

ORIGINAL ARTICLE

**Low temperature impact on protein content and peroxidase activity during pea inoculation with *Rhizobium leguminosarum***

Akimova G.P., Sokolova M.G.

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Division RAS, 664033 Irkutsk, Russia*

*Tel. (3952) 42-82-56; Fax: (3952) 51-07-54;*  
*e-mail: [SokolovaMG@sifibr.irk.ru](mailto:SokolovaMG@sifibr.irk.ru)*

The study was focused on changes in protein content and peroxidase activity in pea roots subjected to infection with *Rhizobium leguminosarum* and to low temperature. The amount of protein and peroxidase activity were shown to change in the course of interaction with nodular bacteria and to depend on the temperature and root zones susceptibility to rhizobia. It was concluded that changes in the content of soluble protein and peroxidase activity witness adaptation changes in pea seedlings, which facilitate normal course of metabolic processes and ensure regulation of plant interaction with *Rhizobium* in hypothermal conditions.

*Key words: peroxidase activity / legume-rhizobial symbiosis / hypothermia/ soluble protein*

## ORIGINAL ARTICLE

## Влияние низкой температуры на содержание белка и активность пероксидазы при инокуляции гороха *Rhizobium leguminosarum*

Акимова Г.П., Соколова М.Г.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН 664033 Иркутск, ул.

Лермонтова, 132, а/я 317, Россия

Тел.(3952) 42-82-56; Факс:(3952) 51-07-54;

e-mail: [SokolovaMG@sifibr.irk.ru](mailto:SokolovaMG@sifibr.irk.ru)

Изучали изменение в содержании белка и активности пероксидазы в корнях гороха при воздействии инфицирования *Rhizobium leguminosarum* и низкой температуры. Показано, что количество белка и активность пероксидазы меняются в процессе взаимодействия с клубеньковыми бактериями и зависят от температуры и восприимчивости зон корня к ризобиям. Сделан вывод, что изменения в содержании растворимого белка и активности пероксидазы свидетельствуют об адаптационных изменениях в проростках гороха, что способствует нормальному ходу метаболических процессов и обеспечивает регуляцию взаимодействия растений с *Rhizobium* при гипотермии.

**Ключевые слова:** *активность пероксидазы / бобово-ризобияльный симбиоз / гипотермия / растворимый белок*

Взаимоотношения бобового растения с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* представляют собой сложный многоэтапный процесс, в результате которого происходят глубокие физиологические перестройки симбионтов (Spaink, 1995). Инфицирование корней бобовых растений *Rhizobium*

сопровождается изменением экспрессии множества растительных генов на уровне синтеза белков. Во-первых, образуются новые специфические белки растительного происхождения – нодулины, необходимые для образования бобово-ризобияльного симбиоза (Scheres et al., 1990; Cook et al., 1995; Хадри,

Бисселинг, 2002), во-вторых, вероятно, как и при инфицировании патогенами (Тарчевский, 1994), в клетках растений происходит репрограммирование экспрессии генов, проявляющееся в замедлении синтеза одних белков и усилении образования или появлении других, отсутствующих у неинокулированных растений.

Наиболее известными генами ранних нодулинов являются *enod5*, *enod12*, *enod40*, ген пероксидазы *gir1* (Peng et al., 1996, Хадри, Бисселинг, 2002). Функции ранних нодулинов связывают, как с формированием структуры клубенька, так и с действием защитных механизмов растения-хозяина (Тихонович, Проворов, 1998).

Пероксидаза (ПО) – один из наиболее распространенных ферментов растений, который составляет 15% всех внутриклеточных белков. Будучи по своей природе полифункциональным, этот белок участвует во многих процессах жизнедеятельности растений, в том числе одним из первых откликается на стрессовые воздействия (Савич, 1989; Газарян, 1992). Среди физиолого-биохимических факторов защиты растений от патогенных организмов ПО рассматривают как одну из важнейших каталитических систем, активно участвующих в авторегуляции метаболизма растений при заражении (Карташева и др., 2000). Взаимодействие патогена и хозяина вызывает значительное повышение активности ПО (Савич, 1989; Граскова и др., 2004). Роль ПО при симбиозе изучена слабо.

