



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.05.480>

Метаболічні зміни вмісту органічних кислот у коренях рослин *Glycine max* (*Fabaceae*) на ранніх етапах формування симбіозу за дії фунгіцидів

Анастасія В. ПАВЛИЩЕ, Олена В. КИРИЧЕНКО, Сергій Я. КОЦЬ

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17, Київ 03022, Україна
zapadenka2015@gmail.com

Pavlyshche A.V., Kyrychenko O.V., Kots S.Ya. **Metabolic changes in the content of organic acids in roots of *Glycine max* (*Fabaceae*) at the early stages of symbiosis formation under the influence of fungicides.** Ukr. Bot. J., 2018, 75(5): 480–488.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska Str., Kyiv 03022, Ukraine

Abstract. The purpose of this work was to investigate the metabolic profile of organic acids in soybean roots at the early stages of the formation of the *Bradyrhizobium japonicum* 6346 – soybean symbiotic system in pot experiment (from sprouts to the stage of three true leaves) by gas chromatography/mass spectrometry under the influence of fungicides Fever (class triazoles) and Standak Top (classes of phenylpyrazoles + benzimidazoles + strobilurins) used for seed treatment. Essential metabolic changes in the content of the main organic acids were revealed, namely malonic, butyric, malic, succinic, propionic, acetic, oxalic, palmitic, stearic, and benzoic acids, associated with the ontogenetic development of soybean plants. Seed treatments with fungicides Fever and Standak Top followed by inoculation with rhizobia led to notably accumulation of organic acids, in particular to significant increase of the content of propionic, malic, succinic, and acetic acids. This can be due to involvement of the above mentioned acids as intermediates of the Krebs cycle and the glyoxylate cycle; they can be as well considered as compounds with a protective effect for the formation of adaptive reactions of plants under anthropogenic stress. Benzoic acid detected at the functioning stage of symbiotic apparatus of soybean is possibly a protective compound. After seed treatment with fungicides, in soybean roots inoculated with nodule bacteria significant changes in the content of organic acids were observed. These results suggest that variation in organic acid content is a component of adaptation of leguminous plants to the action of anthropogenic stressor and maintenance of symbiotic systems under such conditions.

Keywords: *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum* 6346, soybean, symbiosis, fungicides, metabolom, organic acids

Вступ

Формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу – складний біологічний процес, який знаходиться під контролем генів обох симбіонтів і в якому задіяна велика кількість метаболітів як рослини, так і мікроорганізмів (Provovov et al., 2010). Метаболічна регуляція процесу фіксації молекулярного азоту, що здійснюється бобово-ризобіальними системами, досліджена фрагментарно (Colebatch et al., 2004; Brechenmacher et al., 2010; Levishko et al., 2016). На сьогодні виявлено до 40 основних метаболітів бульбочок лядвенцю і встановлено кілька спільних метаболічних шляхів, зокрема в гліколізі, фіксації CO₂, біосинтезі амінокислот, органічних кислот, пуринів, гему, а також в окисно-відновному

метаболізмі (Colebatch et al., 2004). Застосування метаболомного профілю при дослідженні соєво-ризобіального симбіозу дозволило виявити та ідентифікувати в рослинах сої *Glycine max* (L.) Merr., інокульованої специфічними бульбочковими бактеріями, до 166 малих молекул, серед них флавоноїди, амінокислоти, жирні карбонові кислоти, різноманітні вуглеводи. Дані сполуки утворюються в коренях і кореневих волосках сої під час інфікування рослин ризобіями (Brechenmacher et al., 2010). Метаболомні дослідження вмісту різних класів низькомолекулярних сполук у коренях сої за інокуляції насіння штамми *Bradyrhizobium japonicum*, які різнилися за здатністю до засвоєння молекулярного азоту (високоактивний 6346 та неактивний 604k), показали, що серед виявлених метаболітів домінуючою групою (близько 50%) були багатоатомні спирти, потім карбонові кислоти

© А.В. ПАВЛИЩЕ, О.В. КИРИЧЕНКО, С.Я. КОЦЬ, 2018

(20–43%), цукри (20%) й амінокислоти (2%). При цьому не встановлено суттєвих відмінностей у вмісті основних груп низькомолекулярних сполук коренів сої при формуванні симбіотичних систем різної здатності до засвоєння азоту, а виявлено зміну їхнього рівня залежно від фаз розвитку рослин (Levishko et al., 2016).

