

УДК УДК 581.1

**АКТИВНІСТЬ ГВАЯКОЛ- І АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ ТА
БІЛКОВИЙ СКЛАД КОРЕНІВ СОЇ У ПЕРІОД ФОРМУВАННЯ І НА
ПОЧАТКУ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМ
*GLYCINE MAX – BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

© 2013 р. Г. М. Дрозденко¹, П. М. Маменко², С. Я. Коць²

¹Уманський державний педагогічний університет ім. П.Г. Тичини

(Умань, Черкаська обл., Україна)

²Інститут фізіології рослин і генетики

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Вивчали активність окисно-відновних ферментів і склад загального пулу білків у коренях сої, інокульованої штамми й Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* різної активності, у період формування та на початку функціонування симбіозу. Встановлено, що активність гваяколпероксидази залежить від нодуляційної активності мікосимбіонта, а аскорбатпероксидази – пов'язана з інтенсивністю азотфіксації. Показано, що інокуляція рослин викликає не залежну від ефективності штаму експресію генів і активний синтез білків, відповідальних за формування симбіозу. Активізація функціонування азотфіксуючого апарату сприяла збільшенню загального вмісту білків у коренях рослин, інфікованих активними ризобіями. Особливостей у активності окисно-відновних ферментів та білкового складу коренів сої за інокуляції бульбочковими бактеріями із контрастними симбіотичними властивостями виявлено не було, що вказує на ідентичність низки фізіологічних процесів при формуванні симбіозу різної ефективності у сої.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, симбіоз, Tn5-мутанти, гваяколпероксидаза, аскорбатпероксидаза, протеїни

Симбіотична взаємодія між бобовими рослинами і бульбочковими бактеріями є складним фізіологічним процесом, який регулюється системою сигналіngu між макро- і мікосимбіонтами (Тарчевский, 2000; Хадри и др., 2002).

Аналогічно патогенезу інвазія ризобій у клітини кореневих волосків бобових викликає інтенсифікацію окиснювальних процесів у рослинних клітинах, що супроводжується підвищенням вмісту активних форм кисню (Mittler, 2002), які, у свою чергу, суттєво впливають на проникнення бактерій у рослинні тканини. На думку ряду авторів (Herouart et al., 2002; Matamoros et al., 2003) окислювальний «вибух»

на початкових стадіях формування бобово-ризобіального симбіозу може виконувати двояку роль: гальмування захисних реакцій організму при проникненні ризобій, чи, навпаки, активація механізму захисту при несприятливих умовах для симбіозу. Відомим є той факт (Ramu et al., 2002; Shaw et al., 2003), що Nod-фактори стимулюють окиснювальний вибух, щоб блокувати індукцію генів нодуляції у рослин при несумісній взаємодії. Протеомний аналіз інфікованих *B. japonicum* кореневих волосків сої також показав, що у відповідь на інфікування ризобіями рослина реагує посиленням синтезом окисно-відновних ферментів – пероксидаз та фенілаланінамонійліази (Wan et al., 2005). Варто відзначити, що на пізніших стадіях формування симбіотичних систем бобових, коли кількість ризобій у коренях досягає певної величини, рослина-хазяїн може включати механізми генерації активних форм кисню і акти-

Адреса для кореспонденції: Дрозденко Галина Миколаївна, Уманський державний педагогічний університет ім. П.Г. Тичини, вул. Садова, 2, Умань, Черкаська обл., Україна;
e-mail: biofactor@ukr.net

АКТИВНІСТЬ ГВАЯКОЛ- І АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ

увати антиоксидантну систему для регуляції процесу бульбочкоутворення (Matamoros et al., 2003).

Формування бобово-ризобіального симбіозу також супроводжується трансформацією партнерами симбіозу власного метаболізму, і, в першу чергу, складу білків відповідно до потреб взаємовигідного співіснування (Коць и др., 2011).

Аналізуючи зміни складу білків на початковій стадії розвитку бульбочок, Вон зі співавт. (Wan et al., 2005), застосувавши метод двомірного гель-електрофорезу (2-DE) для розділення білків, ізольованих із інфікованих кореневих волосків сої, показали диференціальну експресію 133 рослинних білків, пов'язаних із важливими процесами, такими як реорганізація цитоскелету, ліпідний сигналінг, регулювання зв'язування цукрів. Цими ж авторами показано, що 12 білків у більшій кількості синтезуються в корневих волосках, ніж у коренях. До них належать хітинази класу I, протеїнази з кальмодуліновим доменом, фосфоенолпіруваткарбоксілаза, аскорбатпероксидази. Моніторинг за допомогою 2-DE рослин конюшини в перші 48 год після інокуляції показав утворення 16 нових плям на гелі в екстрактах білків коренів інфікованих рослин (Mogis et al., 2001). Секвенування дозволило ідентифікувати ці плями як білки, що беруть участь у реорганізації цитоскелету, розпізнаванні цукрів і згортанні білків, що свідчить про схожість цих процесів у бульбочках різних видів бобових. У корневих волосках спостерігалася підвищена експресія фосфоенолпіруваткарбоксілази, що залучена у синтез дикарбонових кислот – основного джерела вуглецю для бактероїдів (Rosendahl et al., 1990; Streeter 1995).

