

**ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТА МЕДИ
НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ
ПОКАЗАТЕЛИ И АКТИВНОСТЬ
КАТАЛАЗ СОИ ПОСЛЕ
ИНОКУЛЯЦИИ *Bradyrhizobium japonicum*
и *Sinorhizobium fredii***

С.И. Лаврентьева,

кандидат биологических наук, доцент

Л.Е. Иваченко,

доктор биологических наук, профессор

***М.В. Якименко,**

кандидат биологических наук

ФГБОУ ВПО Благовещенский государственный
педагогический университет
Россия, 374273, г. Благовещенск, ул. Ленина, 104
E-mail: lana.lavrenteva.1984@mail.ru

*ФГБНУ ВНИИ сои

Россия, г. Благовещенск, ул. Игнатьевское шоссе, 19
Тел./факс: (4162) 36-94-50, 36-95-58
E-mail: amursoja@gmail.com

Для цитирования: Лаврентьева С.И., Иваченко Л.Е., Якименко М.В. Влияние сульфата меди на морфологические показатели и активность каталазы сои после инокуляции *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii* // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2015. – Вып. 4 (164). – С. 41–45.

Ключевые слова: Glycine max, каталаза, удельная активность, множественные формы, инокуляция, сульфат меди.

Изучено влияние сульфата меди на морфологические показатели и каталазную активность сои после инокуляции ризобиями. Следует отметить улучшение морфологических показателей сои, выращенной на питательной среде после инокуляции штаммами ТБ-508 и 648а при наличии в питательной среде сульфата меди в концентрации $6 \cdot 10^{-4}$ М, которая установлена как оптимальная. Медленнорастущий штамм 648а показал наивысшую вирулентность. Растения сои, инокулированные штаммом ТБ-508, обладали стабильной активностью и стабильным числом множественных форм, что характеризует его высокие адаптивные возможности.

Influence of copper sulfate on morphological traits and activity of catalases in soybean after inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii*

Lavrentieva S.I., candidate of biology

Ivachenko L.E., doctor of biology

***Yakimenko M.V.**, candidate of biology

“Blagoveschensk state pedagogical university”

104, Lenina str., Blagoveschensk, 374273, Russia
lana.lavrenteva.1984@mail.ru

*All-Russia Research institute of soybean

19, Ignatievskoe road, Blagoveschensk, Russia

Tel./fax: (4162) 36-94-50, 36-95-58

amursoja@gmail.com

Key words: Glycine max, catalase, specific activity, plural forms, inoculation, copper sulfate.

The influence of copper sulfate on morphological traits and catalase activity of soybean after inoculation by rhizobium was studied. It should be mentioned that improvement of morphological traits of soybean cultivated on nutrient medium after inoculation by strains TB-508 and 648a at presence of copper sulfate in concentration $6 \cdot 10^{-4}$ M being an optimal one. A slow-growing strain 648a showed to have the highest virulence. Soybean plants inoculated by the strain TB-508 had a stable activity and stable number of the plural forms which characterize its high adaptability.

Введение. В настоящее время сельскохозяйственное производство становится все более зависимым от экологических факторов антропогенного происхождения, которые в значительной степени изменяют свойства почвы, продуктивность растений и качество продукции [1]. Считают, что из всего комплекса загрязнителей окружающей среды наиболее опасными являются тяжелые металлы (ТМ), которые способны накапливаться в почве, растениях и, естественно, продуктах питания человека [2; 3; 4; 5]. Они могут поступать с отходами промышленности, из атмосферы, со сточными водами, выбросами транспорта, минеральными удобрениями, пестицидами [6; 7]. Многочисленные публикации свидетельствуют о том, что одним из основных загрязнителей является медь [8; 9; 10].

Амурская область является северным ареалом произрастания дикорастущей сои, которая в результате эволюции вступила в симбиотические отношения с определенным видом почвенных бактерий (ризобий сои) [11]. Роль клубеньковых бактерий не ограничивается только удовлетворением потребности растений в азоте. Клубеньковые бактерии синтезируют вещества, способные убивать или задерживать рост возбудителей различных болезней культурных растений [12].