В работах Жизневской с соавторами показано, что при формировании симбиотической системы в цитозоле клеток

эффективных клубеньков люпина блокируется синтез ряда белков и синтезируются новые белки – нодулины, а пероксидазная реакция рассматривается как ответ на внедрение активных ризобий в клетку растения-хозяина (Жизневская и др., 2001).

Наши результаты, полученные ранее, свидетельствуют о том, что ПО участвует во взаимодействии бобовых растений с *Rhizobium* и активность ПО имеет разную направленность изменений в участках корня, отличающихся по восприимчивости к ризобияльной инфекции (Акимова и др., 2002).

Низкие температуры вызывают значительные изменения в функциональном состоянии растений, что, прежде всего, связано с синтезом стрессовых белков (Войников и др., 2004) и уровнем пероксидазной активности (Савич, 1989; Минибаева, Гордон, 2003; Гималов, 2004). Однако эти вопросы, в связи с развитием симбиотических отношений в условиях действия низкотемпературного фактора остаются не изученными.

Цель работы: изучить влияние низкой положительной температуры и инокуляции *Rh. leguminosarum* на содержание растворимого белка и активность ПО в корнях проростков гороха.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения гороха (*Pisum sativum L.*) сорта Марат. Исходные проростки выращивали в кюветах на фильтровальной бумаге, смоченной водой, в термостате при разных условиях. Вариант I – исходные проростки выращивали при температуре 22 °С в течение 2-х сут, затем инокулировали и подвергали воздействию

температуры 8 °С. В варианте II – исходные проростки выращивали 7 сут при температуре 8 °С, затем инокулировали. В варианте III – инокулировали семена, затем их проращивали до размера исходных проростков (7 сут 8 °С) и далее на холоде. В качестве контроля использовали проростки, выращенные в течение 24 ч при 22 °С (исх 2 сут 22 °С) без инокуляции. Инокуляцию проводили водной суспензией 3-х суточной культуры клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* *bv.viciae* эффективного штамма 250a (CIAM 1026), полученного из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Санкт-Петербург, Пушкин). Во всех вариантах опыта исходные и опытные проростки выравнивали по физиологическому возрасту. Критерием однородности исходного растительного материала служила длина корня 25-30 мм.

Для исследования брали участки корня, отличающиеся по восприимчивости к

*Rhizobium*: 0-20 мм от кончика корня – восприимчивый и 20-40 мм – не восприимчивый.

Выделение растворимого белка проводили Na-фосфатным буфером pH 7,0. Содержание белка определяли с амидо-черным (Бузун и др., 1982).

Активность ПО определяли по начальной скорости окисления о-дианизидина перекисью водорода (Лебедева и др., 1977; Рогожин и др., 2001). Реакцию инициировали введением 0,1 мл 16 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Окисление о-дианизидина регистрировали по увеличению поглощения при 460 нм ( $\epsilon=30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ ). За единицу активности фермента принимали количество о-дианизидина (мкмоль), окисленного за 1 мин на 1 г сырого вещества.

Эксперименты проводили в трех-шестикратной повторности. Полученные результаты обработаны статистически. В таблицах приведены средние арифметические величины и стандартные ошибки.

Таблица 1. Содержание растворимого белка в корнях проростков гороха через 24 ч инокуляции при температуре 22 °С (мг/г сырого вещества)

Зона корня, мм	Растворимый белок	
	Контроль, H <sub>2</sub> O	Инокуляция
0-20	19,0±1,1	17,0±1,0
20-40	12,5±0,8	12,6±0,7

Таблица 2. Содержание белка в корнях проростков гороха при влиянии инокуляции и гипотермии (вариант I) (мг/г сырого вещества).