Отже, фізіологічна взаємодія партнерів симбіозу активізує каскад біохімічних реакцій, спрямованих на подолання захисних реакцій рослинного організму на інвазію бактерій та формування ефективних механізмів обміну метаболітами між макро- і мікросимбіонтами.

Разом із тим питання впливу ризобій із різноманітними симбіотичними властивостями на характер фізіологічної відповіді рослини-хазяїна на інокуляцію та особливості формування симбіотичних систем залишається маловивченим.

Метою нашої роботи було дослідження активності гваякол- і аскорбатпероксидази та складу протеїнів коренів сої за інокуляції шта-

мами і Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* із контрастними симбіотичними властивостями.

МЕТОДИКА

У роботі використано активний (646) та неактивний (604к) штами *B. japonicum* із музейної колекції азотфіксуючих мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ НАНУ), а також Tn5-мутанти штаму 646 – активні 9-1 і 21-2 та малоактивні 107 і 113, отримані методом транспозонового мутагенезу у відділі симбіотичної азотфіксації ІФРГ (Маліченко та ін., 2007, Маменко та ін., 2008). Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на манітно-дріжджовому середовищі протягом 9 діб при 26-28°C (Гродзинский и др., 1964).

Сою (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Мар'яна вирощували по 6-8 рослин на промитому річковому піску (60 % повної вологоємності) за умов природного освітлення у 7-кілограмових посудинах, які попередньо стерилізували 20 % розчином H_2O_2 . Джерелом мінерального живлення була суміш Гельрігеля (Гродзинский и др., 1964), збагачена мікроелементами молібденом, бором, марганцем і міддю та збіднена на азот – 0,2 норми (одна норма азоту становить 708 мг $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ на 1 кг піску). Перед посівом простерилізоване 70 % етанолом і промите під проточною водою протягом 1 год насіння інокулювали суспензіями бульбочкових бактерій різної ефективності, кількість бактерій становила 10^7 клітин у 1 мл. Відбір зразків для аналізу проводили на 11, 15, 18, 23 і 25-у добу після появи сходів. Досліди проводили у 7-разовому повторенні.

Азотфіксуючу активність (АФА) визначали ацетиленовим методом (Hardy et al., 1968; Старченков, 1984) на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США) з полуменевоїонізаційним 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). Визначення проводили у 5-разовому повторенні.

Для отримання ферментного екстракту наважку коренів із бульбочками (0,2 г) розтирали у ступці з 4 мл охолодженого до - 5 °C 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,5), який містив 2 мМ ЕДТА, 1 мМ фенілметансульфонілфторид,

5 мМ β-меркаптоетанолу і 1% (в/о) полівінілпіролідону. Гомогенат центрифугували при 14 000 об./хв протягом 20 хв при 4°C. Супернатант використовували для вимірювання активності ферментів.

Активність гваяколпероксидази (ГП) (КФ 1.11.1.7) визначали за збільшенням оптичної густини при 470 нм у результаті окиснення гваяколу ($E = 26,6 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) у присутності пероксиду водню, згідно з методикою Amako et al., (1994). Реакційне середовище містило: 60 мМ фосфатний буфер (рН 6,0), 1% гваякол, 10 мМ H_2O_2 і 100 мкл ферментативного екстракту. Реакцію розпочинали додаванням пероксиду водню. Оптичну густину вимірювали протягом 3 хв. Активність ферменту виражали в одиницях активності (ОА) за 1 хв на 1 мг білка.

Активність аскорбатпероксидази (АП) (КФ 1.11.1.11) визначали за зменшенням оптичної густини при 290 нм у результаті окиснення аскорбінової кислоти ($E = 2,8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) в присутності пероксиду водню, згідно з методиками (Nakano et al., 1981; Amako et al., 1994). Реакційне середовище містило: 60 мМ фосфатний буфер (рН 7,0), 250 мкМ аскорбінової кислоти, 0,1 мМ ЕДТА, 1,5 мМ H_2O_2 і 100 мкл ферментативного екстракту. Вимірювання оптичної густини проводили протягом 3 хв після додавання пероксиду водню. При вимірюваннях контролювали неспецифічне окислення аскорбату. Активність ферменту виражали в одиницях активності (ОА) за 1 хв на 1 мг білка. Вимірювання оптичної густини проводили на спектрофотометрі SmartSpec Plus ("BIORAD", США). Визначення проводили у 5-разовому повторенні.

