

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1:581.557:579.6

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІТНОГО ПРОФІЛЮ КОРЕНІВ СОЇ ЗА ІНОКУЛЯЦІЇ ШТАМАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* РІЗНОЇ АКТИВНОСТІ

© 2016 р. А. С. Левішко, П. М. Маменко

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Досліджували динаміку основних груп низькомолекулярних сполук коренів сої за її інокуляції активним та неактивним штамами *Bradyrhizobium japonicum*. Показано, що період формування бульбочок характеризується суттєвим накопиченням цукрів у коренях інокульованих рослин – понад 17% від усіх метаболітів, порівняно із 11% у контролі. Інокуляція активним штамом збільшує вміст вільних амінокислот до 2%, порівняно з 0,79 і 0,78% у контролі та у варіанті з малоактивним симбіозом, відповідно. Одержані результати свідчать, що процес формування симбіозу активізує синтез і накопичення у коренях інфікованих рослин моно- та олігосахаридів, які є джерелом енергії та попередниками синтезу основних структурних біополімерів. Особливістю активного симбіозу є збільшення вмісту вільних амінокислот, які є основною формою депонування зв'язаного біологічного азоту. Результати досліджень дозволяють припустити, що інокуляція рослин сої індукує синтез органічних сполук, здатних депонувати енергію в клітині.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, *Glycine max*, симбіоз, азотфіксація, метаболіти

У сучасних агробіотехнологіях актуальним є використання феномену біологічної фіксації атмосферного азоту симбіотичними системами бобових. Для цілеспрямованого керування процесом азотфіксації необхідні детальні знання механізмів його перебігу. Складність їх з'ясування зумовлена тим, що будь-яка властивість бобово-ризобіального симбіозу є результатом взаємодії двох геномів, один із яких належить рослині, а інший – мікроорганізму (Коць и др., 2010).

Формування азотфіксуючої кореневої бульбочки, в якій трансформовані у бактероїди ризобії зв'язують молекулярний азот атмосфери за рахунок енергії продуктів фотосинтезу, потребує складної регуляції на біохімічному рівні і включає синтез низки метаболітів, необхідних для реорганізації цитоскелету, зміни гормонального статусу рослини, активації низки ферментів та синтезу ряду сполук, що забезпечують нормальне функціонування нітрогеназ-

ного комплексу (Коць и др., 2011). При цьому коренева система виконує роль важливого метаболічно активного органа рослини, а також забезпечує трофічні взаємовідносини рослини і мікроорганізмів.

Нині дослідження метаболічного профілю рослини за допомогою хроматомас-спектрометрії є найбільш інформативним методом для вивчення особливостей функціонування бобово-ризобіальних систем (Broeckling et al., 2005; Benkeblia et al., 2007; Brechenmacher et al., 2010; Laparre et al., 2011; Obata, Fernie, 2012; Scandiani et al., 2015). Проте переважна більшість цих праць сфокусована на вивченні процесів у періоди доконтактної взаємодії партнерів симбіозу та формування бульбочок. Питання перебігу біохімічних реакцій при фіксації азоту та їх регуляції залишається маловивченим, оскільки потребує створення модельних систем з контрастною азотфіксуючою активністю. Такий підхід дозволить не лише виявити сполуки, безпосередньо залучені до функціонування симбіотичних структур, а й завдяки ідентифікації попередників допоможе з'ясувати шляхи їх утворення, що в перспективі може

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІТНОГО ПРОФІЛЮ

стати основою метаболічної інженерії рослин і мікроорганізмів для створення високопродуктивних симбіозів.

Метою роботи було вивчення динаміки вмісту основних груп низькомолекулярних сполук (амінокислот, спиртів, цукрів, органічних кислот) коренів сої при формуванні нею симбіотичних систем різної активності.

МЕТОДИКА

Об'єктами дослідження були корені рослин сої (*Glycine max* L. Merr.) сорту Васильківська, інокульованої різними за активністю штамми *Bradyrhizobium japonicum* – 646 (активний, високовірулентний) і 604к (неактивний, високовірулентний) із музейної колекції азотфіксуючих мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на манітно-дріжджовому середовищі протягом 7 діб при 26-28°C. Перед посівом насіння сої незаражували протягом 15 хв 70% розчином етанолу, промивали проточною водою та впродовж 1 год інкубували в суспензії бактерій. Контролем слугував варіант без інокуляції.