Исходные проростки	Зона корня, мм	Время воздействия температуры 8 °С							
		1сут		2сут		3сут		5сут	
		H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.
2 сут 22 °С, H <sub>2</sub> O	0-20	20,3±1,5	17,8±1,1	28,8±2,1	23,2±1,7	23,5±1,9	21,4±1,3	18,8±1,1	15,7±1,0
	20-40	13,3±1,0	14,1±1,0	18,8±1,1	16,6±1,1	15,4±0,9	14,8±1,0	12,2±0,5	12,5±0,6

Таблица 3. Влияние температуры 8 °С на содержание белка в корнях проростков гороха, инокулированных на стадии прорастания (вариант II) и набухания (вариант III) семян (мг/г сырого вещества)

Вариант	Зона корня, мм	Контроль, H <sub>2</sub> O			Инокуляция		
		Время воздействия температуры 8 °С, сут					
		7с	8с	10с	7с	8с	10с
II	0-20	29,1±1,9	35,4±2,8	40,7±2,9	26,8±1,9	32,8±2,7	37,7±2,8
	20-40	9,8±0,3	9,5±0,5	9,7±0,6	10,0±0,7	9,7±0,7	10,2±0,8
III	0-20	29,1±1,9	35,4±2,8	40,7±2,9	27,0±2,2	30,8±2,5	34,7±1,9
	20-40	9,8±0,3	9,5±0,5	9,7±0,6	10,0±0,7	10,6±0,8	11,0±0,9

Таблица 4. Активность пероксидазы корней гороха при влиянии инокуляции в оптимальных условиях роста (мкМ / г сырого вещества)

Исходные проростки	Зона корня, мм	Время воздействия температуры 24 ч 22°С	
		Контроль, H <sub>2</sub> O	Инокуляция
2 сут 22°С H <sub>2</sub> O	0-20	5,3±0,1	4,0±0,1
	20-40	5,5±0,1	6,2±0,2

Таблица 5. Активность пероксидазы корней гороха при влиянии инокуляции и гипотермии (вариант I) (мкМ / г сырого вещества)

Исходные проростки	Зона корня, мм	Время воздействия температуры 8°С									
		1 сут		3 сут		5 сут		7 сут		8 сут	
		H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.
2 сут 22°С H <sub>2</sub> O	0-20	7,9±0,3	5,8±0,2	8,1±0,5	6,5±0,3	6,1±0,3	5,2±0,2	6,0±0,3	4,6±0,2	5,7±0,2	6,3±0,2
	20-40	-	-	8,0±0,3	6,9±0,2	6,4±0,2	5,5±0,1	5,7±0,2	6,4±0,2	5,8±0,2	6,5±0,3

Таблица 6. Активность пероксидазы корней гороха при влиянии инокуляции и гипотермии (вариант II) (мкМ / г сырого вещества)

Исходные проростки	Зона корня, мм	Время воздействия температуры 8°С							
		1 сут		3 сут		5 сут		7 сут	
		H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.
7 сут 8°С H <sub>2</sub> O	0-20	4,8±0,1	3,2±0,1	4,6±0,2	3,8±0,1	4,3±0,2	5,0±0,2	4,3±0,1	5,4±0,2
	20-40	5,0±0,2	6,2±0,3	5,5±0,2	6,0±0,3	4,7±0,1	6,0±0,2	4,7±0,2	4,7±0,1

Таблица 7. Активность пероксидазы корней гороха при влиянии инокуляции и гипотермии с момента прорастания семян (вариант III) (мкМ / г сырого вещества)

Исходные проростки	Зона корня, мм	Время воздействия температуры 8 <sup>0</sup> С									
		1 сут		3 сут		5 сут		7 сут		8 сут	
		H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.	H <sub>2</sub> O	Инок.
7 сут 8 <sup>0</sup> С H <sub>2</sub> O	0-20	-	2,6±0,1	-	4,7±0,2	-	4,8±0,2	-	5,9±0,2	-	3,8±0,1
	20-40	-	-	-	5,8±0,2	-	4,9±0,2	-	6,0±0,3	-	4,5±0,1

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показано в таблице 1 при инфицировании проростков гороха в оптимальных температурных условиях роста содержание растворимого белка снижается в восприимчивом к ризобияльной инфекции участке (0-20 мм) и не изменяется в более зрелом, не восприимчивом участке корня (20-40 мм).

Таким образом, инокуляция оказывает влияние на содержание белка в корнях проростков гороха. При этом в восприимчивых к инфекции участках корня наблюдается тенденция к снижению содержания белка.

