

УДК 579.262:253.4

АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМ СОЇ РІЗНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ НА РАННІХ ЕТАПАХ ФОРМУВАННЯ СИМБІОЗУ

© 2010 р. **Н. М. Мандровська, О. Д. Кругова, С. Я. Коць**

Інститут фізіології рослин і генетики

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Досліджували активність каталази симбіотичних систем сої на початкових етапах розвитку симбіозу. Показано, що каталазна активність у коренях сої за інокуляції бульбочковими бактеріями різної ефективності у період від фази сім'ядольних до фази двох справжніх листків майже не змінювалась і не залежала від активності мікросимбіонту. Встановлено, що у фазі двох справжніх листків активність каталази бульбочок, утворених при ефективному симбіозі, вища, ніж при формуванні малоефективного симбіозу.

Ключові слова: *Glycine max L., Bradyrhizobium japonicum, Tn5-мутанти ризобій, симбіоз, каталаза*

У процесі становлення симбіотичних взаємовідносин між бобовими рослинами і бульбочковими бактеріями у клітинах макро- і мікросимбіонтів відбуваються складні зміни в енергетичному і пластичному обміні. Змінюється вміст і співвідношення амінокислот і вуглеводів, підвищується активність ряду ферментів, пов'язаних із їх обміном (Генетические ..., 1990; Глянько, Васильєва, 2007). Одним із факторів становлення симбіозу є суттєве підвищення активності окисно-відновних процесів у клітинах кореневих бульбочок (Васильєва и др., 2007; Василюк та ін., 2007; Глянько и др., 2007а).

Регуляцію нодуляційного процесу при взаємодії макро- та мікросимбіонтів пов'язують із утворенням активних форм кисню та активністю антиоксидантних ферментів. Одним з ключових антиоксидантних ферментів є каталаза. Вона захищає аеробну клітину від токсичної дії пероксиду водню, який утворюється у біохімічних реакціях із активних форм кисню (Зенков, Меньщикова, 1993; Васильєва и др., 2007; Глянько и др., 2007б). Каталаза компартиментована у спеціальних мікротільцях перокси-

сомах. Вони мають окисний тип метаболізму, який характеризується пластичністю, внаслідок якої ферментний склад пероксисом може варіювати залежно від організму, типу клітин, тканин і зовнішніх умов (Rio et al., 2006). Соя належить до групи рослин із уреїдним обміном, більша частина фіксованого азоту (до 90%) транспортується у формі уреїдів – алантоїна і алантоїнової кислоти. Синтез цих речовин супроводжується виділенням пероксиду водню, який у пероксисомах руйнується каталазою.

Показано, що активність цього ферменту пов'язана з активністю симбіотичної азотфіксації у кореневих бульбочках бобових активно-го і неактивного симбіозу (Троицкая и др., 2000; Жизневская и др., 2001; Мандровська та ін., 2008). Нами встановлено, що активність каталази у кореневих бульбочках сої, інокульованої різними за активністю штамми і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*, пов'язана із ефективністю мікросимбіонта і рівень її при інокуляції активними мутантами ризобій у 1,6-2,0 раза вищий, ніж у бульбочках при формуванні малоефективного симбіозу (Мандровська та ін., 2008). Таким чином, наведені літературні дані свідчать про значну роль каталази на етапі функціонування симбіотичних систем. Однак дані щодо активності цього ферменту на ранніх

етапах утворення симбіозу із мутантами ризо-
бій сої не чисельні.

Метою нашої роботи було дослідити рівень активності ферменту каталази у симбіотичних системах сої, утворених різними за ефективністю ризобіями, на ранніх етапах формування і функціонування симбіозу.