Рослини вирощували в умовах вегетаційного дослідження в посудинах, попередньо незаражених 20% розчином H_2O_2 , що містили 4 кг піску, за вологості субстрату 60% повної вологості і природного освітлення. Джерелом компонентів мінерального живлення була суміш Гельрігеля, яка містила 0,25 норми азоту. Відбори зразків коренів рослин для аналізу проводили тричі – після завершення формування симбіозу до початку фіксації азоту бульбочками (1 відбір – 35 доба після появи сходів, фаза бутонізації), та в період активної азотфіксації (2 і 3 відбір – 45 і 55 доба після появи сходів, фази цвітіння та масового цвітіння відповідно).

Азотфіксуючу активність визначали ацетиленовим методом (Hardy et al. 1968). Корені з бульбочками поміщали в герметично закриті скляні флакони ємністю 75 мл, в яких створювали 10% концентрацію ацетилену. Тривалість інкубації – 1 год. Після інкубації газову суміш, що містила етилен, утворений у результаті редукції ацетилену нітрогеназою, аналізували на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США) з полуменево-іонізаційним детектором. Розділення газів проводили на колонці (Supelco Porapak N) за температури печі 55°C і температури детектора 150°C. Газоносієм був азот (50 мл за 1 хв). Об'єм аналізованої проби газової суміші становив 1 мл. Як стандарт ви-

користували чистий етилен (Sigma). Кількість етилену, утвореного з ацетилену за 1 год під дією нітрогенази інкубованого зразка, тобто азотфіксацію, виражали у молярних одиницях утвореного етилену на 1 рослину за 1 годину (нмоль або мкмоль C_2H_4 /(рослину · год) – загальна C_2H_2 -відновлювальна активність (АВА)).

Ацетилен, який використовували в дослідах, одержували шляхом дії води на технічний карбід кальцію з подальшим очищенням утвореного газу. Одержаний ацетилен зберігали в газометрах над насиченим розчином хлористого натрію.

Екстракцію та аналіз метаболітів проводили з деякою модифікацією загальноприйнятої методики виділення метаболітів із коренів рослин (Lisec et al., 2006). Для цього відразу після відбору наважки зразків коренів сої заморожували у рідкому азоті та гомогенізували у мікропробірці.

Зразки аналізували на хроматографі «Agilent GC system 7890A» (США) із мас-спектрометром 5975С, із застосуванням HP5MS-капілярної колонки довжиною 30 м, внутрішній діаметр якої 0,25 мм, плівкою щільністю 0,25 мкм та постійним протоком гелію 1 мл/хв. Об'єм зразка, що наносився, становив 2 мкл за температури інжектора 280°C. Початкова температура колонки становила 80°C із затриманням в 5 хв до 300°C зі швидкістю 5°C/хв при затримці 2 хв. Відношення маси до заряду становило від 50 до 650. Діапазон сканування – від 10 до 650.

Отримані спектри обробляли за допомогою програми MSD Chem Station E.02.00.493 (Agilent, США). Для усереднення використовували 4-10 спектрів.

Кількість отриманих метаболітів виражали у відсотках відносно загального їх вмісту або у мг/г зразка.

Всі дослідження проводили в 5-разовому біологічному та 3-разовому аналітичному повторенні. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали з використанням ПЕОМ та із залученням пакетів спеціальних програм Microsoft Excel'10.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Нами було створено дві контрастні модельні системи *Glycine max* – *B. japonicum*, для одної з яких було взято активний штам-стандарт *B. japonicum* 646, а для іншої – *B. japonicum* 604к, малоактивний, проте здатний утворювати бульбочки. Для оцінки активності