В связи со сложными метеоусловиями региона востребованы сорта с высокими адаптивными показателями, способные продуктивно взаимодействовать со специфическими для сои клубеньковыми бактериями.

Ранее нами проведено исследование по влиянию ТМ на РНКазную активность проростков сои после инокуляции ризобиями сои [13].

Соя имеет большой ареал обитания и ее приспособленность к окислительному стрессу, который создают ТМ, зависит от активности ферментов, особенно антиоксидантного комплекса, в состав которого входит фермент каталаза (К.Ф.1.11.1.6.). Это двухкомпонентный фермент, содержащий четыре гема, каждый из которых прочно связан с белком. Роль каталазы состоит в том, что она защищает организм от вредного влияния пероксида водорода, образующегося при дыхании.

Цель работы – изучить влияние сульфата меди на морфологические показатели и активность каталаз сои после ее инокуляции *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii*.

Материалы и методы. Объектом исследования служил сорт сои Гармония (*Glycine max* (L.) Merrill), полученный из ФГБНУ ВНИИ сои. Использовали коллекционные штаммы бактерий ризобий сои селекции ВНИИ сои – *Bradyrhizobium japonicum* (Kircher, 1986) Jordan и *Sinorhizobium fredii* (Scholla and Elkan, 1984). Нами использовались активные коллекционные штаммы БД-32 и 648а в качестве штаммов-стандартов по виду, на них получены авторские свидетельства, и перспективные штаммы ТБ-508 и ТА-125,

депонированные во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Пушино). Быстро- и медленно растущие штаммы ризобий сои различаются по срокам появления колоний в чашках Петри на минерально-растительной среде, источникам углеводного питания, продуктам метаболизма, свойствам вирулентности и адаптационным возможностям [14].

Сою выращивали на питательной среде (K_2HPO_4 – 1,0 г/л; $MgSO_4$ – 1,0 г/л; $CaSO_4$ – 0,5 г/л; $FeSO_4$ – следы; H_3BO_3 – следы; $MnSO_4$ – следы; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ – следы), определяли способности клубеньковых бактерий образовывать клубеньки при температуре +26 °С и относительной влажности 69 % по общепринятой методике в модификации Бегуна [15]. Освещенность измеряли при помощи люксметра Ю-116. Она составила 450 лх.

В эксперименте использовали соли серной кислоты, поскольку ионная сила действия солей проявляется в ряду $CO_3^{2-} > Cl^- > SO_4^{2-}$. К тому же в аэрозолях, поступающих от промышленных предприятий, тяжелые металлы присутствуют в виде сульфатов [16]. В опыте использовали раствор сульфата меди в концентрациях $6 \cdot 10^{-5}$ М; $6 \cdot 10^{-4}$ М и $3 \cdot 10^{-3}$ М. Контрольными были образцы, выращенные на питательной среде без добавления соли, без инокуляции штаммами ризобий сои, и растения сои, выращенные на питательной среде без добавления сульфата меди и инокуляции. Продолжительность опыта 16 дней, что соответствует появлению второго тройчатого листа.

Активность каталаз определяли газометрическим методом, содержание белка – по Лоури. Удельную активность выражали в единицах активности на миллиграмм белка. Электрофоретические спектры фермента определяли методом электрофореза в 7,5 %-ном ПААГ с последующим выявлением зон каталаз. Поскольку стандартным критерием для характеристики множественных форм ферментов является их относительная электрофоретическая подвижность (Rf), разнокачественность сортов сои оценива-

ли по выявленным формам каталаз согласно их Rf. Нумерация форм проведена от более высокоподвижных к низкоподвижным. В ходе исследований впервые выявлено 13 форм каталаз проростков сои. Каждой форме каталазы было присвоено свое сокращенное обозначение в соответствии со значениями их Rf от K1 до K13.