МЕТОДИКА

Вегетаційні досліди проводилися у посудинах об'ємом 5 кг на піщаному субстраті на фоні 0,25 азоту (у формі $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ за Гельрігелем). Насіння сої сорту Мар'яна перед посівом стерилізували 70% етиловим спиртом і промивали стерильною водою. Інокуляцію проводили суспензіями бульбочкових бактерій сої різної активності. У досліді використовували Tn5-мутанти, отримані методом транспозонного мутагенезу із активного штаму *Bradyrhizobium japonicum* 646 в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України із використанням плазмиди pSUP2021 (Simon et al., 1983). Контрольними були рослини, інокульовані вихідним активним штамом *B. japonicum* 646. Використовували активні (21-2, 9-1, 35-2) і малоактивні (107, 113, 118-8) Tn5-мутанти. Схема експерименту передбачала варіант без інокуляції і варіант із обробкою насіння сої неактивним 604к штамом. Титр бактеріальних суспензій становив 10^7 – 10^8 кл/мл. Дані про ефективність досліджуваних Tn5-мутантів ризобій сої представлені у наших попередніх публікаціях (Василюк та ін., 2007; Мандровська та ін., 2008). Відбір зразків проводили у фазі сім'ядольних листків, другого несправжнього листка, першого справжнього і двох справжніх листків. Активність каталази визначали у коренях і бульбочках. Також підраховували кількість бульбочок та вимірювали їх азотфіксуючу активність (Hardy et al., 1968).

Для визначення активності каталази була використана методика Френсіса і Александера (Frensis, Alexander, 1972), суть якої полягає у визначенні залишку вмісту пероксиду водню у реакційній суміші. Каталазну активність визначали при співвідношенні наважки рослинного матеріалу до об'єму 0,25 М калій-фосфатного буферу (рН 7,0) як 1:10 – для коренів 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. Активність ферменту виражали у мікромолях H_2O_2 , розкладеного за 1 хв із розрахунку на 1 г сирової речовини досліджуваного матеріалу.

Аналізи проводили у триразовому біологічному повторенні. Результати обробляли статистично (Доспехов, 1985). У таблицях представлені середні арифметичні значення і їх стандартні похибки.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження активності ферменту каталази у коренях і бульбочках сої проводили на ранніх етапах утворення симбіозу у період від появи сім'ядольних листків до формування другого справжнього листка. Саме у фазі другого справжнього листка бульбочки активно фіксували азот. Дані табл. 1 свідчать, що активність каталази у коренях сої у фазі сім'ядольних листків була найменшою у варіанті без інокуляції. Низька активність ферменту зберігалася в коренях рослин цього варіанта і в наступні фази розвитку, не перевищуючи 78-98 мкмоль H_2O_2 /(г маси сирової речовини · хв). Такий рівень активності каталази, можливо, пов'язаний із відсутністю впливу мікросимбіонта на окисно-відновні процеси, які характерні для коренів сої на ранніх етапах формування симбіозу. У фазі сім'ядольних листків не встановлено істотної різниці активності ферменту між варіантами із інокуляцією вихідним 646 штамом і активними Tn5-мутантами, крім варіантів із обробкою мутантами 9-1, 35-2, 21-2. У цих варіантах каталазна активність дещо перевищувала активність вихідного штаму.

Низький рівень активності досліджуваного ферменту у фазі сім'ядольних листків було виявлено у неактивного 604к штаму, а також у малоєфективних Tn5-мутантів – 107, 113, 118-8. Як видно із даних табл. 1, активність каталази коренів рослин цих варіантів досліді була на рівні неактивного штаму 604к упродовж досліджуваного періоду.

У наступні фази розвитку рослин сої, а саме у фазі другого несправжнього листка і першого справжнього, активність ферменту у коренях варіантів з інокуляцією активним мутантом (21-2) дещо перевищувала значення варіанта з інокуляцією вихідним штамом 646.