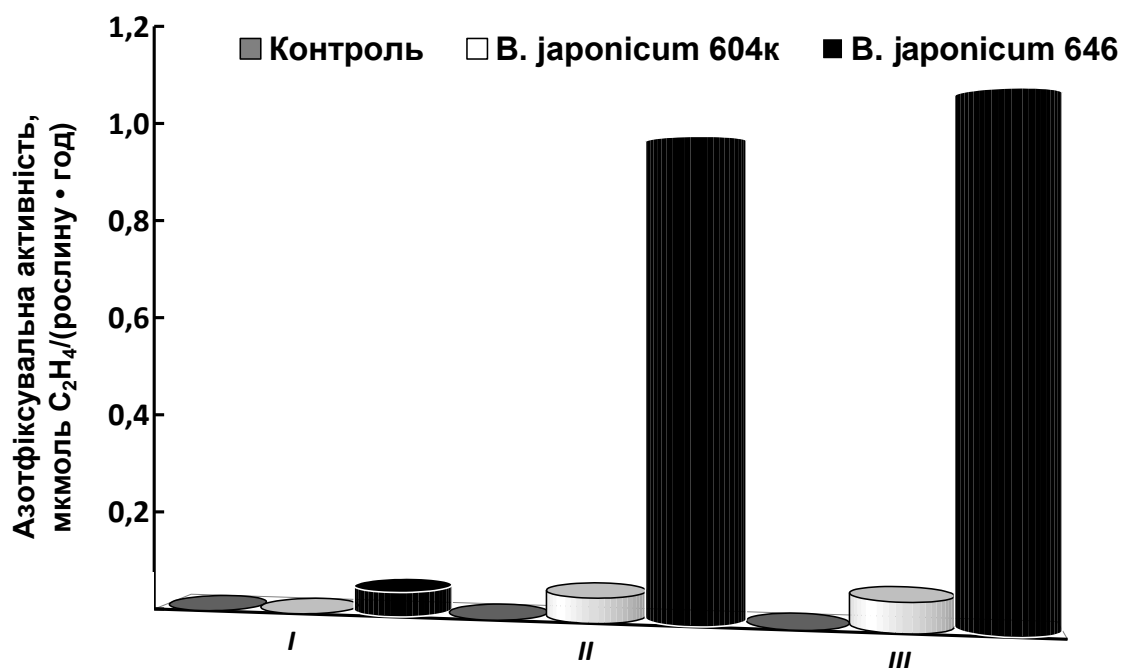


Рис. 1. Азотфіксувальна активність симбіотичних систем сої, інокульованої штамми *V. japonicum* різної активності. Тут і на рис. 3: Контроль – варіант без інокуляції; 604к – інокуляція *V. japonicum* 604к; 646 – інокуляція *V. japonicum* 646. I – 35 доба після появи сходів, фаза бутонізації; II – 45 доба після появи сходів, фаза початку цвітіння; III – 55 доба після появи сходів, фаза масового цвітіння.

створених симбіотичних систем ми вимірювали ацетиленвідновну активність кореневих бульбочок сої, що дозволило продемонструвати потенціал даних штамів до фіксації азоту. Дослідження ацетиленвідновної активності підтвердило низький рівень азотфіксації у симбіотичних системах, створених штамом 604к та її високий рівень при залученні штаму 646 (рис. 1). Тобто нами було утворено контрастні за нітрогеназною активністю симбіотичні системи.

Аналіз мас-спектрів метаболітів коренів інокульованих (активним і неактивним штамми ризобій) та неінокульованих рослин продемонстрував наявність широкого спектра речовин, більшість з яких була ідентифікована та поділена на чотири основні групи за своєю хімічною природою – амінокислоти, цукри, спирти, карбонові кислоти. Загальний спектр летких речовин в екстрактах коренів показано на рис. 2.

Нами виявлено, що формування бульбочок та їх активність суттєво не впливають на якісний склад основних метаболітів у коренях сої. Домінуючою групою (близько 50%) серед виявлених у коренях метаболітів були багатоатомні спирти (таблиця), більшу частину яких становили сахаридоспирти – інозитол, треїтол

та манітол. Відомо, що інозитол є основною депонуємою сполукою фосфору в рослинних клітинах у формі інозитолгексафосфорної (фітинової) кислоти, яка, крім того, є основним хелатором найбільш важливих металів – кальцію, магнію, заліза та цинку. Треїтол та манітол є важливими запасними сполуками вуглецю і енергії в рослинних клітинах та мікроорганізмах (Moing, 2000; Noiraud et al., 2001).

Вміст спиртів у коренях контрольного варіанта становив понад 51% усіх метаболітів, при цьому вміст сполук даної групи за умов інокуляції не перевищував 43% (таблиця). Лише у першому відборі їх вміст у коренях інокульованих варіантів був нижчим від контролю. Це результат того, що, як було зазначено вище, треїтол та манітол є основними запасними сполуками вуглецю та енергії і тому така тенденція ймовірно пов'язана з їх використанням для енергозабезпечення життєдіяльності мікроорганізмів. Протягом наступних двох відборів їх кількість була практично на рівні контролю.

