифугированием при 1000 г в течение 5 мин при 4 °С и использовали для анализа. Активность каталазы рассчитывали на 1 мл бактериальной суспензии (объём, используемый для инокуляции 1 корня гороха).

Средние значения и их стандартные ошибки вычислены из 3-х независимых экспериментов, каждый из которых состоял из трёх биологических повторностей. Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что содержание пероксида водорода имеет неодинаковое распределение по длине корня (табл.1). В зоне активного роста (зона I) содержание H_2O_2 значительно выше (в 2 - 6 раз), чем в других участках корня. Наименьшее содержание

СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Таблица 1

Содержание пероксида водорода (мкг/г сырой массы) в зонах корня,
имеющих разную чувствительность к клубеньковым бактериям

Возраст проростков, сут	Время действия инокулята, сут	Зона корня	Содержание H ₂ O ₂	
			мкг/г	% к контролю
Без инокуляции (контроль)				
3		I	17,0 ± 1,60	
		II	4,3 ± 0,47	
		III	2,8 ± 0,18	
		IV	8,4 ± 1,96	
4		I	18,9 ± 4,30	
		II	3,9 ± 0,50	
		III	3,5 ± 0,59	
		IV	3,7 ± 0,38	
Инокуляция <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CIAM 1026				
3	1	I	19,2 ± 1,12	113
		II	5,6 ± 0,53	130
		III	4,6 ± 0,56	164
		IV	6,6 ± 1,08	79
4	2	I	25,5 ± 3,60	135
		II	5,3 ± 0,38	136
		III	3,6 ± 0,40	103
		IV	3,9 ± 0,27	105

Таблица 2

Активность каталазы в зонах корня,
имеющих разную чувствительность к клубеньковым бактериям

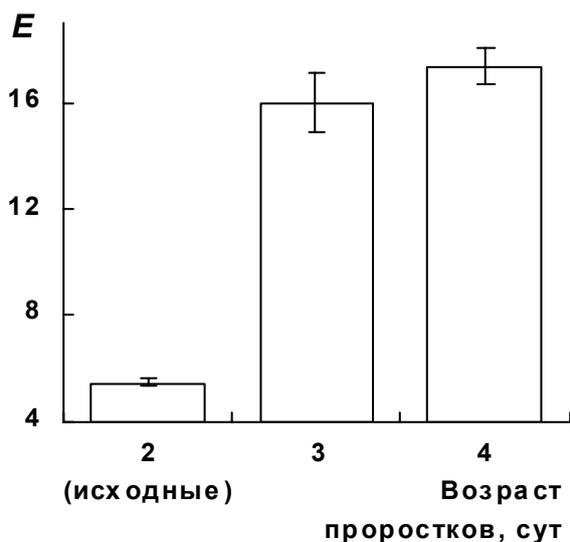
Возраст проростков, сут	Время действия инокулята, сут	Зона корня	Активность каталазы	
			Е*/г сырой массы	% к контролю
Без инокуляции (контроль)				
3		I	270,8 ± 18,3	
		II	125,0 ± 5,5	
		III	173,2 ± 33,0	
		IV	239,6 ± 54,7	
4		I	374,2 ± 2,4	
		II	125,7 ± 1,8	
		III	173,6 ± 1,1	
		IV	160,6 ± 1,8	
Инокуляция <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CIAM 1026				
3	1	I	345,2 ± 40,9	128
		II	114,5 ± 7,9	92
		III	182,6 ± 19,9	106
		IV	207,4 ± 19,6	87
4	2	I	340,4 ± 3,8	91
		II	90,8 ± 6,4	72
		III	138,5 ± 11,5	80
		IV	107,9 ± 5,2	67

Е* - количество мкмоль H₂O₂ разлагаемое каталазой за 1 мин.

пероксида водорода в зоне адгезии и проникновения (зона II) и в зоне зрелых корневых волосков (зона III). В участке корня без корневых волосков (зона IV) содержание H₂O₂ выше, чем в зонах II и III, но меньше, чем в зоне активного роста. Неравномерное распределение пероксида водорода по длине корня может определяться этапом роста клеток и степенью их дифференцировки. Очевидно, что неравномерность такого распределения связана с неодинаковой чувствительностью корня к ризобиальной инфекции. Так, высокое содержание H₂O₂ в зоне

активного роста может объясняться устойчивостью данного участка корня к инфицированию клубеньковыми бактериями. Низкое содержание пероксида водорода в зоне адгезии и проникновения может способствовать колонизации и вторжению ризобий в этот участок корня.