Отже, у початковий період росту і розвитку рослин сої, від фази сім'ядольних листків до утворення першого справжнього листка, активність одного із окисно-відновних ферментів – каталази, у коренях майже не змінювалась. Це може бути пов'язано з утворенням невеликої кількості пероксиду водню в інфікованих коренях у даний період розвитку симбіозу. Як відомо із літератури, синтез каталази у пероксисо-

АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ

Таблиця 1. Активність каталази (мкмольН₂О₂/(г маси сирової речовини · хв)) у коренях сої на ранніх етапах розвитку рослин за інокуляції різними за активністю штамми і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum*

Варіант	Фаза розвитку рослин					
	Сім'ядольні листки	% до шт. 646	2-й несправжній листок	% до шт. 646	1-й справжній листок	% до шт. 646
Без інокуляції	83 ± 2,1	69	95 ± 1,7	83	78 ± 1,4	75
Інокуляція штамми						
646 (контроль)	120 ± 3,5	100	120 ± 3,6	100	124 ± 2,7	100
604к	101 ± 1,9	84	111 ± 2,8	93	86 ± 1,8	69
Інокуляція Tn5-мутантами						
9-1	124 ± 4,2	103	119 ± 4,1	99	104 ± 2,9	83
21-2	134 ± 5,3	112	130 ± 2,7	108	126 ± 3,1	121
35-2	130 ± 3,1	108	124 ± 4,2	103	120 ± 3,3	97
107	108 ± 2,9	90	110 ± 3,1	91	92 ± 2,5	74
113	104 ± 2,7	86	114 ± 2,9	95	81 ± 1,7	78
118-8	90 ± 2,1	75	117 ± 3,5	92	85 ± 1,6	82

Таблиця 2. Вплив інокуляції штамми і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* на нодуляційну здатність і азотфіксуючу активність бульбочок у фазі двох справжніх листків

Варіант	Кількість бульбочок, шт./рослину	% до шт. 646	АФА, нмоль С ₂ Н ₄ / (росл./год)	% до шт. 646
Інокуляція штамми				
646 (контроль)	33 ± 2,4	100	526 ± 60,3	100
604к	139 ± 5,4	412	154 ± 7,1	29
Інокуляція мутантами				
9-1	22 ± 2,3	66	697 ± 24,1	132
21-2	35 ± 2,2	106	1008 ± 32,4	191
35-2	26 ± 1,1	78	326 ± 11,2	61
107	15 ± 2,4	45	142 ± 8,7	27
113	19 ± 2,1	57	150 ± 9,1	29
118-8	10 ± 1,3	30	147 ± 5,3	28

мах індукується її субстратом, і для прояву активності ферменту потрібна досить висока кількість пероксиду водню, а у разі відсутності останнього активність ферменту може бути низькою (Rio et al., 2006).

Для оцінки ефективності функціонування симбіотичних систем на ранніх етапах важливим показником є нодуляційна здатність буль-

бочкових бактерій і азотфіксуюча активність утворених бульбочок. Встановлено, що у фазі двох справжніх листків (табл. 2) на коренях сої за інокуляції вихідним штамом 646 налічувалося до 33 бульбочок на рослину, тоді як у неактивного 604к – 139, що у чотири рази більше, але за азотфіксуючою активністю штам 646 перевищував неактивний майже у 3-4 рази. Із даних табл. 2 видно, що у цій фазі (два справжніх

Таблиця 3. Активність каталази (мкмоль H_2O_2 /(г маси сирової речовини · хв)) у коренях і бульбочках сої за інокуляції різними за активністю штамами та Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* у фазі двох справжніх листків

Варіант	Корені	% до шт. 646	Бульбочки	% до шт. 646
Без інокуляції	98 ± 2,1	86	відсутні	0
Інокуляція штамами				
646 (контроль)	112 ± 2,5	100	204 ± 3,4	100
604к	101 ± 1,7	91	178 ± 2,6	78
Інокуляція Tn5-мутантами				
9-1	116 ± 2,7	104	212 ± 4,2	104
21-2	124 ± 3,4	110	240 ± 4,7	118
35-2	120 ± 3,2	107	216 ± 3,8	106
107	106 ± 2,9	95	116 ± 3,9	57
113	102 ± 2,9	91	122 ± 2,7	60
118-8	105 ± 2,0	94	125 ± 3,1	61

листки) всі Tn5-мутанти, крім 21-2, характеризувалися нижчою нодуляційною здатністю, ніж вихідний штам, при цьому, бульбочки, індуковані активними Tn5-мутантами (9-1, 21-2), у 1,3-1,9 раза перевершували вихідний штам за азотфіксуючою активністю. Встановлено, що за інокуляції малоєфективними мутантами ризобій азотфіксуюча активність бульбочок була значно меншою порівняно з вихідним штамом і коливалася в межах 142-150 нмоль C_2H_4 (рослина/год), що у 3,5-3,7 раза нижче порівняно зі штамом 646.