Вміст сумарного розчинного білка у ферментному та білковому екстрактах визначали за Bradford (1976).

Білкові екстракти отримували за методом (Saravanan et al., 2004). Із цією метою корені заморожували в рідкому азоті, розтирали у фарфоровій ступці і екстрагували білки протягом 10 хв при кімнатній температурі буферним розчином такого складу: 75 мМ трис-НСІ рН 8,0, 10 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ, 10% ДДС-На та 0,3% меркаптоетанолу. Отриманий білковий екстракт осаджували ацетоном з додаванням 10 % трихлороцтової кислоти за температури – 18°C протягом 2 год. Після цього суміш центрифугували, супернатант відкидали, а осад двічі промивали ацетоном. Далі осад висушували від залишків ацетону під вакуумом і додавали буфер для зразків наступного складу: 0,5

М трис-НСІ (рН 6,8), 10% ДДС-На, 0,2% гліцерину, 0,04% меркаптоетанолу та 0,01 % бромфенолового синього.

Якісний склад протеїнів досліджували методом градієнтного електрофорезу в 12–20 %-ному поліакриламідному гелі з ДДС-На за методикою Лемлі (Laemmly, 1970). У кожну лунку вносили 50 мкл зразка, а також маркер молекулярних мас (Fermentas, Латвія). Використовували вертикальний електрофорез (Cleaver scientific, Нідерланди), пластинки розміром 200×200×2 мм. Сила струму у концентруючому гелі 25 мА, у розділювальному – 80 мА. Гелі фіксували в суміші етанол–оцтова кислота–дистильована вода (5 : 4 : 1 за об'ємом). Цю суміш використовували як розчин для відмивання гелю після фарбування. Аналіз гелів проводили за допомогою програми Total Lab версії 2.1. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали методом дисперсійного аналізу з використанням ПЕОМ і з залученням пакетів спеціальних програм Microsoft Excel'10 та Statgraphics Plus 3.0. На графіках представлені середні значення та середньоквадратичні відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

До 15-ї доби після появи сходів АФА була повністю відсутня (рис. 1). Симбіотичні системи, сформовані ефективними штамми та Tn5-мутантами, починали фіксувати атмосферний азот на 18-у добу після появи сходів. У цей час у варіантах з інокуляцією активними штамом 646 та Tn5-мутантами *B. japonicum* 9-1 та 21-2 було відзначено незначну АФА, яка продовжувала зростати, і на 23-ю добу становила 0,28, 0,30 і 0,32 мкмоль C_2H_4 /(рослину×год) відповідно.

На 25-у добу зазначені штам і Tn5-мутанти в симбіозі з рослинами сої суттєво відрізнялися за рівнем АФА і при цьому значно (в 5–20 разів) перевищували за цим показником малоактивні Tn5-мутанти 107 і 113 (рис. 1).

Активність ГП у коренях рослин сої в усіх без винятку варіантах, де застосовували інокуляцію рослин, була вищою порівняно із контролем (без інокуляції) (рис. 2).

Підвищення рівня активності ГП у коренях бактеризованих рослин було виявлено вже на 15-у добу після появи сходів. У цей період активність ГП у коренях сої, інокульованої Tn5-мутантом 21-2, була найвищою, що можна пояснити формуванням удвічі більшої кількості

АКТИВНІСТЬ ГВАЯКОЛ- І АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ

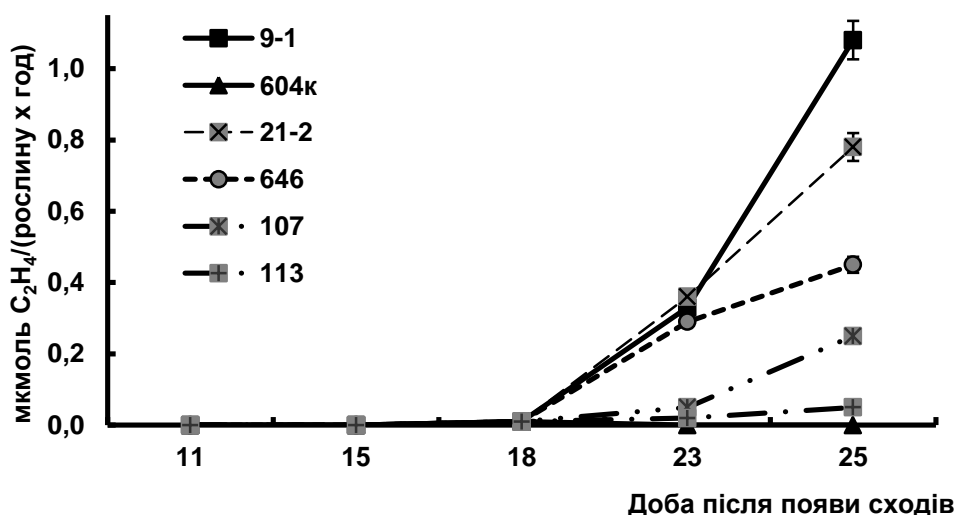


Рис. 1. Загальна АФА (мкмоль C₂H₄/(рослину × год)) сої сорту Мар'яна, інюкульованої штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum* різної ефективності.