Дослідження динаміки вмісту багатоатомних спиртів (рис. 3Б) у коренях неінокульованих рослин показало, що їх кількість із ростом і розвитком рослин практично не змінювалася. За інокуляції неактивним штамом у період фо-

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІТНОГО ПРОФІЛЮ

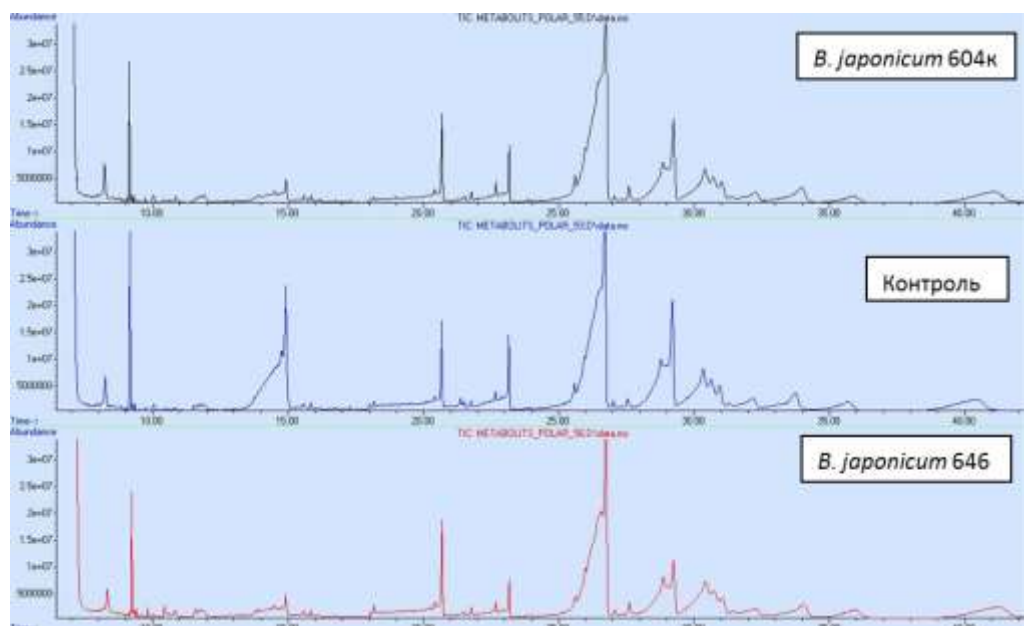


Рис. 2. Загальний вигляд мас-спектрів корневих метаболітів отриманих у контрастних за нітрогеназною активністю симбіотичних систем сої.

Вміст метаболітів у корнях сої (% від загального)

Варіант	Спирти	Цукри	Амінокислоти	Карбонові кислоти
35 доба після появи сходів, фаза бутонізації				
Контроль	51,04	11,16	0,79	37,02
<i>V. japonicum</i> 604к	38,05	17,48	0,78	43,20
<i>V. japonicum</i> 646	43,01	18,87	2,04	36,08
45 доба після появи сходів, фаза цвітіння				
Контроль	51,09	22,64	0,82	22,45
<i>V. japonicum</i> 604к	52,28	18,74	1,01	27,53
<i>V. japonicum</i> 646	50,58	23,00	1,62	24,81
55 доба після появи сходів, фаза масового цвітіння				
Контроль	41,87	30,67	0,94	26,53
<i>V. japonicum</i> 604к	43,63	34,66	0,85	20,86
<i>V. japonicum</i> 646	41,76	33,94	1,05	23,25

рмування бульбочок вміст спиртів був значно нижчим, порівняно з контролем, проте із завершенням даного процесу кількість цих сполук підвищувалася до рівня контрольного варіанта. За інокуляції активним штамом спостерігалася чітка тенденція до підвищення вмісту спиртів, в основному за рахунок енерговмісних інозитолу і манітолу. Відомо, що багатоатомні спирти в рослинах утворюються за рахунок відновлення моносахаридів і можуть виконувати роль вторинних месенджерів у сигналінгу, крім того їх акумуляція є частиною механізму підтримки водного статусу клітин (Stevenson et al., 2000).