Таким чином, досліджувані мутанти розрізнялись як за вірулентністю, так і за азотфіксуючою активністю, утворювали симбіотичні системи різної ефективності вже у фазі двох справжніх листків. Раніше нами було показано, що такі властивості мутантів зберігаються при функціонуванні симбіозу у наступні фази розвитку рослин сої (Василук та ін., 2007; Мандровська та ін., 2008).

Дані про активність каталази коренів сої і бульбочок за інокуляції штамами (646 і 604к), а також Tn5-мутантами різної ефективності наведені у табл. 3. Показано, що у фазі двох справжніх листків у коренях рослин сої каталазна активність у варіантах з інокуляцією мутантами 9-1, 21-2 і 35-2 на 4-10% перевищувала вихідний штам, тоді як у варіантах із малоєфективними (107, 113, 118-8) була на одному рівні з неактивним штамом 604к. Отже, каталазна активність кореневих бульбочок сої досліджуваних варіантів відрізнялась залежно від активності інокулянту. Найвищий рівень цього ферме-

нту у бульбочках спостерігали у варіанті із інокуляцією Tn5-мутантом 21-2, найнижчий – неактивного штаму 604к. За інокуляції малоактивними мутантами активність ферменту порівняно з контролем була значно нижчою і особливою різницею між варіантами не спостерігалось.

Таким чином, у процесі становлення симбіотичних систем сої різної ефективності на перших етапах розвитку симбіозу (у період від фази сім'ядольних листків до фази двох справжніх листків) активність каталази у коренях сої майже не змінювалася. При цьому активність ферменту у коренях сої не залежала від активності мікросимбіонтів. Одержані нами дані узгоджуються з відомим положенням про те, що активність каталази у бульбочках відображає метаболічні зміни, які відбуваються у клітинах кори коренів при інфікуванні їх ризобіями (Троицкая и др., 2000).

Відомо, що у формуванні симбіотичних відносин крім каталази беруть участь й інші антиоксидантні ферменти, такі як пероксидаза і супероксиддисмутаза. Так, нами показано, що на ранніх етапах утворення симбіозу активність пероксидази коренів сої при інокуляції різними за активністю штамами і мутантами ризобій також не залежить від азотфіксуючої активності штаму-інокулянту (Кругова, 2009). Суттєва різниця за цим показником відзначена нами на етапах активного функціонування симбіозу (починаючи від фази двох справжніх листків і далі, у наступні фази вегетації – бутонізації, цвітіння) (Кругова и др., 2008).

АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ

Таким чином, у бульбочках, утворених вихідним штамом і активними Tn5-мутантами, на відміну від коренів, активність каталази під час інтенсивної азотфіксації (фаза двох справжніх листків), була вищою, ніж при неефективному симбіозі.