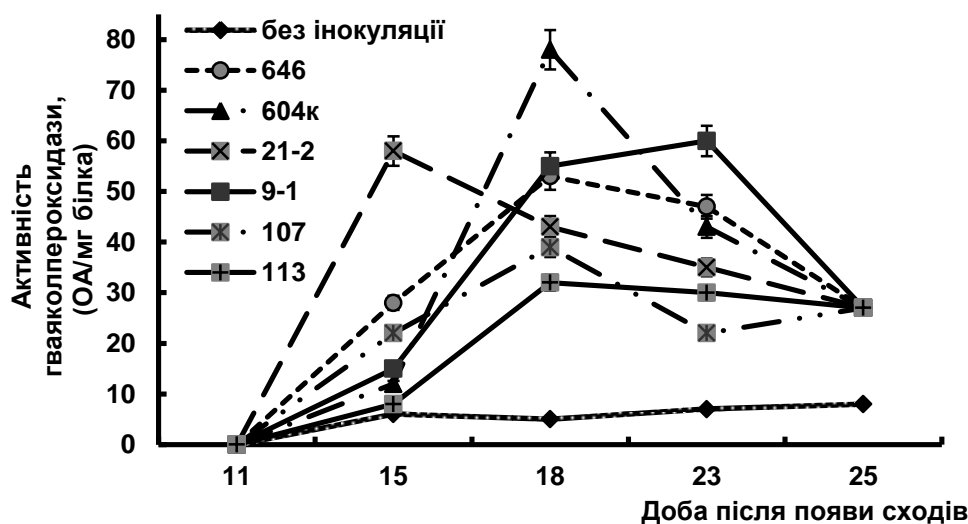


Рис. 2. Динаміка активності ГП у коренях сої за інюкляції різними за активністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*.

бульбочок порівняно із іншими інюкульованими варіантами (Маменко та ін., 2008). Варто зауважити, що у даному варіанті процес формування симбіотичного апарату на наступних

фазах розвитку симбіозу уповільнювався. Відзначений на початкових етапах тісний зв'язок між рівнем ГП та вірулентністю штамів було підтверджено і надалі. Так, у штамів 604к і 646 та малоактивних Tn5-мутантів 107 і 113 максимальне зростання рівня ГП спостерігалось на 18-у, а у Tn5-мутанта 9-1 – на 23-ю добу, що прямо корелювало з їх нодуляційною активністю ($r = 0,83$) протягом цього періоду (Маменко та ін., 2008). На 25-у добу відзначали зменшення інтенсивності бульбочкоутворення, а також зниження активності ГП. Такий ефект уз-

годжується з феноменами, виявленими іншими авторами. Так, Раму зі співавт. (Ramu et al., 2002) було встановлено, що обробка рослин *Medicago truncatula* бактеріями *Sinorhizobium meliloti* або очищеними Nod-факторами призводила до утворення пероксидів у зоні інфекції. У ряді робіт (Dalton, 1995; Dalton et al., 1998) було показано, що активація ГП спостерігається при генерації активних форм кисню, які утворюються у відповідь на інфекцію ризобіями коренів бобових рослин, і забезпечує нормальний перебіг окиснювальних процесів і регулювання таким чином процесу нодуляції коренів бобових рослин. Крім того, існує ще один механізм дії пероксидази, пов'язаний із наявністю у ферменту специфічного центру зв'язування індоліл-3-оцтової кислоти (Kawano