Биохимические исследования проводили в двух биологических и трех аналитических повторностях. Дисперсионный анализ проводили в изложении Плохинского [17].

Вирулентность изучаемых штаммов ризобий сои определяли по наличию клубеньков на корнях сои в процентном отношении. Достоверность полученных данных проверяли по отсутствию клубеньков на корнях сои в контрольных пробирках без инокуляции.

Результаты и обсуждение. Ранее проведенный эксперимент показал, что внесение в питательную среду сульфата меди в концентрации 1 г/л оказывало угнетающее действие на сою по всем морфологическим показателям. Поэтому для дальнейших исследований использовали более низкие концентрации соли.

Анализ результатов показал положительное влияние CuSO_4 в концентрации $6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ на морфологические показатели сои по сравнению с контролем (таблица). При данной концентрации штаммы БД-32 и 648а образовали наибольшее количество клубеньков, причем вирулентность штамма 648а увеличилась в 1,5 раза.

Высокая концентрация сульфата меди ($3 \cdot 10^{-3} \text{M}$) оказала угнетающее действие на сою после инокуляции всеми исследованными штаммами. На сое, инокулированной штаммом ТБ-508, при внесении в питательную среду сульфата меди в концентрации $6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ наблюдалось большое количество боковых корней, что впоследствии привело к снижению вирулентности, но данный факт не отразился на высоте растения. Следует отметить, что растения сои, семена которых инокулировали данным штаммом, обладали более высокими морфологическими показателями, и даже высокая концентрация соли

($3 \cdot 10^{-3} \text{M}$) привела к незначительному уменьшению высоты сои по сравнению с контролем.

Таблица

Морфологические показатели сои и вирулентность выросших на питательной среде с добавлением сульфата меди различной концентрации после инокуляции семян бактериями ризобий сои

Штамм	Концентрация CuSO_4 , М			
	0	$6 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^3$
Вегетативная масса, балл				
БД-32	4	4	4	3
ТБ-508	4	5	4	4
648а	4	3	4	4
ТА-125	4	4	4	4
Без инокуляции	4	4	5	4
НСР ₀₅	1	1	1	1
Высота растения, см				
БД-32	20	16	16	11
ТБ-508	16	21	21	15
648а	19	15	22	15
ТА-125	21	14	20	16
Без инокуляции	19	19	25	15
НСР ₀₅	3	3	3	4
Длина корневой системы, см				
БД-32	13	14	15	8
ТБ-508	12	16	14	9
648а	12	33	13	8
ТА-125	12	14	14	11
Без инокуляции	11	14	14	10
НСР ₀₅	2	4	3	4
Вирулентность, %				
БД-32	43	37	60	22
ТБ-508	38	45	26	19
648а	48	40	71	25
ТА-125	49	19	37	24
Без инокуляции	0	0	0	0

Интересно, что при наступлении фазы первого и второго тройчатого листа большая часть растений сои, выросших на питательной среде с добавлением раствора исследуемой соли в концентрации $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$, отличались ломкостью.

Таким образом, в результате эксперимента установили, что высокая концентрация сульфата меди оказала угнетающее действие на морфологические показатели сои, инокулированной медленно-растущими штаммами (648а и ТА-125) и быстрорастущим штаммом БД-32, где показатели сои были ниже, чем у контроля.

Исследование влияния сульфата меди на удельную активность и множественные формы каталаз в контрольных образцах, без инокуляции, показало увеличение активности сои по сравнению с контролем 1К (рисунок А, Б).

Следует отметить, что при концентрации соли $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ каталазная активность

увеличилась в три раза, что, возможно, связано с усилением метаболических процессов. Однако гетерогенность каталаз сои в присутствии сульфата меди несколько снижалась, за исключением образцов, выращенных на питательной среде, содержащей соль в концентрации $6 \cdot 10^{-4}$ М, где число множественных форм каталаз сохранилось на уровне контроля.