Карбонові кислоти були другою за вмістом групою метаболітів (від 43 до 20% від загального вмісту сполук). Серед них ідентифіковано: монокарбонові, що включають ароматичні й аліфатичні, які, в свою чергу, поділяються на насичені та ненасичені; дикарбонові; моносахариди з карбоксильною групою (цукрові кислоти) та інші. Спектр виділених у наших дослідах карбонових кислот складають кислоти циклу Кребса та різних шляхів перетворення піровиноградної кислоти, а також речовини, більшість з яких, як відомо, залучені у різні рослинно-мікробні взаємодії. Всі ці кислоти можуть у невеликій кількості бути присутніми в

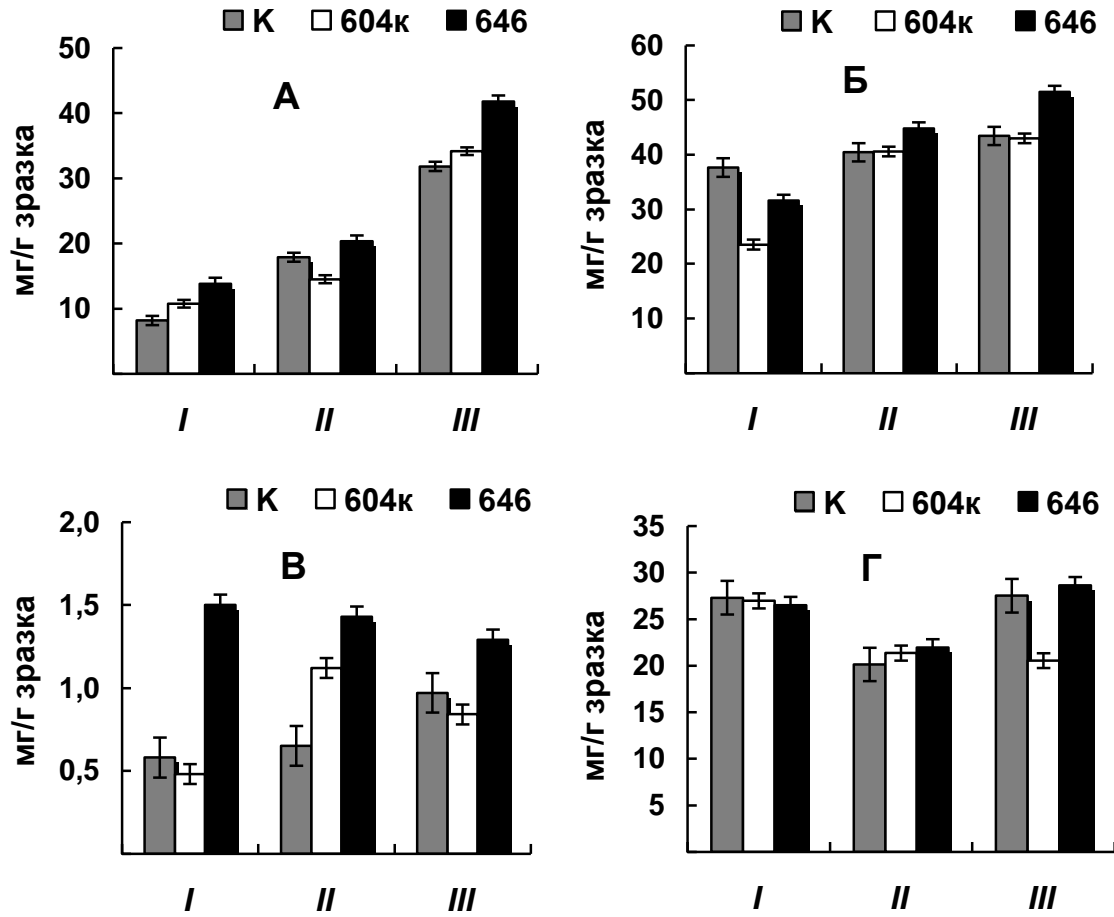


Рис. 3. Динаміка загального вмісту цукрів (А), спиртів (Б), амінокислот (В) та карбонових кислот (Г) симбіотичних систем сої, інокульованої штамми *B. japonicum* різної активності ($M \pm m, n=5$). Позначення, як на рис. 1.

цитоплазмі та накопичуватися у клітині або брати участь у біохімічних перетвореннях (Prell, Poole, 2006). Відомо, що органічні кислоти не тільки діють як проміжні продукти метаболізму вуглецю, а й також як основні компоненти у механізмах, які рослини використовують, щоб подолати дефіцит поживних речовин, та беруть важливу участь у рослинно-мікробних взаємодіях, адже велика їх частка надходить до корневих ексудатів, які можуть стимулювати або інгібувати розвиток мікроорганізмів (López-Vucio et al., 2000; Vadri, Vivanco, 2009).