После инокуляции клубеньковыми бактериями содержание H₂O₂ в зоне активного роста оставалось выше, чем в других участках корня (табл. 1), что, как уже отмечено выше, может являться одной из причин её устойчивости к



Активность каталазы в целых корнях проростков гороха сорта Марат (E/корень).

ризобиальной инфекции. Достоверное увеличение (при $P > 0,95$, $v = 4$) содержания H_2O_2 через 1 сут в зоне зрелых корневых волосков (зона III) и тенденция к увеличению в зоне адгезии и проникновения ризобий (зона II) через 1 и 2 сут может свидетельствовать о включении растением-хозяином регуляторных механизмов. Очевидно, что после проникновения определённого количества ризобий растение-хозяин включает регуляторные механизмы, направленные на ограничение дальнейшего проникновения ризобий (в зону II) или размножения и распространения по тканям корня (зона III). Ограничение общего количества ризобий в тканях корня в конечном итоге приведёт к формированию оптимального количества функциональных клубеньков на бобовом растении.

Зоны корня, имеющие неодинаковую чувствительность к ризобиальной инфекции, различались и по активности каталазы (табл. 2). Высокая активность фермента обнаружена в зоне активного роста и в зоне без корневых волосков (зоны I, IV), что, очевидно, связано с большим содержанием здесь H_2O_2 (табл. 1). В зоне адгезии и проникновения (зона II) и в зоне зрелых корневых волосков (зона III) активность каталазы была ниже, очевидно, из-за меньшего содержания H_2O_2 в этих зонах.

Через 1 сут после инокуляции корней ризобиями активность каталазы достоверно не изменялась (табл. 2). Через 2 сут наблюдалось небольшое но достоверное (при $P > 0,95$, $v = 4$) снижение активности фермента во всех зонах корня. Очевидно, что после инокуляции клу-

беньковыми бактериями увеличение содержания H_2O_2 в некоторых зонах корня (особенно в зоне III) происходит в основном за счёт активизации генерации H_2O_2 , а не изменения активности каталазы.

В суспензии клубеньковых бактерий активность каталазы составляла $0,49 \pm 0,06$ мкМ H_2O_2 /(мин·мл) и была в 10-30 раз ниже, чем в корнях растения-хозяина (рисунок), что свидетельствует о низком содержании пероксида водорода в бактериальных клетках. Учитывая тот факт, что место, время и количество проникающих в корень ризобий ограничено, можно предположить, что изменения в содержании H_2O_2 и активности каталазы в корнях гороха на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза определяются в основном растением-хозяином, а не микросимбионтом. Существуют сведения о том, что во время симбиотического взаимодействия люцерны (*Medicago truncatula*) с *Sinorhizobium meliloti* образование $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 происходит в матриксе некоторых инфекционных нитей, окружающем бактерии, но не внутри бактерий или бактериоидов во время развития корневого клубенька [15]. Возможно, что подобное происходит в зонах адгезии и проникновения (зона II) и зоне зрелых корневых волосков (зона III) корней гороха и может быть связано с регулированием инфекционного процесса со стороны растения-хозяина на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза. Однако, для проверки этого предположения требуется проведение гистохимических и электронномикроскопических исследований участков корней гороха с разной чувствительностью к ризобиальной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В., Лузова Г.Б., Сидорова К.К. Роль пероксидазы во взаимодействиях растений гороха с *Rhizobium* // Агрехимия. - 2002. - № 12. - С. 37-41.
2. Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В., Лузова Г.Б., Сидорова К.К. ИУК и пероксидазы в инфицировании ризобиями растений гороха с разной степенью нодуляции // Физиология и биохимия культ. растений. - 2005. - Т. 37, № 1. - С. 58-65.
3. Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. Генерация супероксидных радикалов в проростках гороха при инокуляции азотфиксирующими бактериями разной совместимости // С.-х. биология. - 2001. - № 3. - С. 79-83.
4. Васильева Г.Г., Миронова Н.В., Лузова Г.Б., Глянько А.К. Влияние инокуляции азотфикси-

СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

- рующими бактериями разной эффективности и совместимости на содержание перекиси водорода и активность каталазы в проростках гороха // *Агрехимия*. - 2004. - № 6. - С. 68-72.
5. Макарова Л.Е., Нурминский В.Н. Влияние температуры на локализацию "свободных" фенольных соединений в тканях корней и деформацию корневых волосков у инокулированных *Rhizobium* проростков гороха. // *Цитология*. - 2005. - Т. 47, № 6. - С. 519-525.
 6. Макарова Л.Е., Рудиковская Е.Г., Латышева С.Е. Протекторная роль эндогенных фенольных соединений в процессе инфицирования бактериями *Rhizobium leguminosarum* корней проростков гороха при разных температурах // *Агрехимия*. - 2006. - № 2. - С. 51-57.
 7. Соколова М.Г. Физиологические особенности начальных этапов инфицирования корней гороха *Rhizobium leguminosarum* при разных температурах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Иркутск, 2001. - 21 с.
 8. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П. Пероксидазный катализ и его применение. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. 92 с.
 9. Филиппович Ю.Б., Севастьянова Т.А., Егорова Г.А. Практикум по общей биохимии. - М.: Просвещение, 1982. - 312 с.
 10. Хадри А.-У., Бисселлинг Т. Реакция растений на Nod-факторы // *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. С Пб.: РАСХН, 2002. - С. 435-450.
 11. Bhuvanewari T.V., Turgeon B.G., Bauer W.D. Early events in the infection of soybean (*Glycine max*. L. merr) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells // *Plant Physiol.* - 1980. - V. 66. - P. 1027-1031.
 12. Bhuvanewari T.V., Bhagwat A.A., Bauer W.D. Transient susceptibility of root cell in four common legumes to nodulation by rhizobia // *Plant Physiol.* - 1981. - V. 68. - P. 1144-1149.
 13. Herouart D., Sigaud S., Moreau S., et al. Cloning and characterization of the *kata* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase // *J. Bacteriology* - 1996. - V. 178. - P. 6802-6809.
 14. Roughley R.J., Dart P.J. Root temperature and root hair infection of *Trifolium subterraneum* L. Cranmere // *Plant and Soil*. - 1970. - V. 32, N 2. - P. 518-520.
 15. Santos R., Herouart D., Sigaud S. et al. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Mol. Plant-Microbe Interact.* - 2001. - V. 14, N 1. - P. 86-89.

Поступила в редакцию
07.11.2006 г.

THE CONTENT OF HYDROGEN PEROXIDE AND CATALASE ACTIVITY IN SITES OF PEA ROOTS WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO INFECTION BY NITROGEN-FIXING BACTERIA

G. G. Vasilyeva, A. K. Glyanko, N. V. Mironova, V. N. Shmakov

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
Siberian Division of the Russian Academy of Sciences
(Irkutsk, Russia)*

The content of hydrogen peroxide (H₂O₂) and catalase activity in the root sites of pea seedlings (*Pisum sativum* L.), having different sensitivity to nitrogen-fixing bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) infection and also catalase activity in bacterial cell suspension were studied. Differences in a level of H₂O₂ and catalase activity in root sites of pea seedlings, distinguishing on susceptibility to microsymbiont, were established. It is supposed, that the change in the H₂O₂ level and catalase activity to be connected with regulator and protective mechanisms of the initial stages leguminous-rhizobia symbiosis. It is revealed that catalase activity in bacterial cell suspension at 10-30 times is lower than in roots of the plant-host. It testifies to the low contents H₂O₂ in bacterial cells.

Key words: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, susceptibility to nitrogen-fixing bacteria infection, hydrogen peroxide, catalase activity

ВАСИЛЬЄВА и др.

**ВМІСТ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ І АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ
У ДІЛЯНКАХ КОРЕНІВ ГОРОХУ, ЩО ВИЯВЛЯЮТЬ РІЗНУ ЧУТЛИВІСТЬ
ДО РИЗОБІАЛЬНОЇ ІНФЕКЦІЇ**

Г. Г. Васильєва, А. К. Глянько, Н. В. Миронова, В. М. Шмаков

*Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин
Сибірського відділення Російської академії наук
(Іркутськ, Росія)*

Вивчали вплив інокуляції бульбочковими бактеріями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) на вміст пероксиду водню (H_2O_2) і активність каталази у ділянках коренів проростків гороху (*Pisum sativum* L.), що мають різну чутливість до ризобіальної інфекції, а також активність каталази в суспензії бульбочкових бактерій. Встановлено, що досліджувані показники змінюються неоднаково у ділянках коренів, що відрізняються за ступенем сприйнятливості до мікро симбіонта, що може бути пов'язане з регуляторними і захисними механізмами рослин-живителя на початкових етапах бобово-ризобіального симбіозу. Виявлено, що активність каталази в суспензії бульбочкових бактерій в 10-30 разів нижча порівняно з коренями рослини-живителя, що свідчить про низький вміст (H_2O_2) в бактеріальних клітинах.

Ключові слова: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, сприйнятливість до ризобіальної інфекції, пероксид водню, каталаза