УДК 581.1:581.557:579.6

Ю.Ю. КОНДРАТЮК, П.М. МАМЕНКО, А.В. ЖЕМОЙДА

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022

ПРОТЕЇНОВІ ПРОФІЛІ КОРЕНІВ СОЇ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ ШТАМАМИ *B. JAPONICUM* РІЗНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ, ЗА ОПТИМАЛЬНОГО І НЕДОСТАТНЬОГО ВОДОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

Досліджували особливості білкових профілів коренів сої за дії різного водозабезпечення та інокуляції насіння штамами з контрастними симбіотичними властивостями. Показано, що за оптимального зволоження у коренях сої, інфікованої ризобіями, синтезуються поліпептиди розмірами 50, 60, 90 та 140 кДа, які утворюються у неінокульованих рослинах під впливом посухи. Отримані результати підтверджують припущення про схожість реакцій рослин на дію стресу та дають підґрунтя розглядати інокуляцію як потенційний спосіб підвищення стійкості бобових до несприятливих факторів довкілля.

Ключові слова: соя, Bradyrhizobium japonicum, білки, водний стрес

У відповідь на дію подразників у рослин відбувається порушення енергообміну і структури мембран, підвищення гідролітичної активності ферментів, деградація біополімерів і формування на їх основі сигнальних олігомерних молекул [6]. Утворені нові сполуки можуть виконувати роль вторинних месенджерів і активувати фосфорилювання ферментів, що беруть участь у захисті рослини від дії стресового фактора.

Аналізуючи склад протеїнів інфікованих кореневих волосків сої, Вон зі співавт. [10] показали експресію 133 рослинних білків на початковій стадії розвитку бульбочок, пов'язаних із реорганізацією цитоскелету, ліпідним сигналінгом, регулюванням цукрозв'язуючої активності [7, 9]. Тобто, інвазія ризобій у клітини кореневих волосків бобових, як і процес патогенезу, активізує каскад реакцій, спрямованих на подолання захисних реакцій рослинного організму на інвазію бактерій, формування механізмів обміну метаболітами між симбіонтами та активізацію захисних механізмів симбіотичних систем до несприятливих умов.

Разом із тим, питання впливу ризобій із контрасними властивостями на характер відповіді рослини-хазяїна на інокуляцію в умовах дії додаткових стресових факторів залишається маловивченим. Тому, метою даної роботи було вивчення динаміки змін білкового складу коренів сої за інокуляції штамами ризобій різної ефективності в умовах водного дефіциту.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використано активний (646) та неактивний (604к) штами *B. japonicum* із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів інституту фізіології рослин і генетики (ІФРГ) НАНУ. Культуру бактерій вирощували на манітно-дріжджовому середовищі протягом 9 діб при 26–28єС. Кінцева концентрація бактерій становила 10^7 клітин у 1 мл суспензії. Сою (*Glycine max* L. *Merr*.) сорту Васильківська вирощували по 6–8 рослин на промитому річковому піску з додаванням 0,2 норми азоту у суміші Гельрігеля за умов природного освітлення та за різного водозабезпечення (60 % повної вологоємності (ПВ) – оптимальне зволоження, 30 % – посуха). Повторність досліду 7-кратна. Посуху моделювали у фазу початку бутонізації, шляхом зниження об'єму води для поливу до рівня 30 % ПВ протягом 7 днів.

Отримання білкових екстрактів проводили за методом [8]. Вміст сумарного розчинного білка в екстрактах визначали за Бредфордом [2]. Якісний склад протеїнів досліджували методом градієнтного електрофорезу в 12–20 %-ному ПААГ за Леммлі [5]. Аналіз гелів проводили за допомогою програми Total Lab версії 2.1. Повторність визначень 5-кратна. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали методом дисперсійного аналізу із залученням пакетів спеціальних програм Microsoft Excel'10 та Statgraphics Plus 3.0.

Результати досліджень та їх обговорення

При електрофоретичному розділенні пулу білків коренів сої, забезпеченої водою у повному обсязі, було показано (рисунок), що загальний вміст протеїнів у коренях контрольних рослин був значно меншим, ніж за інокуляції рослин ризобіями. Крім того, за умов оптимального водозабезпечення білкові екстракти коренів інокульованих рослин містили поліпептиди із молекулярними масами 50, 60, 90 та 140 кДа, які були відсутні у коренях контрольних зразків.