Вміст карбоних кислот (рис. 3Г) залежав лише від фази розвитку рослин. Фаза початку цвітіння (2 відбір) вирізнялася зниженням їх загального вмісту в усіх варіантах, ймовірно це пов'язано з тим, що в цей період розвитку рослини переважна частина фотоасимілятів (основна частина утворених органічних кислот є продуктом фотосинтезу) залишається у надземній частині рослини, а не надходить у корені. У фазі повного цвітіння ми спостерігали зни-

ження рівня карбонових кислот при інокуляції неактивним штамом, що пов'язано з постійним утворенням неактивних бульбочок на корнях даних рослин у відповідь на нестачу азоту.

Відомо, що розвиток рослин неодмінно супроводжується активним обміном цукрів, які є проміжними продуктами ряду біохімічних циклів та входять до складу багатьох сполук і структурних елементів у рослинних клітинах. Також вони є основою запасних речовин у клітині та мають антиоксидантні властивості, зумовлені здатністю зв'язувати вільні радикали, але їх дія може бути і не прямою, а пов'язаною з метаболічною регуляцією компонентів антиоксидантної системи. Цукри можуть бути залучені в регуляцію утворення і знешкодження активних форм кисню (Rosa, 2009). Вміст розчинних вуглеводів у бульбочках також розглядають як показник інтенсивності надходження до них продуктів фотосинтезу. Збільшення вмісту цукрів при утворенні активного симбіотичного апарату може свідчити про підвищення стійкості рослин сої до стресових чинників за-

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІТНОГО ПРОФІЛЮ

вдяки їх ефективній інокуляції (Couto et al., 2011).

Спектр метаболітів у коренях сої показав (таблиця), що період формування бульбочок (фаза бутонізації) характеризувався значним накопиченням цукрів у коренях інокульованих рослин – понад 18 і 17,5% від усіх метаболітів при інокуляції штамми 646 і 604к відповідно, порівняно із 11% у контролі. У подальшому спостерігалось збільшення кількості цукрів, що відбувалося за рахунок зменшення вмісту карбонових кислот.

Проведені дослідження динаміки вмісту цукрів показали, що їх кількість (рис. 3А) у коренях рослин сої постійно зростала із розвитком рослин (майже в 4 рази протягом усього періоду спостережень), незалежно від наявності симбіотичних систем та їхньої азотфіксуючої активності. Найвищим вмістом цукрів вирізнялись корені рослин, що утворювали активний симбіоз із ризобіями та фіксували атмосферний азот (інокуляція активним штамом *V. japonicum* 646). Оскільки фіксація азоту атмосфери є досить енергоємним процесом, у коренях запасється велика кількість моно- та олігосахаридів, при метаболізмі яких вивільняються значні запаси енергії, необхідної для підтримання симбіозу та біосинтезу багатьох інших сполук.

Найменшою групою метаболітів були амінокислоти (до 2%). Дані біомолекули поряд із вуглеводами виконують у рослинах низку функцій як структурні одиниці білків та основні акумулюючі молекули біологічно зв'язаного азоту. Крім того, амінокислоти, зокрема пролін, є частиною найбільш відомого захисного механізму рослинних клітин, що дозволяє підтримувати водний статус при стресі. Так, за умов водного дефіциту вміст проліну зростає у кілька разів і дана амінокислота діє як осмопротектор, який сприяє утриманню води, що, у свою чергу, запобігає дегідратації білків, збільшує оводненість мембран та стабілізує їх структуру (Колупаєв, Карпец, 2010; Abiotic ..., 2011; Pérez-Clemente et al., 2013).

Нами відзначено, що у коренях рослин сої, що формували активний симбіоз, спостерігалось значне збільшення вмісту вільних амінокислот (таблиця). Так, при обробці штамом 646 вміст даних сполук становив понад 2%, у той час як у контролі та при формуванні малоактивного симбіозу – 0,79 і 0,78% відповідно.

При завершенні формування симбіотичного апарату в період активної фіксації азоту (фази цвітіння і масового цвітіння) вміст основних груп метаболітів істотно не відрізнявся між варіантами досліду, за винятком амінокис-

лот у коренях сої, що формувала активний симбіотичний апарат (рис. 3). У цьому разі вміст амінокислот був у 1,2-1,5 рази вищим порівняно з іншими варіантами, що безсумнівно є результатом ефективної фіксації атмосферного N₂ активним штамом бульбочкових бактерій.