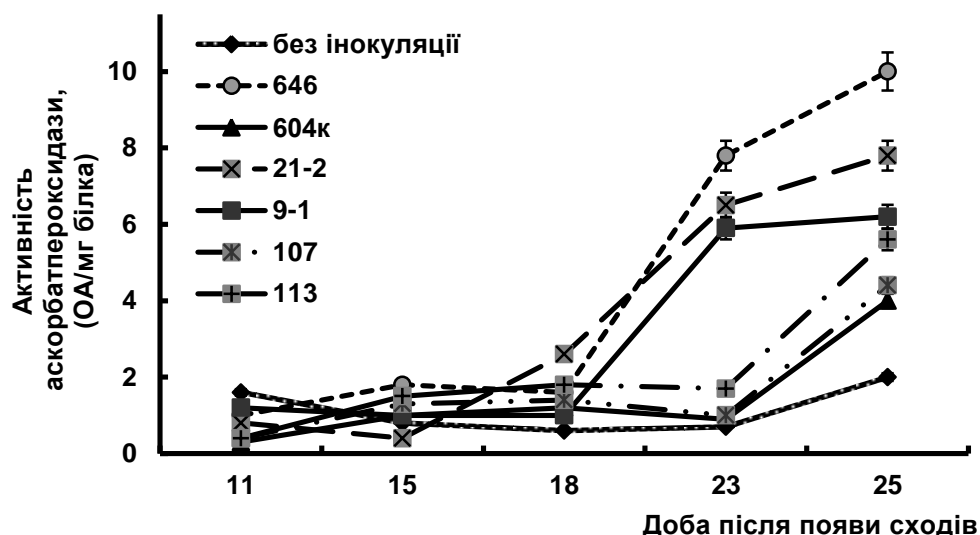


Рис. 3. Динаміка активності АП у коренях сої за інокуляції різними за активністю штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum*.

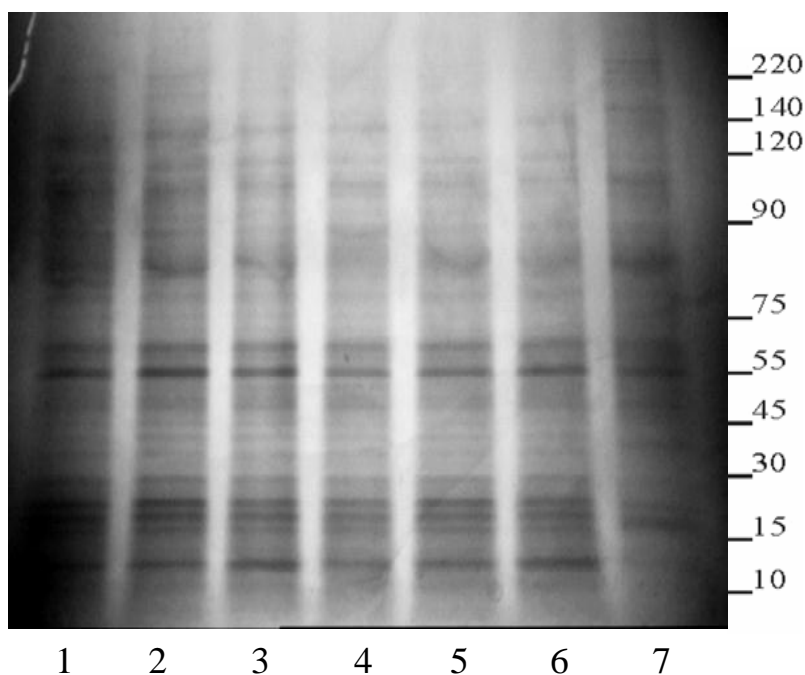


Рис. 4. Електрофореграма білків, екстрагованих із коренів із бульбочками сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* різної ефективності (12 доба після сходів). Без інокуляції (7); штамми: 604к (1), 646 (2); Tn5-мутанти: 21-2 (3), 107 (4), 9-1 (5), 113 (6).

et al., 2001; Kawano et al., 2002). Саме завдяки такій особливості гваяколпероксидаза регулює вміст гормону, що відіграє важливу роль при формуванні симбіотичних систем. Отже, активність АП не залежала від азотфіксуючої активності мікросимбіонта, проте за динамікою збігалася з формуванням бульбочок на коренях сої, що може свідчити про зв'язок нодуляційної активності штаму-інокулянта з активністю даного ферменту.

Динаміка активності АП мала дещо інший характер (рис. 3). Так, суттєві відмінності за активністю даного фермента між різними варіантами спостерігали лише з 18-ї доби після появи сходів, тобто з моменту, коли відзначено початок фіксації атмосферного азоту симбіотичними системами соя – *B. japonicum*. Найвищу активність АП спостерігали у коренях рослин, інокульованих активним штамом та транспозоновими мутантами. На 23 та 25-у до-