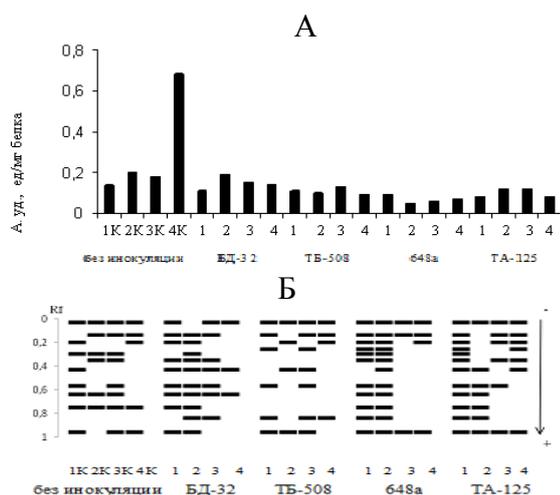


Рисунок – Удельная активность (А) и схемы энзимограмм (Б) каталаз сои на питательной среде с добавлением сульфата меди в концентрациях: 2 – $6 \cdot 10^{-5}$ М; 3 – $6 \cdot 10^{-4}$ М; 4 – $3 \cdot 10^{-3}$ М; 1К, 2К, 3К, 4К – контроли (см. методику)

Удельная активность каталаз в контрольных образцах, инокулированных штаммами ризобий сои, незначительно снизилась по сравнению с контролем 1К. Отмечены значительные отличия по количеству множественных форм фермента. Инокуляция сои быстрорастущим штаммом БД-32 и медленнорастущими штаммами 648a и ТА-125 привела к увеличению количества форм каталаз. Инокуляция медленнорастущим штаммом 648a при наличии в питательной среде сульфата меди в концентрации $6 \cdot 10^{-5}$ М привела к максимальному количеству множественных форм (12), а при повышенных ее концентрациях ($6 \cdot 10^{-4}$ М и $3 \cdot 10^{-3}$ М) число форм значительно снизилось, что, вероятно, связано со снижением его адаптивных возможностей.

Выводы. Установлены характерные изменения удельной активности и спек-

тра множественных форм каталаз сои в зависимости от концентрации сульфата меди и штаммов ризобий сои. Выявлено, что инокуляция быстрорастущими штаммами *S. fredii* ТБ-508 и БД-32 и медленнорастущим штаммом *B. japonicum* ТА-125 семян сои на питательной среде в присутствии исследуемой соли привела к увеличению или стабильности удельной активности каталаз сои по сравнению с контролем, что позволяет сделать вывод о повышенной адаптивности данных штаммов. Высокая концентрация сульфата меди привела к снижению количества множественных форм каталаз сои, что свидетельствует о значительном ее стрессе в данных условиях. Стабильная активность и стабильное число множественных форм для сои, инокулированной штаммом ТБ-508, соотносится с хорошими морфологическими показателями, что характеризует его высокие адаптивные возможности.

Таким образом, данный эксперимент подтверждает результаты исследований природных популяций ризобий, проведенных во Всероссийском НИИ сои, о том, что штаммы вида *S. fredii* более адаптивны по своей природе по сравнению с видом *B. japonicum* [18].

Показано, что изучение влияния сульфата меди различных концентраций и симбиоза сои с ризобиями на удельную активность и множественные формы каталаз позволяет проследивать адаптивную реакцию сои и штаммов на молекулярном уровне.

Список литературы

1. Минеев В.Г., Гомонова Н.Ф. Накопление тяжелых металлов в почве и поступление их в растения в длительном агрохимическом опыте // Доклады Российской академии с.-х. наук. – 1993. – № 6. – С. 20–22.
2. Ильин В.Б. Тяжелые металлы в системе почва-растение. – Новосибирск: Наука, 1991. – С. 151.
3. Минеев В.Г. Проблема тяжелых металлов в современной земледелии // Матер. науч.-практ. конф. – М.: Агропромиздат, 1994. – С. 5–11.
4. Черных Н.А., Милащенко Н.З., Ладонин В.Ф. Экоотоксикологические аспекты загрязнения почв тяжелыми металлами. – М.: Агроконсалт, 1999. – С. 176.
5. Большаков В.А. Микроэлементы и тяжелые металлы в почвах // Почвоведение. – 2002. – № 7. – С. 844–849.
6. Потатуева Ю.А., Каслецкий Ю.И., Хлыстовский А.Д., Прищеп Е.Г., Сидоренкова Н.К., Янишевский Ф.В. Влияние длительного применения

фосфорных удобрений на накопление в почве и растениях тяжелых металлов и токсических элементов // *Агрохимия*. – 1994. – № 11. – С. 98–113.