Відомо, що фіксація азоту відбувається шляхом його зв'язування в азотовмісні сполуки і, в першу чергу, в амінокислоти. Спершу відбувається синтез глутаміну шляхом амінування α -кетоглутарату. Усі інші амінокислоти утворюються при трансамінуванні глутаміну (Lodwig et al., 2003). Протягом вегетації у коренях сої було ідентифіковано близько десяти вільних амінокислот. Найвищим був вміст основних п'яти – проліну, гліцину, аланіну, аспарагіну та аспарагінової кислоти. Найвищим вмістом амінокислот в усі досліджувані фази розвитку вирізнялися корені рослин сої, інокульованої активним штамом *V. japonicum* 646 (рис. 3В), що більш ймовірно пов'язано з фіксацією атмосферного азоту та перетворенням його в запасну форму у вигляді амінокислот. Разом із тим, якщо із розвитком рослин у коренях контрольних рослин та інокульованих неактивним штамом відзначалось постійне збільшення вмісту амінокислот, то при інокуляції активним штамом спостерігалась тенденція до зниження вмісту даного класу сполук, хоча в період масового цвітіння вміст амінокислот був значно вищим, ніж у контролі чи при інокуляції неактивним штамом.

Отже, процес формування симбіозу активує синтез і накопичення моно- та олігосахаридів у коренях інфікованих рослин, які є джерелом енергії і попередниками синтезу основних структурних біополімерів. Крім того, у відповідь на інокуляцію рослини синтезують низку сполук, які є відомими активними компонентами систем захисту рослин на дію стресу. В той же час реакція рослини на інфікування не залежить від властивості штаму формувати активний чи неактивний симбіоз. Функціонування симбіотичного апарату не викликає значних метаболічних змін. Єдиною особливістю активного симбіозу є вищий вміст вільних амінокислот, які є основними продуктами депонування зв'язаного біологічного азоту.

Таким чином, лише у період формування симбіотичного апарату (на відміну від активно функціонуючих бульбочок) у коренях бобових активується синтез органічних сполук, задіяних у депонуванні енергії клітин та, ймовірно, підвищенні стійкості рослин до несприятливих чинників.

ЛІТЕРАТУРА

- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа, 2010. – 351 с.
- Коць С.Я., Моргу́н В.В., Патька В.Ф., Даценко В.К., Кругова Е.Д., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н., Михалкив Л.М. Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобиальный симбиоз. – Киев: Логос, 2010. – Т. 1. – 505 с.
- Коць С.Я., Моргу́н В.В., Патька В.Ф., Маличенко С.М., Маменко П.Н., Киризий Д.А., Михалкив Л.М., Береговенко С.К., Мельникова Н.Н. Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобиальный симбиоз. – Киев: Логос, 2011. – Т. 2. – 523 с.
- Abiotic stress response in plants – physiological, biochemical and genetic perspectives* / Eds. A.K. Shanker, B. Venkateswarlu. – Rijeka, Croatia: InTech, 2011. – 346 p.
- Badri D.V., Vivanco J.M. Regulation and function of root exudates // *Plant Cell Environ.* – 2009. – V. 32. – P. 666-681.
- Benkeblia N., Shinano T., Osaki M. Metabolite profiling and assessment of metabolome compartmentation of soybean leaves using non-aqueous fractionation and GC-MS analysis // *Metabolomics.* – 2007. – V. 3. – P. 297-305.
- Brechenmacher L., Lei Z., Libault M., Findley S., Sugawara M., Sadowsky M.J., Sumner L.W., Stacey G. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* // *Plant Physiol.* – 2010. – V. 153. – P. 1808-1822.
- Broeckling C.D., Huhman D.V., Farag M.A., Smith J.T., May G.D., Mendes P., Dixon R.A., Sumner L.W. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56. – P. 323-336.
- Couto C., Silva L.R., Valentão P., Velázquez E., Peix A., Andrade P. Effects induced by the nodulation with *Bradyrhizobium japonicum* on *Glycine max* (soybean) metabolism and antioxidant potential // *Food Chem.* – 2011. – V. 127. – P. 1487-1495.
- Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.S. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // *Plant Physiol.* – 1968. – V. 43. – P. 1185-1207.
- Laparré J., Balzergue C., Rochange S., Ludwiczak P., Letisse F., Portais C., Bécard G., Puech-Pages V. Metabolite profiling of pea roots in response to phosphate availability // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – V. 6. – P. 837-839.
- Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A.R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants // *Nature Protocols.* – 2006. – V. 1. – P. 387-396.
- Lodwig E.M., Hosie A.H.F., Bourde's A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J.A., Poole P.S. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–Rhizobium symbiosis // *Nature.* – 2003. – V. 422. – P. 722-726.
- López-Bucio J., Nieto-Jacobo M., Ramírez-Rodríguez V., Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils // *Plant Sci.* – 2000. – V. 160. – P. 1-13.
- Moing A. Sugar alcohols as carbohydrate reserves in some higher plants // *Carbohydrate Reserves in Plants. Synthesis and Regulation.* – 2000. – V. 26. – P. 337-358.
- Noiraud N., Maurousset L., Lemoine R. Transport of polyols in higher plants // *Plant Physiol. Biochem.* – 2001. – V. 39. – P. 717-728.
- Obata T., Fernie A.R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. – V. 69. – P. 3225-3243.
- Pérez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., López-Clement M.F., Muñoz V., Gómez-Cadenas A. Biotechnological approaches to study plant responses to stress // *Bio. Med. Res. Int.* – 2013. – V. 2013. – P. 1-10.
- Prell J., Poole P. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules // *Trends Microbiol.* – 2006. – V. 14. – P. 161-168.
- Rosa M., Prado C., Podazza G., Interdonato R., González J. A., Hilal M., Prado F.E. Soluble sugars – metabolism, sensing and abiotic stress // *Plant Signal. Behav.* – 2009. – V. 4. – P. 388-393.
- Scandiani M.M., Luque A.G., Razori M.V., Casalini L.C., Aoki T., O'Donnell K., Cervigni G.D.L., Spampinato C.P. Metabolic profiles of soybean roots during early stages of *Fusarium tucumaniae* infection // *J. Exp. Bot.* – 2015. – V. 66. – P. 391-402.
- Stevenson J.M., Perera I.Y., Heilmann I., Persson S., Boss W.F. Inositol signaling and plant growth // *Trends Plant Sci.* – 2000. – V. 5. – P. 252-258.