Аналіз метаболічних змін у рослинному організмі в умовах стресу різної природи дозволяє виявити та ідентифікувати сполуки, які відсутні за нормальних умов росту рослин, що розкриває певні шляхи регулювання адаптивного потенціалу рослин (Thara et al., 2011; Obata, 2012). Дослідження метаболомного профілю рослин за дії різних чинників абіотичної та біотичної природи дає максимальну інформацію про обмін речовин у рослинному організмі (Roessner, 2009; Hall, 2011) та дозволяє розкрити механізми формування адаптивних реакцій рослини на стрес й окреслити шляхи його подолання.

Протруювання насіння бобових культур, зокрема сої, є обов'язковим технологічним прийомом при вирощуванні даної культури задля зниження ступеня ураження рослин патогенами. Проте, застосування пестицидів негативно впливає на формування й функціонування бобово-ризобіальних симбіотичних систем (Pavlyshche et al., 2017) що, можливо, пов'язано зі змінами метаболізму. Роботи із вивчення метаболому рослин сої за дії фунгіцидів різних класів і передпосівної бактеризації насіння на сьогодні відсутні, тому актуальним є дослідження метаболічних змін рослин за дії антропогенного стрес-фактору — застосування фунгіцидів для протруювання насіння.

Одним із основних класів низькомолекулярних метаболітів рослин є органічні кислоти. Вони беруть безпосередню участь у ключових обмінних процесах та іонному обміні, що супроводжують надходження поживних речовин через корені. При цьому коренева система забезпечує трофічні взаємовідносини рослини й мікроорганізмів. Симбіотична взаємодія бульбочкових бактерій і рослин сої при формуванні бульбочок характеризується високими енергетичними затратами на синтез органічних сполук для підтримання росту й розвитку рослин (Widhalm et al., 2009). Показано (Kaschuk et al., 2009), що мікросимбіонти здатні стимулювати фотосинтез до 28% для компенсації витрат вуглецю симбіотичною

системою. Внаслідок цього інокульовані рослини можуть збільшувати інтенсивність дихання для отримання більшої кількості енергії, необхідної для росту й підтримання клітинних структур (Pavlyshche et al., 2017). Висока фотосинтетична активність підвищує рівень асимілятів у т. ч. й органічних кислот для використання в метаболічних процесах. (Widhalm et al., 2009; Kirizii et al., 2014).

Виходячи з вищесказаного, метою даної роботи було дослідження метаболомного профілю органічних кислот у коренях сої на ранніх етапах формування симбіотичних систем на фоні протруювання насіння фунгіцидами різних класів.