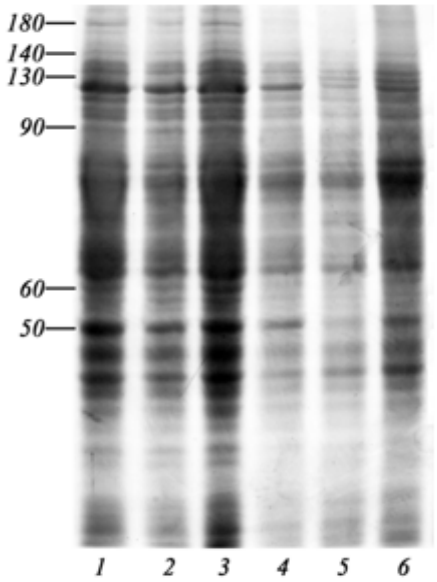


Рисунок. Білковий склад коренів сої, інокульованої штамами *B. japonicum* із контрастними симбіотичними характеристиками за різних рівнів водозабезпечення: *1* – штам 646 (60 % ПВ); *2* – штам 646 (30 % ПВ); *3* – штам 604к (60 % ПВ); *4* – штам 604к (30 % ПВ); *5* – контроль (без інокуляції) (60 % ПВ); *6* – контроль (без інокуляції) (30 %ПВ).

За умов недостатнього водозабезпечення у коренях інфікованих рослин спостерігалося зменшення загального вмісту білка. При цьому білкові профілі коренів інокульованих варіантів у обох випадках водозабезпечення мали спільні риси. При цьому додатково на електрофоретичних смугах було виявлено поліпептид масою 180 кДа. У коренях рослин інфікованих активним штамом був відсутній білок розмірами 130 кДа. Екстракти коренів сої, інокульованої неактивним штамом, містили даний протеїн у слідових кількостях. На нашу думку, зниження загального вмісту білків у коренях інокульованих рослин за дії посухи пов’язано із перерозподілом енергетичних запасів у рослині за умов дії стресу. У той же час у коренях контрольних рослин за дії стресу загальний вміст протеїнів навпаки збільшувався. За нестачі вологи серед білків коренів цього варіанту також виявлені білки розмірами 50, 60, 140 та 180 кДа, які характерні для білкових профілів коренів інокульованих рослин. Ми припускаємо, що подібність складу протеїнів коренів контрольних рослин, що зазнали стресу, і інокульованих є наслідком синтезу в них стресових білків, які синтезуються у відповідь на дію біотичних та абіотичних факторів [1, 3, 4, 8].

У ряді літературних джерел показано підвищення у бульбочках рівня сполук, характерних для осмотичного стресу – маніту, сорбіту, амінокислоти проліну і поліамінів, порівняно з іншими органами рослин [3, 4]. Крім того, в бактероїдах *B. japonicum* виявлені та ідентифіковані протеїни, що беруть участь у детоксикації клітин, а також стресові і сигнальні пептиди [8].

Висновки

Нами встановлено, що обробка рослин ризобіями призводить до синтезу білків, характерних для рослин, що зазнали впливу стресу і не залежить від ефективності штаму. Білковий склад симбіотичних систем є досить стабільним і практично не залежить від забезпечення рослин вологою. Отримані результати підтверджують припущення про те, що специфіка відповіді на дію стресу для багатьох рослин є схожою, а отже інокуляція бобових є важливим засобом підвищення стійкості рослин до несприятливих факторів довкілля.

1. *Биологическая* фиксация азота. Бобово-ризобиальный симбиоз / [Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф. и др.]. — Киев: Логос, 2011. — Т. 2. — 523 с.
2. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analytical Biochem. — 1976. — 72. — P. 248—254.
3. *Colebatch G., Desbrosses G., Ott T. et al.* Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicum* // Plant J. — 2004. — 39. — P. 487—512.
4. *Desbrosses G.G. Lotus japonicus* metabolic profiling: Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant–microbe interactions / Desbrosses G.G., Kopka J., Udvardi M.K. // Plant Physiol. — 2005. — 137, N 6. — C. 1302—1318.
5. *Laemmly U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmly // Nature. — 1970. — 227. — P. 680—685.
6. *Matamoros M., Dalton D., Ramos J. et al.* Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis // Plant Physiol. — 2003. — 133, N 4. — P. 499—509.
7. *Morris A.C.* Proteome analysis of cultivar specific interactions between *R. leguminosarum biovar trifolii* and subterranean clover cultivar Woogenellup / A.C. Morris, M.A. Djordjevic // Electrophoresis. — 2001. — 22. – – P. 586—598.
8. *Sarma A.D.* A comparative proteomic evaluation of culture grown vs nodule isolated *B. japonicum* / A.D. Sarma, D.W. Emerich // Ibid. — 2006. — 6. — P. 3008—3028.
9. *Streeter J.G.* Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems / J.G. Streeter // Symbiosis. — 1995. — 19. — P. 175—196.
10. *Wan J., Torres M., Ganapathy A. et al.* Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *B. japonicum* // Mol. Plant-Microbe Interact. — 2005. — 18. — P. 458—467.