Показано, что локализация инфекционных сайтов (восприимчивый к инфекции участок корня) соответствует месту пролиферации дедифференцированных клеток внутренней коры корня, ведущих к образованию примордиев клубенька (Verma, 1992; Соколова, 2001). Вероятно, интенсивное деление этих клеток можно рассматривать как одну из причин снижения содержания белка в зоне наибольшего проникновения бактерий (Обручева, 1982).

Как известно низкая положительная температура существенно влияет на рост растений. При действии температуры 8<sup>0</sup>С на

проростки, как показано нами ранее, резко снижаются скорость деления и растяжение клеток, замедляются темпы роста и внедрения ризобий (Акимова и др., 1999, 2002).

Содержание белка в корнях проростков (I) при резком снижении температуры с 22 до 8<sup>0</sup>С первые двое суток воздействия гипотермии возрастает, затем к 5 суткам сравнивается с контрольным уровнем на тепле (табл.1, 2). При этом у инокулированных растений содержание белка ниже, чем у неинокулированных.

При действии температуры 8<sup>0</sup>С с момента прорастания семян (II и III) проростки, вероятно, более адаптированы к условиям низкой температуры, содержание белка в корнях выше по сравнению с вариантом I (табл. 3). Однако и в этом случае содержание растворимого белка при инокуляции ниже.

Активность ПО в корнях проростков гороха в оптимальных условиях роста имела разную направленность изменений (табл. 4). В отрезках 0-20 мм от кончика корня активность ПО снижалась, а в более дифференцированных отрезках (20-40 мм от кончика корня) - возрастала.

Снижение активности ПО в определенном участке корня, обладающем наибольшей

восприимчивостью к инфекции *Rhizobium*, как показано нами ранее (Акимова и др., 2002), достаточно специфично и, вероятно, способствует проникновению бактерий в корень.

При действии температуры 8<sup>0</sup>С на проростки (I), как отмечалось выше, рост корня замедляется, резко снижаются скорость деления и растяжения клеток корня. При этом замедляется формирование корневых волосков и темпы внедрения ризобий (Акимова и др., 1999; Соколова, 2001). Активность ПО в первые двое суток воздействия гипотермии возрастала и затем постепенно сравнивалась с контрольным уровнем. Проникновение ризобий в корень растягивалось во времени (Акимова и др., 2002) и сопровождалось снижением активности ПО в отрезках инокулированных корней до завершения проникновения бактерий. Затем активность ПО повышалась (табл.5).

При действии температуры 8<sup>0</sup>С с прорастания семян (II), адаптация растений к холоду, вероятно, происходила еще на стадии проклевывания семян и активность ПО не возрастала, а у инокулированных - даже снижалась (табл. 6). В варианте с растениями, инокулированными еще в семенах (III), проростки, вероятно, наиболее адаптированы к условиям низкой температуры, так как активность ПО значительно снижалась в первые двое суток, и, кроме того, в более короткие сроки сравнивалась с активностью фермента в контроле (табл. 7).

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что инокуляция несколько снижает, нивелирует отрицательное действие низкой температуры, что дает возможность растению быстрее адаптироваться к гипотермии и это,

прежде всего, сказывается на росте всего корня. Активность ПО может служить индикатором реакции проростков гороха на холодное воздействие. Снижение активности фермента, не только является необходимым условием начальных взаимодействий симбионтов (Акимова и др., 2002), но и свидетельствует об адаптационных изменениях в растении, происходящих в зависимости от вариантов воздействия температуры.

Более низкое содержание растворимого белка у инокулированных растений может быть обусловлено его гидролизом протеиназами, которые активируются не только под действием гипотермии (Дунаевский и др., 2005), но и инокуляции (Шумный, Сидорова, 1991). Высвобождающиеся при этом аминокислоты могут использоваться для синтеза новых белков-нодулинов, необходимых для дальнейшего развития симбиоза.

Таким образом, низкая температура и инокуляция *Rhizobium* вызывают изменения в содержании растворимого белка и активности ПО, что очевидно способствует, нормальному ходу метаболических процессов и обеспечивает регуляцию взаимодействия растений с *Rhizobium* при гипотермии.