Матеріали та методи

У досліджах використовували насіння рослин сорту *Glycine max* 'Алмаз', створеного методом гібридизації сортів 'Бельці 3/86-х' та 'Fiskebv-840-5-3'. Оригіатор сорту Л.Г. Білявська та Полтавська державна аграрна академія (дані наведено за <http://www.semagro.com.ua/products/almaz-483.html>). Протруювання насіння фунгіцидами Февер і Стандак Топ проводили в день посіву, використовуючи рекомендовану виробниками дозу 1 норма. Февер — фунгіцид контактної-системної дії ("Bayer CropScience AG", Німеччина) з активною речовиною протіоконазол (300 г/л) із класу триазолів. Стандак Топ ("BASF", Німеччина) — інноваційний протруйник для контролю основних хвороб і шкідників сої з діючими речовинами фіпроніл (250 г/л, клас фенілпіразоли) + тіофанатметил (225 г/л, клас бензimidазоли) + піракло-стробін (25 г/л, клас стробілуринів). Протруєне насіння через 1 год інокульовали впродовж години суспензією *Bradyrhizobium japonicum* 6346 (активний виробничий штам-стандарт із музейної колекції штамів азотфіксувальних та асоціативних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України) із титром клітин 10^8 кл/мл. Контролем був варіант без обробки насіння фунгіцидами, але з інокуляцією ризобіями. Підготовлене насіння висівали у попередньо простерилізовані посудини (ємністю 4 кг) у піщаний субстрат із поживним середовищем Гельрігеля (0,25 норми азоту) у 7-кратній повторності в кожному варіанті. Відбори рослин сої для визначення метаболічних змін у коренях проводили у фазі розвитку примордіального листка (19-денні рослини), одного справжнього (23-денні), двох справжніх (29-денні) і трьох

Таблиця 1. Зміни вмісту (мкг/100 мкг зразка) органічних кислот у коренях сої на ранніх етапах формування симбіозу за дії фунгіцидів на насіння

Table 1. Changes in content of organic acids (mkg/100 mkg sample) in the roots of soybeans at the early stages of the symbiosis formation under seed treatment with fungicides

Сполука (кислота)	Фази I–IV розвитку рослин, вік рослин											
	примордіального листка (I), 19-денні рослини			одного справжнього листка (II), 23-денні рослини			двох справжніх листків (III), 29-денні рослини			трьох справжніх листків (IV), 39-денні рослини		
	Варіант обробки насіння											
	К	Ф	С	К	Ф	С	К	Ф	С	К	Ф	С
пропіонова	0,66	9,13*	0,68	0,76	1,78*	1,57*	0,53	0,39	0,43	0,40	0,15**	0,22**
малонова	0,25	0,11**	0,13**	0,41	1,19*	-	-	0,06*	0,33*	0,12	0,23*	0,45*
масляна	0,27	0,03**	0,05**	-	-	-	0,07	0,20*	0,08	0,30	-	-
яблучна	1,53	0,63**	0,61**	0,12	0,47*	0,34*	0,31	0,58*	1,64*	0,50	0,76	0,70
стеаринова	0,80	0,69	0,74	1,49	1,60	1,87*	0,36	0,65*	0,91*	0,79	-	0,47**
пальмітинова	0,59	0,22**	0,18**	0,72	0,71	0,61	0,28	0,40*	0,42*	0,46	1,06*	0,32
бурштинова	0,35	0,25	0,29	-	-	-	0,11	-	0,05**	0,22	0,03**	0,01**
оцтова	0,02	0,17*	0,18*	-	0,59*	-	0,05	0,01**	0,14*	0,01	0,007	0,03*
шавлева	-	-	-	-	-	-	-	0,16*	0,04*	-	-	-

У табл. 1–3 для рослин фази I: К – без обробки фунгіцидами, Ф – Февер, С – Стандак Топ; для рослин фази II – відсутня сполука; для рослин фази III – представлено середні значення п'яти біологічних (середня наважка зразка з п'яти рослин) і трьох аналітичних повторень.

Тут і в табл. 2: * – достовірне за $P \leq 0,05$ збільшення відносно контролю; ** – достовірне за $P \leq 0,05$ зменшення відносно контролю.

справжніх листків – початку бутонізації (39-денні рослини). Крім того, досліджували метаболічні зміни в проростках сої віком 4 і 7 діб.

Екстракцію, дериватизацію та аналіз метаболітів проводили з деякою модифікацією за загальноприйнятою методикою виділення метаболітів із коренів рослин (Lisec et al., 2006). Для цього одразу після відбору наважки зразків (110 мг) коренів сої заморожували в рідкому азоті та гомогенізували в мікропробіріці.