АКТИВНІСТЬ ГВАЯКОЛ- І АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ

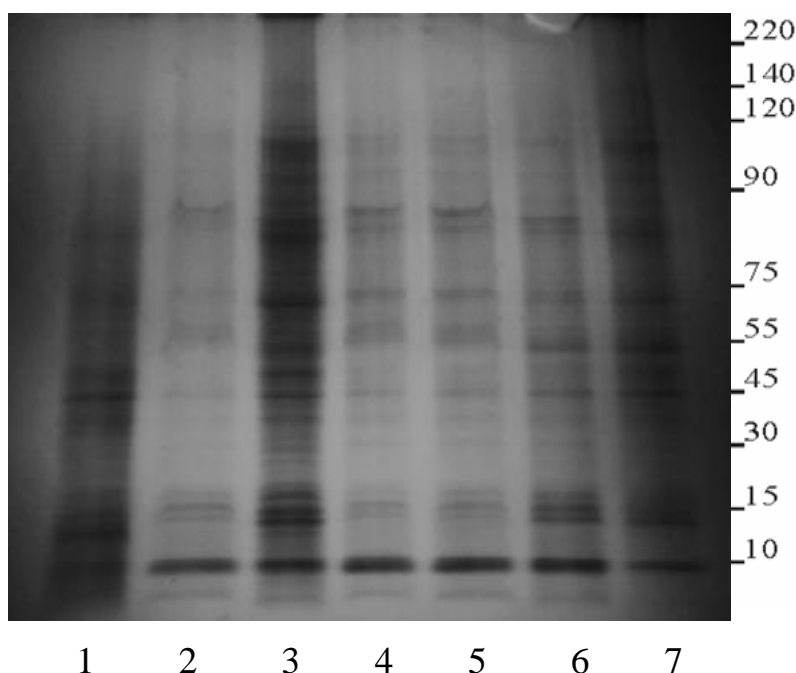


Рис. 5. Електрофореграма білків, екстрагованих із коренів із бульбочками сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *B. japonicum* різної ефективності (21 доба після сходів). Без інокуляції (1); штамми: 604к (2), 646 (6); Tn5-мутанти: 21-2 (3), 107 (4), 9-1 (5), 113 (7).

би рівень АП у цих варіантах перевищував контроль та варіанти із застосуванням неактивного штаму *B. japonicum* 604к, а також малоактивних Tn5-мутантів 107 і 113 в 4-6 та 1,5-2 рази, відповідно. Виявлено прямий зв'язок між активністю АП та нітрогенази на 23-ю ($r = 0,92$) та 25-у ($r = 0,98$) доби після появи сходів.

Отримані результати доповнюють дані інших дослідників (Ross et al., 1999), які показали, що активність аскорбатпероксидази, яку визначали у більш пізні фази розвитку симбіозу, є набагато вищою у бульбочках, ніж у коренях неінфікованих рослин (в 2-36 разів), а також у бульбочках, утворених ефективними штамми, порівняно з неефективними (1,5-5,5 раза). Обробка вегетуючих рослин зв'язаним азотом (сечовиною) пригнічує як активність азотфіксації, так і обох антиоксидантних ферментів, що вказує на наявність зв'язку між азотфіксацією та системою антиоксидантного захисту. Найбільш переконливим доказом зв'язку антиоксидантів із азотфіксацією є дослідження, які показали, що пряме введення аскорбату в пагони рослин сої призводить до зростання вмісту леггемоглобіну, 4-разового підвищення рівня азотфіксації та значного гальмування старіння бульбочок (Iturbe-Ormaetxe et al., 2001). Залучення аскорбату та очищеної рекомбінантної АП в систему *in vitro*, що містить леггемоглобін та бактероїди, сприяло покра-

щенню насичення киснем леггемоглобіну та підвищенню активності азотфіксації у чотири рази (Ross et al., 1999). Ці дослідження підтвердили, що антиоксидантні ферменти відіграють важливу роль у захисті симбіотичних систем сої та підвищенні ефективності азотфіксації.

При аналізі гелів електрофоретичного розділення білкових екстрактів коренів із бульбочками сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами різної активності, нами не було відзначено істотних відмінностей у якісному і кількісному складі отриманих білкових екстрактів у період формування симбіотичної системи і за відсутності у неї азотфіксуючої активності (рис. 4).

З усіх досліджуваних зразків відрізнявся лише варіант без інокуляції. Як видно з рис. 4, на 12-у добу після появи сходів вміст низькомолекулярних білків у діапазоні від 10 до 40 кД був значно нижчим, порівняно з вмістом протеїнів у коренях інфікованих рослин.

Різниця у кількісному складі білків на початку інфекційного процесу в варіанті без інокуляції порівняно з інокульованими варіантами свідчить про те, що початок інфікування в усіх інокульованих рослин супроводжується активним синтезом низькомолекулярних протеїнів, які, ймовірно, відповідають за регулювання нодуляційного процесу.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників. Так, у роботі Morrisa зі співавт. (Morris et al., 2001) було показано, що в період формування кореневих бульбочок конюшини у рослині синтезуються нові низькомолекулярні білки, які контролюють реорганізацію цитоскелету і активність ферментів, а також беруть участь у розпізнаванні вуглеводів. Схожі результати були отримані іншими дослідниками (Vanden Bos et al., 1978) і для гороху, що свідчить про консервативність цих процесів у бульбочках різних видів бобових.