## ЛИТЕРАТУРА

- Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В. (1999) Влияние инокуляции *Rhizobium leguminosarum* на рост корней гороха при пониженной температуре. *Физиология растений*, 46 (5), 806-810.
- Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В., Лузова Г.Б., Сидорова К.К. (2002) Роль пероксидазы во взаимодействиях

- растений гороха с *Rhizobium*. *Агрехимия*, 12, 37-41.
- Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. (1982) Определение белка в растениях с помощью амидо-черного. *Физиология растений*, 29 (1), 198-204.
- Войников В.К., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Рихванов Е.Г. (2004) Стрессовые белки растений. Иркутск: Изд. Ин-та географии СО РАН, 129 с.
- Газарян И.Г. (1992) Peroксидазы растений. М.: ВИНТИ, *Итоги науки и техники*, Сер. Биотехнология, 36, 4-28.
- Гималов Ф.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. (2004) О восприятии растением холодового сигнала. *Успехи современной биологии*, 124, 185-196.
- Граскова И.А., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Войников В.К. (2004) Peroксидаза как компонент сигнальной системы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили. *Физиология растений*, 51(5), 692-697.
- Дунаевский Я.Е., Цыбина Т.А., Белякова Г.А., Домаш В.И., Шапиро Т.П., Забрейко С.А., Белозерский М.А. (2005) Ингибиторы протеиназ как антистрессовые белки высших растений. *Прикладная биохимия и микробиология*, 41(4), 392-396.
- Жизневская Г.Я., Троицкая Г.Н., Бороденко Л.И., Измайлов С.Ф. (2001) Peroксидаза и каталаза в корневых клубеньках кормовых бобов при эффективном и неэффективном симбиозе с ризобиями. *Физиология и биохимия культ. растений*, 33, 285-290.
- Карташева Е.Р., Руденская Г.Н., Юрина Е.В. (2000) Полифункциональность растительных пероксидаз и их практическое использование. *Сельскохозяйственная биология*, 5, 63-70.
- Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. (1977) Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена. *Биохимия*, 42, 1372-1379.
- Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. (2003) Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе. *Физиология растений*, 50, 459-464.
- Обручева Н.В. (1982) Прорастание семян. *Физиология семян* (под ред. А.А.Прокофьева). М: Наука, 223-274.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Курилюк Т.Т. (2001) Антиоксидантная система в прорастании семян пшеницы. *Известия РАН. Сер. биол.*, 2. 165-173.
- Савич И.М. (1989) Peroксидазы – стрессовые белки растений. *Успехи соврем. биологии*, 107(3), 406-417.
- Соколова М.Г. (2001) Физиологические особенности начальных этапов инфицирования корней гороха *Rhizobium leguminosarum* при разных температурах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск: СИФИБР СО РАН, 21с.

- Тарчевский И.А. (2001) Патоген-индуцируемые белки растений. *Прикладная биохимия и микробиология*, 37(5), 517-532.
- Тихонович И.А., Проворов Н.А. (1998) Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. Ст-Пб: Наука, 5-67.
- Хадри А.-У., Бисселинг Т. (2002) *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. Ред. Спайнк Г., Кондороши А., Хукас П.; Русский перевод под ред. Тихоновича И.А., Проворова Н.А. Ст-Пб: Россельхозакадемия, 435-450.
- Шумный В.К., Сидорова К.К. (1991) Биологическая фиксация азота. Новосибирск: Наука. 271 с.
- Cook D., Dreyer D., Bonnet D., Howell M., Nony E., Van den Bosch K. (1995) Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 7(1), 43-55.
- Peng H.M., Dreyer D.A., VandenBosh K.A., Cook D. (1996) Gene structure and differential regulation of the *Rhizobium*-induced peroxidase gene rip1. *Plant Physiol.*, 112(4), 1437-1446.
- Scheres B., Van Engelen F., Van der Knaap E. et al. (1990) Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell*, 2(8), 687-700.
- Verma D.P.S. (1992) Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell*, 4, 373-382.
- Spaink H.P. (1995) The molecular basis of infection and nodulation by *Rhizobia*: The ins and outs of symbiogenesis. *Annu. Rev. Phytopatol.*, 33, 345-368.