Проби готували наступним чином: до 100 мг зразка додавали 1,4 мл 100%-ого метанолу (Merck KGaA, Німеччина) ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) та 60 мкл рибітолу (Merck KGaA, Німеччина) (0,2 мг/мл, внутрішній стандарт). Для екстрагування матеріал витримували на водяній бані з постійним перемішуванням при $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж 25 хв, після чого центрифугували 10 хв при 11000 г. Супернатант переносили у віали, додаючи 750 мкл хлороформу (Альфарус, Україна) ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) та 1,5 мл деіонізованої води ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Суміш ретельно струшували й центрифугували 15 хв при 2200 г. Для подальшої дериватизації з метою стабілізації карбонільних залишків метаболітів відбирали 150 мкл верхньої (полярної) фази, переносили в інший флакон та випарювали у вакуумі без нагрівання 7–9 год. До висушеного зразка додавали 40 мкл О-метилгідроксиламонію

хлориду (Merck KGaA, Німеччина) (20 мг на 1 мл піридину, реактив обов'язково готували свіжий) та інкубували, постійно перемішуючи впродовж 2,5 год при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lisec et al., 2006). У процесі дериватизації конденсат реагентів осідав на кришці та стінках флакону, тому важливо суміш центрифугувати упродовж 1 хв при 2200 г після кожної наступної інкубації. За допомогою реагенту триметилсилілу (TMS) проводили дериватизацію зразків. Для цього додавали 70 мкл 2,2,2-трифтор-N-метил-N-триметилсиліл ацетаміду (MSTFA) (Merck KGaA, Німеччина) та інкубували, постійно перемішуючи впродовж 40 хв при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Після цього зразки переносили у віали для газорідної хроматографії і залишали на 10–15 хв для охолодження до кімнатної температури.

Зразки аналізували на хроматографі "Agilent GC system 7890A" (США) із мас-спектрометром 5975С, із застосуванням HP5MS-капілярної колонки довжиною 30 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм, плівкою зі щільністю 0,25 мкм та постійною протокою гелію зі швидкістю 1 мл/хв. Об'єм зразка, що наносився, становив 2 мкл за температури інжектора $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. Початкова температура колонки становила $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ із затриманням у 5 хв до $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 1 хв при затримці 2 хв.

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

Всі досліди проводили в 5-разовому біологічному та 3-разовому аналітичному повторенні. Значення $P \leq 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці. Експериментальні дані статистично обробляли з використанням програми Microsoft Excel'10.

Результати та обговорення

Показано (табл. 1), що передпосівна обробка насіння фунгіцидами із наступною інокуляцією його бульбочковими бактеріями штаму *B. japonicum* 634b суттєво змінювала якісний і кількісний склад органічних кислот у коренях сої на ранніх етапах формування симбіозу (від фази розвитку примордіального листка до фази розвитку трьох справжніх листків). У фазі I розвитку примордіального листка відмічено суттєве порівняно до контролю (до 14 і 9 разів відповідно) підвищення рівня пропіонової та оцтової кислоти на фоні зниження від 1,2 до 2,5 раза кількості малонової, яблучної, бурштинової та пальмітинової кислот. Слід відзначити суттєве (у 9 і 5 разів) зменшення порівняно із контролем рівня масляної кислоти у насінні після використання фунгіцидів Февер і Стандак Топ відповідно. У наступній фазі вегетації рослин (фаза II, розвитку одного справжнього листка) зберігався високий рівень (удвічі більший за контроль) вмісту пропіонової кислоти в дослідних варіантах, однак її кількість за дії Феверу була значно нижчою (у 5 разів), ніж у попередній фазі I розвитку сої, тоді як у варіанті з обробкою насіння Стандак Топом відзначено підвищення вмісту даної кислоти в 2,3 раза. Водночас за дії Феверу збільшувався рівень малонової (втричі) та яблучної (у 4 рази) кислот. Застосування Стандак Топу призвело до зростання в 2,8 та 1,3 разів вмісту яблучної та стеаринової кислот при повній відсутності малонової кислоти. Слід відмітити відсутність у коренях сої в цій фазі вегетації (II), на відміну від попередньої (I), бурштинової, масляної та оцтової кислот (за винятком варіанта із обробкою насіння Февером, оскільки в коренях рослин відзначено наявність оцтової кислоти). У фазі III розвитку двох справжніх листків у коренях сої суттєво зменшувалась кількість пропіонової кислоти. Дана тенденція зберігалась і в наступній фазі вегетації