Надійшла до редакції
22.08.2015 р.

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІТНОГО ПРОФІЛЮ

PECULIARITIES OF METABOLIC PROFILE OF SOYBEAN ROOTS INOCULATED BY *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS WITH DIFFERENT SYMBIOTIC ACTIVITY

A. S. Levishko, P. M. Mamenko

*Institute of Plant Physiology and Genetics of
National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
e-mail: alodua2@gmail.com*

The dynamics of major groups of low molecular weight compounds of soybean roots inoculated with active and inactive strains of *Bradyrhizobium japonicum* were investigated. It is shown that the period of formation of nodules was characterized by substantial accumulation of sugars in the roots of inoculated plants. More than 17% of sugars with respect to all metabolites were found in inoculated plants whereas there were only 11% of sugars in control. Inoculation with active strain increases the levels of free amino acids to 2% compared with control plants (0,79%) and inactive symbiosis (0,78%). The results show that the formation of symbiosis activates the synthesis and accumulation of mono- and oligosaccharides, as a source of energy and precursors for the synthesis of major structural biopolymers in the roots of infected plants. The increase of free amino acids that are the main way to deposit linked biological nitrogen is the peculiarity of active symbiosis. The studies suggest that the inoculation of soybean plants induces the synthesis of organic compounds that can hold energy level of cells.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, *Glycine max*, symbiosis, nitrogen fixation, metabolites

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛІТНОГО ПРОФІЛЮ КОРНЕЙ СОИ ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ ШТАММАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* РАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

А. С. Левишко, П. Н. Маменко

*Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)
e-mail: alodua2@gmail.com*

Исследовали динамику основных групп низкомолекулярных соединений корней сои при ее инокуляции активным и неактивным штаммами *Bradyrhizobium japonicum*. Показано, что период формирования клубеньков характеризуется существенным накоплением сахаров в корнях инокулированных растений – более 17% от общего содержания метаболитов, по сравнению с 11% в контроле. Инокуляция активным штаммом увеличивает содержание свободных аминокислот до 2% по сравнению с контролем (0,79%) и малоактивным симбиозом (0,78%). Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс формирования симбиоза активирует синтез и накопление в корнях инфицированных растений моно- и олигосахаридов, которые являются источником энергии и предшественниками синтеза основных структурных биополимеров. Особенностью активного симбиоза является увеличение содержания свободных аминокислот, являющихся основной формой депонирования связанного биологического азота. Результаты исследований позволяют предположить, что инокуляция растений сои индуцирует синтез органических соединений, способных повышать энергизацию клеток.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, *Glycine max*, симбиоз, азотфиксация, метаболиты