ЛІТЕРАТУРА

- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. Содержание пероксида водорода и активность каталазы при инокуляции клубеньковыми бактериями проростков гороха с низкой способностью к нодуляции // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 6. – С. 621-625.
- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. и др. Активные формы кислорода в проростках гороха при взаимодействии с симбиотическими и патогенными микроорганизмами // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 2 – С. 240-246.
- Василюк В.М., Кругова О.Д., Мандровська Н.М., Коць С.Я. Активність пероксидази і каталази у сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 4. – С. 334-342.
- Генетические основы селекции клубеньковых бактерий / Под ред. Б.В. Симарова. – Л.: Агропромиздат, 1990. – 192 с.
- Глянько А.К., Акимова Г.П., Макарова Л.Е. и др. Окислительные процессы на начальных стадиях взаимодействия клубеньковых бактерий (*R. leguminosarum*) и гороха *Pisum sativum* // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007а. – Т. 43, № 5. – С. 576-582.
- Глянько А.К., Акимова Г.П., Соколова М.Г. и др. Защитно-регуляторные механизмы при развитии бобово-ризобиального симбиоза // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007б. – Т. 43, № 3. – С. 289-292.
- Глянько А.К., Васильева Г.Г. Особенности действия активных форм кислорода и азота при бобово-ризобиальном симбиозе // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 3 (12). – С. 27-41.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
- Жизневская Г.Я., Троицкая Г.Н., Бороденко Л.И., Измайлов С.Ф. Пероксидаза и каталаза в корневых клубеньках кормовых бобов при эффективном и неэффективном симбиозе с ризобиями // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 6. – С. 285-290.
- Зенков Н.К., Меньщикова Е.В. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 3. – С. 286-296.
- Кругова О.Д. Активність пероксидази і поліфенолоксидази у симбіотичних системах сої, утворених за участю мутантів *Bradyrhizobium japonicum* на ранніх етапах формування симбіозу // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку / Ред. В.В. Моргун (головн. ред.) та ін. – К.: Логос, 2009. – Т. 1. – С. 428-436.
- Кругова Е.Д., Коць С.Я., Мандровская Н.М., Василюк В.Н. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в клубеньках и корнях сои, инокулированной Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 1 (13). – С. 6-14.
- Мандровська Н.М., Кругова О.Д., Василюк В.М., Коць С.Я. Активність каталази у коренях і бульбочках сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Вісник Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 73-81.
- Троицкая Г.Н., Жизневская Г.Я., Измайлов С.Ф. Каталазная активность клубеньков бобовых с уреидным и амидным типом азотного обмена // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 6. – С. 821-828.
- Frensis A., Alexander M. Catalase activity and nitrogen fixation in legume root nodules // Can. J. Microb. – 1972. – V. 18. – P. 861-868.
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – V. 42, № 8. – P. 1185-1207.
- Rio L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J. et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: production, scavenging and role in cell signalling // Plant Physiol. – 2006. – V. 141, № 2. – С. 330-335.
- Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria // Biotechnology. – 1983. – V. 1, № 11. – P. 784-791.

Надійшла до редакції
30.12.2009 р.

МАНДРОВСЬКА, КРУГОВА, КОЦЬ

**THE CATALASE ACTIVITY OF THE SOYBEAN SYMBIOTIC SYSTEMS
OF DIFFERENT EFFECTIVITY DURING THE EARLY STAGES
OF THE SYMBIOSIS FORMATION**

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

*Institute of Plant Physiology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The catalase activity of the soybean symbiotic systems during the early stages of the symbiosis development was studied. It was shown that the catalase activity of soybean roots under plant inoculation with the nodule bacteria of different effectivity almost was not changed in period from arising of cotyledons leaves to the plant development stage – two real leaves. It was established that the catalase activity of nodules formed in case of the effective symbiosis was higher in compared to the ineffective one.

Key words: *Glycine max L., Bradyrhizobium japonicum, Tn5-mutants of rhizobia, symbiosis, catalase*

**АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОИ
РАЗЛИЧНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НА РАННИХ ЭТАПАХ
ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОЗА**

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

*Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Исследовали активность каталазы симбиотических систем сои на ранних этапах развития симбиоза. Показано, что каталазная активность в корнях сои при инокуляции клубеньковыми бактериями различной эффективности в период от фазы семядольных до фазы двух настоящих листьев почти не изменялась и не зависела от активности микросимбионта. Установлено, что уже в фазе двух настоящих листьев активность каталазы клубеньков, образовавшихся при эффективном симбиозе, выше, чем при формировании малоэффективного симбиоза.

Ключевые слова: *Glycine max L., Bradyrhizobium japonicum, Tn5-мутанты ризобий, симбиоз, каталаза*