Ю.Ю. Кондратюк, П.Н. Маменко, А.В. Жемойда
Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины

ПРОТЕИНОВЫЕ ПРОФИЛИ КОРНЕЙ СОИ, ИНОКУЛИРОВАННОЙ ШТАММАМИ *B. JAPONICUM* РАЗЛИЧНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИ ОПТИМАЛЬНОМ И НЕДОСТАТОЧНОМ ВОДООБЕСПЕЧЕНИИ

В ответ на действие негативных факторов различной природы в организме растения запускается каскад неспецифических и специфических реакций, направленых на избежание негативных последствий, вызванных этим стрессом. Известно, что инокуляция семян бобовых растений симбиотическими микроорганизмами вызывает изменения метаболизма и функционирования макросимбионта. Вместе с тем вопросы влияния ризобий с контрастными симбиотическими свойствами на характер физиологического ответа растения-хозяина на инокуляцию в условиях действия дополнительных стрессовых факторов остается малоизученным.

Поэтому были исследованы особенности белковых профилей корней сои под влиянием различных уровней водообеспечения и инокуляции семян штаммами с контрастными симбиотическими свойствами. Показано, что в условиях оптимального водообеспечения в корнях сои, инфицированной активными и неактивными ризобиями, синтезируются полипептиды с молекулярными массами 50, 60, 90 и 140 кДа, которые образуются и в неинокулированных растениях под влиянием засухи. Полученные результаты подтверждают предположение о сходстве реакций растений на воздействие стресса и дают основание рассматривать инокуляцию как потенциальный способ повышения устойчивости бобовых к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Ключевые слова: соя, Bradyrhizobium japonicum, белки, водный стресс

Iu.Iu. Kondratiuk, P.M. Mamenko, A.V. Zhemojda
Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

PROTEIN COMPOSITIONS OF SOYBEAN ROOTS INOCULATED BY BRADYHIZOBIUM JAPONICUM STRAINS WITH VARIOUS ACTIVITY UNDER OPTIMAL AND INSUFFICIENT WATER SUPPLY

The cascade of nonspecific and specific reactions are started in plant organism under the action of different stress factors. They are directed to prevent the negative effects induced by this stress. It is known that the inoculation of leguminous plants seeds by symbiotic microorganisms causes to changes in

metabolism and functioning of macrosymbiont. However, the questions of influence of symbiotic rhizobia with contrasting properties on the physiological response of host plant to the inoculation under the action of additional stress factors remains poorly known. Therefore, it was investigated the peculiarities of the soybean root protein profiles under the influence of different levels of water supply and seed inoculation by strains with different symbiotic properties. It was shown that the peptides with molecular weights 50, 60, 90 and 140 kDa, which are typical for non-inoculated plants affected by drought, were produced in the roots of soybean plants infected with both active and inactive rhizobia under optimal water supply. These results confirm the assumption that plant response to stresses is similar and give the basis to consider the inoculation as a potential way to improve the stability of legumes to adverse environmental factors.

Keywords: soybean, Bradyrhizobium japonicum, proteins, water stress

Рекомендує до друку Надійшла 29.04.2014
С.В. Пида

УДК 581.138.1 : 631.8 : 635.652

[1]О. Б. КОНОНЧУК, [1]С. В. ПИДА, [2]І. П. ГРИГОРЮК

[1]Тернопільський національний педагогічний університет імені В. Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027
[2]Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041

ВПЛИВ РІСТРЕГУЛЯТОРІВ РЕГОПЛАНТ І СТИМПО НА СИМБІОТИЧНУ СИСТЕМУ ТА ПРОДУКТИВНІСТЬ КВАСОЛІ

Встановлено, що передпосівна обробка насіння рістрегулятором Регоплант краще стимулює утворення і функціонування спонтанного квасоле-ризобіального симбіозу у фазу цвітіння, ніж регулятор Стимпо. Обидва препарати підвищують зернову продуктивність квасолі в ґрунтово-кліматичних умовах Тернопільської області за рахунок стимулювання різних елементів урожаю.

Ключові слова: Phaseolus vulgaris L., Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli, Регоплант, Стимпо, симбіоз, продуктивність

Підвищення ефективності азотфіксації розглядається як ключовий чинник зростання продуктивності бобових культур, який можна реалізувати за рахунок комплексу селекційних, агротехнічних та інших заходів, зокрема, поєднаним застосуванням бактеріальних препаратів та біологічно активних речовин (БАР) [1-6, 8, 10, 11, 14, 16].

Особливості взаємодії бактерій з рослиною за участю фітогормонів потребують всебічного дослідження, оскільки БАР розглядаються як фактори формування і функціонування системи ґрунт-мікроорганізми-рослина. Їх запропоновано враховувати під час розробки і впровадження нових підходів до керування продукційним процесом бобових культур [1, 2, 6, 17].

У сучасному сільському господарстві формування оптимальної продуктивності рослин можна досягти дією не тільки окремо їх БАР, а композицією за найраціональнішою схемою [9]. Тому, перспективним напрямком є застосування комплексних регуляторів росту рослин (РРР), зокрема, тих, що виробляються Державним підприємством «Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех» НАН України і Міністерства освіти та науки України (м. Київ), що мають природне походження, не шкодять рослинам і природному середовищу, покращують мікробіологічний склад ґрунту тощо – Агростимулін, Івін, Емістим С, Біолан, Біосил, Радостим, Стимпо, Регоплант та ін. [2, 4, 15].