Таблиця 2. Вміст (мкг/100 мкг зразка) яблучної та бензойної кислот в проростках і рослинах сої, інокульованої бульбочковими бактеріями за дії фунгіцидів

Table 2. Content (mkg/100 mkg sample) of malic and benzoic acids in soybean seedlings and plants under seeds inoculation with rhizobia and fungicides treatment

Вік рослин	Яблучна кислота			Бензойна кислота		
	Варіант обробки насіння					
	К	Ф	С	К	Ф	С
4-добові проростки	1,26	1,78*	1,29	-	-	-
7-добові проростки	1,77	1,59**	1,71	-	-	-
19-денні рослини	1,53	0,63**	0,61**	-	-	-
23-денні рослини	0,12	0,47*	0,34*	-	-	-
29-денні рослини	0,31	0,58*	1,64*	0,01	0,02*	0,09*
39-денні рослини	0,50	0,76*	0,70*	0,06	0,04**	0,02**

рослин (трьох справжніх листків, фаза IV). Наразі у варіантах із застосуванням фунгіцидів суттєво зростає рівень малонової (удвічі і майже в чотири рази), масляної (втричі), яблучної (удвічі й 5,3 раза), стеаринової (удвічі та втричі), пальмітинової (удвічі) та оцтової (втричі, за використання Стандак Топ) кислот. На відміну від попередніх фаз розвитку (фази I, II) рослини у варіантах із обробкою насіння фунгіцидами містили в коренях шавлеву (табл. 1) та бензойну кислоти (табл. 2), рівень яких суттєво перевищував такий у рослин контрольного варіанту. Корені рослин сої у фазі IV розвитку трьох справжніх листків характеризувалися закономірно більшим вмістом малонової та яблучної кислот при суттєвому зниженні порівняно із контролем пропіонової (в 2,7 раза та вдвічі), стеаринової (удвічі, за використання Стандак Топу), бурштинової (у 7 і 22 разів) та бензойної (у 1,5 і 3 раза) кислот. Зафіксовано відсутність масляної кислоти у коренях рослин дослідних варіантів порівняно до контролю та повну відсутність шавлевої кислоти у коренях сої в цій фазі вегетації рослин.

У табл. 3 наведені кількісні співвідношення органічних кислот у коренях сої, нормовані до вмісту пальмітинової кислоти (пальмітинова кислота = 1), оскільки лише вона з поміж виявлених була постійно присутньою в коренях рослин усіх варіантів протягом досліджуваних фаз розвитку. Отримані результати свідчать про зміни балансу цього класу сполук і дозволяють оцінити вплив передпосівної обробки насіння фунгіцидами на метаболічні зміни основних органічних кислот у коренях рослин сої. Очевидним є суттєве зростання у рослинах дослідних варіантів вмісту більшості

Таблиця 3. Відносний вміст органічних кислот у коренях сої на ранніх етапах формування симбіозу за дії фунгіцидів на насіння)

Tabl. 3. The relative content of organic acids in soybean roots at the early stages of the symbiosis formation under seed treatment with fungicides