7. Patra M., Sharma A. Mercury toxicity in plants // *Bot. Rev.* – 2000. – V. 66. – P. 379–422.

8. Cavallaro N., Brige Mc. N.B. Activities of Cu and Cd in soil solutions as affected by pH // *Soil Sci. Amer. J.* – 1980. – V. 44. – No 4. – P. 729–732.

9. Матасова И.Ю. Свинец и медь в почвах агроландшафтов Новороссийского эколого-экономического района // Тезисы докладов III Международного Совещания «Геохимия биосферы», г. Новороссийск, 2001 г. – С. 39–40.

10. Ляшенко Е.А. Подвижные формы тяжелых металлов (Cu, Zn, Pb, Cd) в почвах геохимических ландшафтов Краснодарского края // Дис. ... к. г. н. – 2009. – 192 с.

11. Якименко М.В., Бегун С.А. Пути повышения эффективности симбиотической азотфиксации в посевах сои Амурской области // Сб.: Результаты и направления исследований по сое на Дальнем Востоке и в Сибири. – Благовещенск, 2012. – С. 108–115.

12. Tahir M.M., Abbasi M.K., Faizia Y. Hafeez. Characterisation and evaluation of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii nodulating rhizobia* isolated from white clover native to Azad Jammu and Kashmir // *Ann. Microbiol.* – 2008. – 58. – No 2. – С. 181–188.

13. Тильба В.А., Лаврентьева С.И. Бегун А.С., Якименко М.В., Иваченко Л.Е., Коницев А.С. Влияние солей тяжелых металлов на активность и множественные формы РНКаз проростков сои после инокуляции *Bradyrhizobium Japonicum* и *Sinorhizobium fredii* // Доклады РАСХН. – 2013. – № 3. – С. 19–21.

14. Тильба В.А., Бегун С.А., Якименко М.В. Природные популяции ризобий сои и их использование в соевых агроценозах // Сб.: Инновационная деятельность аграрной науки в Дальневосточном регионе. – Владивосток, 2011. – С. 95–102.

15. Бегун С.А. Способы, приемы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои, методы аналитической селекции // Методические рекомендации. – Благовещенск: Изд-во «Зея», 2005. – 70 с.

16. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. – М.: Мир, 1989. – 439 с.

17. Плохинский Н.А. Биометрия // Учеб. пособие. 2-е изд. – М.: Изд-во Московского университета, 1970. – 146 с.

18. Якименко М.В. Изменение свойств клубеньковых бактерий сои родов *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium* амурской селекции под воздействием экологических факторов // Дис. ... к. б. н. – 2006. – 149 с.

References

1. Mineev V.G., Gomonova N.F. Nakoplenie tyazhelykh metallov v pochve i postuplenie ikh v rasteniya v dlitel'nom agrokhimicheskom opyte // *Doklady Rossiyskoy akademii s.-kh. nauk.* – 1993. – № 6. – С. 20–22.

2. Il'in V.B. Tyazhelye metally v sisteme pochva-rastenie. – Novosibirsk: Nauka, 1991. – S. 151.

3. Mineev V.G. Problema tyazhelykh metallov v sovremennom zemledelii // *Mater. nauch.-prak. konf.* – М.: Agropromizdat, 1994. – S. 5–11.

4. Chernykh N.A., Milashchenko N.Z., Ladonin V.F. Ekotoksikologicheskie aspekty zagryazneniya pochv tyazhelymi metallami. – М.: Agrokonsalt, 1999. – S. 176.