У коренях 21-добових рослин сої, інфікованої активними штамом 646 та Tn5-мутантами 9-1 та 21-2, нами виявлено значне зростання загального вмісту білка (рис. 5). У даний період симбіотичні системи, сформовані цими ризобіями, найбільш активно фіксували азот. Незначне збільшення загального білка відзначено у коренях рослин, інокульованих малоактивними Tn5-мутантами 107 та 113 та неактивним штамом 604к. Також в усіх варіантах з інокуляцією спостерігалось збільшення вмісту поліпептиду із молекулярною масою 15 кД, незалежно від активності мікросимбіонта. Вміст даного поліпептиду у варіанті без інокуляції не змінювався порівняно із величиною на 12-у добу і був значно меншим, ніж у коренях інокульованих рослин.

На нашу думку, однією з причин відсутності відмінностей у якісному і кількісному складі білків коренів сої, інокульованої штамми і Tn5-мутантами *V. japonicum* різної ефективності, на 12-у добу після появи сходів є ідентичний перебіг фізіологічних процесів, пов'язаних із формуванням симбіотичної системи. Значне збільшення вмісту протеїнів у коренях сої на 21-у добу за інокуляції активними ризобіями, ймовірно, є наслідком активного синтезу білків, відповідальних за роботу нітрогеназного комплексу.

Таким чином, інокуляція рослин сприяє суттєвому підвищенню активності ГП. Активність цього ферменту висока на етапі утворення симбіозу і знижується із завершенням його формування. Рівень активності ГП залежить від нодуляційної активності мікросимбіонта. Із початком азотфіксації у коренях рослин сої активується робота АП, активність якої в подальшому корелює з інтенсивністю роботи азотфіксуючого апарату.

Інокуляція рослин викликає експресію генів і активний синтез білків, відповідальних

за формування симбіозу. При цьому даний процес не залежить від симбіотичних властивостей мікроорганізмів. Лише активізація функціонування азотфіксуючого апарату спричинює збільшення загального вмісту протеїнів у коренях рослин, інфікованих активними ризобіями. Отримані результати можуть свідчити про схожість фізіологічної відповіді рослини-хазяїна на інокуляцію мікроорганізмами, що відрізняються за симбіотичними властивостями, в період формування симбіотичних систем.

ЛІТЕРАТУРА

- Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук. думка, 1964. – 388 с.
- Коць С.Я., Моргул В.В., Патыка В.Ф., Маличенко С.М., Маменко П.Н., Кириций Д.А., Михалкив Л.М., Береговенко С.К., Мельникова Н.Н. Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобияльный симбиоз. – Киев. Логос, 2011. – Т. 2. – 523 с.
- Маличенко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М., Коць С.Я. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 5. – С. 409-418.
- Маменко П.М., Коць С.Я., Дрозденко Г.М., Жемойда А.В. Білковий склад бульбочок сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т. 40, № 6. – С. 525-531.
- Старченков Е.П., Белима Н.И., Желюк В.М. Связывание молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиотических и культуральных условиях. – Киев: Наук. думка, 1984. – 224 с.
- Тарчевский И.А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 2. – С. 321-331.
- Хадри А.Е., Спайк Г., Бисселинг Т., Бревин А. Разнообразные процессы образования корневых клубеньков и их инфицирование ризобиями // Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайка, А. Кондороши, П. Хукас. – СПб., 2002. – С. 373-386.
- Amako K., Chen G., Asada K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants // Plant Cell Physiol. – 1994. – V. 35. – P. 497-504.
- Bradford M.A. Rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilis-