Кислота	Фази I–IV розвитку сої, вік рослин											
	примордіального листка (I), 19-денні рослини			одного справжнього листка (II), 23-денні рослини			двох справжніх листків (III), 29-денні рослини			трьох справжніх листків (IV), 39-денні рослини		
	К	Ф	С	К	Ф	С	К	Ф	С	К	Ф	С
пропіонова	1,1	41,5	3,8	1,1	2,5	2,6	1,9	1,0	1,1	0,9	0,1	0,7
малонова	0,4	0,5	0,7	0,6	1,7	0	0	0,2	0,8	0,3	0,2	2,1
масляна	0,5	0,1	0,3	0	0	0	0,3	0,5	0,2	0,7	0	0
яблучна	2,6	2,9	3,4	0,2	0,7	0,6	1,1	1,5	3,9	1,1	0,7	2,2
стеаринова	1,4	3,1	4,1	2,1	2,3	3,1	1,3	1,6	2,2	1,7	0	1,5
пальмітинова	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
бурштинова	0,6	1,1	1,6	0	0	0	0,4	0	0,1	0,5	0,03	0,03
оцтова	0,03	0,8	1,0	0	0,8	0	0,2	0,03	0,3	0,02	0,007	0,1
шавлева	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,1	0	0	0
бензойна	0	0	0	0	0	0	0,04	0,05	0,2	0,1	0,004	0,06

Позначення: □ – підвищення вмісту порівняно до контролю; ■ – зниження вмісту порівняно до контролю; ■ – дана сполука вперше з'являється; ■ – дана сполука вперше з'являється і вище за контроль.

органічних кислот на ранньому етапі розвитку рослин (фаза I) – пропіонової, стеаринової, бурштинової та оцтової кислот при суттєвому зниженні вмісту масляної кислоти.

Дія Феверу за передпосівної обробки насіння призводила у фазі II одного справжнього листка до підвищення рівня вмісту пропіонової, малонової, яблучної та бурштинової кислот, тоді як при застосуванні Стандак Топу – пропіонової, яблучної та стеаринової кислот. Відмінною особливістю є те, що рослини у фазі III розвитку двох справжніх листків накопичували в коренях шавлеву та бензойну кислоти (табл. 1, 2), активно продукуючи малонову, яблучну, стеаринову й оцтову кислоти у варіанті з обробкою насіння Стандак Топом, на відміну від обробки Февером, після якої вміст основних органічних кислот у коренях сої був однаковим із контролем, за виключенням пропіонової та бурштинової кислот, вміст яких знижувався. У період активної азотфіксації соєво-ризобіальним симбіозом (Pavlyshche et al., 2017) рівень основних органічних кислот, за винятком малонової та яблучної (варіант із Стандак Топом), у коренях рослин зменшувався після обробки насіння фунгіцидами.

Розвиток рослин і формування їхньої вегетативної маси, реалізація симбіотичного та продуктивного потенціалу бобово-ризобіальних симбіозів залежать не лише від впливу екзогенних факторів (у даному випадку, фунгіцидів), але й

від дії певних фізіологічно активних сполук, у т. ч. й органічних кислот. Так, доведено можливість управління ростовими процесами та фізіологічними показниками рослин шляхом екзогенної обробки їх розчинами (0,001–0,01%) органічних кислот, зокрема, бурштинової, винної, оцтової та шавлевої. Максимальна ефективність дії органічних кислот спостерігалася при концентрації 0,01% (Zaimenko et al., 2013). У рослин пшениці та кукурудзи відзначено стимуляцію розвитку й формування біомаси проростків, а також активацію біосинтезу фотосинтетичних пігментів у листках, причому реакції цих рослин на екзогенну дію органічних кислот відрізнялися. Зокрема, для рослин пшениці з C₃-типом метаболізму вуглекислоти зафіксовано інтенсивний приріст надземної частини, тоді як для рослин кукурудзи із C₄-типом – кореневої системи. За дії бурштинової кислоти, яка є проміжним продуктом циклу Кребса, у рослинах стимулюються метаболічні реакції. Причому ця дія проявляється за низьких концентрацій та обумовлена не лише активацією фотосинтетичних процесів, але й інтенсивним синтезом відновлених форм амінокислот. Крім того, бурштинова кислота може змінювати активність ферментів, стимулювати схожість насіння, ростові процеси й синтез аскорбінової кислоти в рослинах, а також підвищувати їхню продуктивність. Вважають, що природний стимулятор росту рослин бурштинова кислота є