5. Bol'shakov V.A. Mikroelementy i tyazhelye metally v pochvakh // *Pochvovedenie.* – 2002. – № 7. – S. 844–849.

6. Potatueva Yu.A., Kasletskiy Yu.I., Khlystovskiy A.D., Prishchep E.G., Sidorenkova N.K., Yanishevskiy F.V. Vliyanie dlitel'nogo primeneniya fosfornykh udobreniy na nakoplenie v pochve i rasteniyakh tyazhelykh metallov i toksicheskikh elementov // *Agrokimiya.* – 1994. – № 11. – S. 98–113.

7. Patra M., Sharma A. Mercury toxicity in plants // *Bot. Rev.* – 2000. – V. 66. – P. 379–422.

8. Cavallaro N., Brige Mc. N.B. Activities of Cu and Cd in soil solutions as affected by pH // *Soil Sci. Amer. J.* – 1980. – V. 44. – No 4. – P. 729–732.

9. Matasova I.Yu. Svinets i med' v pochvakh agrolandshaftov Novorossiyskogo ekologo-ekonomicheskogo rayona // *Tezisy dokladov III Mezhdunarodnogo Soveshchaniya «Geokhimiya biosfery»*, g. Novorossiysk, 2001 g. – С. 39–40.

10. Lyashenko E.A. Podvizhnye formy tyazhelykh metallov (Cu, Zn, Pb, Cd) v pochvakh geokhimicheskikh landshaftov Krasnodarskogo kraya // *Diss. ... k. g. n.* – 2009. – 192 s.

11. Yakimenko M.V., Begun S.A. Puti povysheniya effektivnosti simbioticheskoy azotifikatsii v posevakh soi Amurskoy oblasti // *Sb.: Rezul'taty i napravleniya issledovaniy po soe na Dal'nem Vostoke i v Sibiri.* – Blagoveshchensk, 2012. – S. 108–115.

12. Tahir M.M., Abbasi M.K., Faizia Y. Hafeez. Characterisation and evaluation of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii nodulating rhizobia* isolated from white clover native to Azad Jammu and Kashmir // *Ann. Microbiol.* – 2008. – 58. – No 2. – S. 181–188.

13. Til'ba V.A., Lavrent'eva S.I. Begun A.S., Yakimenko M.V., Ivachenko L.E., Konihev A.S. Vliyanie soley tyazhelykh metallov na aktivnost' i mnozhestvennye formy RNKaz prorostkov soi posle inokulyatsii *Bradyrhizobium Japonicum* i *Sinorhizobium fredii* // *Doklady RASKhN.* – 2013. – № 3. – S. 19–21.

14. Til'ba V.A., Begun S.A., Yakimenko M.V. Prirodnye populyatsii rizobiy soi i ikh ispol'zovanie v soevykh agrotsenozakh // *Sb.: Innovatsionnaya deyatel'nost' agrarnoy nauki v Dal'nevostochnom regione.* – Vladivostok, 2011. – S. 95–102.

15. Begun S.A. Sposoby, priemy izucheniya i otbora effektivnykh shtammov klubenk'ovykh bakteriy soi, metody analiticheskoy seleksii // *Metodicheskie rekomendatsii.* – Blagoveshchensk: Izd-vo «Zeya», 2005. – 70 s.

16. Kabata-Pendias A., Pendias Kh. Mikroelementy v pochvakh i rasteniyakh. – М.: Mir, 1989. – 439 с.

17. Plokhinskiy N.A. Biometriya // *Ucheb. posobie.* 2-e izd. – М.: Изд-во Московского университета, 1970. – 146 с.

18. Yakimenko M.V. Izmenenie svoystv klubenk'ovykh bakteriy soi rodov *Bradyrhizobium* i *Sinorhizobium* amurskoy seleksii pod vozdeystviem ekologicheskikh faktorov // *Dis. ... k. b. n.* – 2006. – 149 с.