АКТИВНІСТЬ ГВАЯКОЛ- І АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ

- ing: the principle of proteindye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 254-263.
- Dalton D.A.* Antioxidant defenses of plants and fungi // *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology.* – New York: Chapman and Hall, 1995. – P. 298-355.
- Dalton D., Joyner S., Becana M., Iturbe-Ormaetxe I., Chatfield J.M.* Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 116. – P. 37-43.
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C.* The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: Laboratory and field evaluation // *Plant Physiol.* – 1968. – V. 43. – P. 1185-1207.
- Herouart D., Baudouin E., Frendo P.* Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? // *Plant Physiol. Biochem.* – 2002. – V. 40. – P. 619-624.
- Iturbe-Ormaetxe I., Matamoros M.A., Rubio M.C., Dalton D.A., Becana M.* The antioxidants of legume nodule mitochondria // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2001. – V. 14. – P. 1189-1196.
- Kawano T., Kawano N., Hosoya H.* Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid-dependent superoxide generation by horseradish peroxidase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 288. – P. 546-551.
- Kawano T., Kawano N., Lapeyrie F.* A fungal auxin antagonist, hypaphorine prevents the indole-3-acetic acid-dependent irreversible inactivation of horseradish peroxidase: inhibition of Compound III-mediated formation of P-670 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – V. 294. – P. 553-559.
- Laemmly U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680-685.
- Matamoros M., Dalton D., Ramos J., Clemente M.R., Rubio M.C., Becana M.* Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133. – P. 499-509.
- Morris A.C., Djordjevic M.A.* Proteome analysis of cultivar specific interactions between *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* and subterranean clover cultivar Woogenellup // *Electrophoresis.* – 2001. – V. 22. – P. 586-598.
- Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 405-410.
- Nakano Y., Asada K.* Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* – 1981. – V. 22. – P. 867-880.
- Ramu S. K., Peng H. M., Cook D. R.* Nod factor induction of reactive oxygen species is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2002. – V. 15. – P. 522-528.
- Ross E.J.H., Kramer S.B., Dalton D.A.* Effectiveness of ascorbate and ascorbateperoxidase in promoting nitrogen fixation in model systems // *Phytochemistry.* – 1999. – V. 52. – P. 1203-1210.
- Rosendahl L., Vance C.P., Pedersen W.B.* Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism // *Plant Physiol.* – 1990. – V. 93. – P. 12-19.
- Saravanan R.S., Rose J.K.* A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues // *Proteomics.* – 2004. – V. 4. – P. 2522-2532.
- Shaw S.L., Long S.R.* Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132. – P. 2196-2204.
- Streeter J.G.* Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems // *Symbiosis.* – 1995. – V. 19. – P. 175-196.
- Van den Bos R., Bisseling T., van Kammen A.* Analysis of DNA content, nitrogenase activity and in vivo protein synthesis of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids on sucrose gradients // *J. Gen. Microbiol.* – 1978. – V. 109. – P. 131-139.
- Wan J., Torres M., Ganapathy A., Thelen J., Dague B.B., Mooney B., Xu D., Stacey G.* Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2005. – V. 18. – P. 458-467.

Надійшла до редакції
17.01.2013 р.

**THE ACTIVITY OF GUAIACOL- AND ASCORBATE PEROXIDASE
AND PROTEIN COMPOSITION OF SOYBEAN ROOTS DURING THE FORMATION
AND THE EARLY FUNCTIONING SYMBIOTIC SYSTEM
OF *GLYCINE MAX* – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

G. M. Drozdenko¹, P. M. Mamenko², S. Ya. Kots²

¹*Pavlo Tychyna Uman State Pedagogical University
(Uman, Cherkassy region, Ukraine)*

²*Institute of Plant Physiology and Genetics
National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The activity of redox enzymes and the composition of total protein pool in soybean roots inoculated with strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* of different activity during the formation and at the beginning of symbiosis functioning were studied. It was found that the activity of guaiacol peroxidase depended on microsymbiont nodulation capability and ascorbate peroxidase was associated with the intensity of nitrogen fixation. It was shown that the inoculation of plants caused the gene expression and the active synthesis of proteins that are responsible for the formation of symbiosis. The protein synthesis was independent of the properties of symbiotic microorganisms. It was noted that the enhance of nitrogen fixation led to increase the total protein content in plant roots infected with active nodule bacteria. Based on these data no peculiarities of redox enzymes and protein composition of root under inoculation by nodule bacteria with different symbiotic properties were found. This indicate the identity of some physiological processes during formation of various activity symbiosis in soybean.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, symbiosis, Tn5-mutants, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, proteins

**АКТИВНОСТЬ ГВАЯКОЛ- И АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ
И БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ СОИ В ПЕРИОД ФОРМИРОВАНИЯ
И В НАЧАЛЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ
GLYCINE MAX – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

Г. Н. Дрозденко¹, П. Н. Маменко², С. Я. Коць²

¹*Уманский государственный педагогический университет им. П.Г. Тычины
(Умань, Черкасская обл., Украина)*

²*Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Изучали активность окислительно-восстановительных ферментов и состав общего пула белков в корнях сои, инокулированной штаммами и Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* различной активности, в период формирования и в начале функционирования симбиоза. Установлено, что активность гваяколпероксидазы зависит от нодуляционной активности микросимбионта, а аскорбатпероксидазы – связана с интенсивностью азотфиксации. Показано, что инокуляция растений вызывает не зависящую от симбиотических свойств микроорганизмов экспрессию генов и активный синтез белков, ответственных за формирование симбиоза. Отмечено, что активация функционирования азотфиксирующего аппарата способствует увеличению общего содержания белков в корнях растений, инфицированных активными ризобиями. Особенности активности окислительно-восстановительных ферментов и белкового состава корней сои при инокуляции клубеньковыми бактериями с контрастными симбиотическими свойствами выявлены не были, что указывает на идентичность ряда физиологических процессов при формировании симбиоза различной эффективности у сои.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, симбиоз, Tn5-мутанты, гваяколпероксидаза, аскорбатпероксидаза, белки