міметиком ефектів саліцилової кислоти (Yastreba, 2012). Показано (Kolupaev et al., 2011), що за дії саліцилової та бурштинової кислот в низьких концентраціях (10 мкМ і 1 мМ відповідно) на рослинні клітини (колеоптілі пшениці) підвищується активність АФК-генеруючих ферментів (НАДФН-оксидази, позаклітинних пероксидаз). Встановлено підвищення активності антиоксидантних ферментів (розчинних форм гваяколпероксидази) у етіюльованих проростках проса за дії екзогенних саліцилової та бурштинової кислот, особливо за умов теплового стресу. Виявлено також стрес-протекторний ефект даних кислот (активація росту рослин, збільшення вмісту хлорофілів, підвищення активності антиоксидантного ферменту супероксиддисмутази) на фоні посухи (Yastreba, 2012).

Отримані нами результати доводять, що інтермедіати циклу Кребса – бурштинова, яблучна й оцтова кислоти були основними в коренях сої (табл. 1). На самому ранньому етапі розвитку рослин (фаза I, примордіальний листок) вміст даних кислот у коренях сої за дії фунгіцидів був мінімальним. У фазах II–IV рослини цих варіантів активно накопичували яблучну кислоту, вміст якої був максимальним. Відомо, що вона є не лише інтермедіатом циклу Кребса, а й інтермедіатом гліюксилатного циклу, який відбувається у пероксисомах і може бути задіяний у захисті рослини при інфікуванні патогенами. У такому випадку малат (яблучна кислота) може бути метаболізований у цитозолі за участі NADP-Me-ферменту, який широко розповсюджений у рослинному організмі та залучений, зокрема, до біосинтезу специфічних захисних компонентів – флавоноїдів або кофакторів антиоксидантних ферментів (Couto, 2011). За умов обробки насіння фунгіцидами (табл. 2) вміст яблучної кислоти в проростках сої вказує на найвищий її рівень у варіанті за дії фунгіциду Февер (4-добові проростки) з подальшим зниженням у 7-добових проростках, тоді як за дії Стандак Топу не спостерігалось змін вмісту даної кислоти в проростках сої порівняно з контролем.

Відомо, що органічні кислоти є не тільки проміжними продуктами метаболізму вуглецю, а також компонентами, які беруть участь у взаємодії з ґрунтовою мікрофлорою (Lopez-Vucio, 2000; Badri, 2009), оскільки значна їхня частка із кореневими ексудатами надходить до ризосферної

зони рослин і впливає на розвиток ґрунтових мікроорганізмів. Зокрема, нами доведено (Kots et al., 2010), що деякі органічні кислоти та їхні солі, а саме бурштинова кислота та сукцинат, аскорбат, малат і цитрат натрію, є позитивними хемоатрактантами для бульбочкових бактерій сої, які сприяють залученню ризобій до ризосферної зони рослини-хазяїна. Показано, що внесення органічних кислот і вуглеводів, у субстрат росту при визначенні максимально активних за азотфіксацією груп мікроорганізмів створює додатковий позитивний селективний ефект на розвиток популяції азотфіксуючих мікроорганізмів та їхню функціональну активність (Burgmann, 2005).

Серед монокарбонних ароматичних кислот лише бензойна кислота (табл. 2) була відсутня в рослинах на ранніх етапах утворення симбіозу (проростки, фази розвитку примордіального й одного справжнього листків) та з'явилась у фазах III, IV, коли симбіотичні системи починали фіксувати молекулярний азот (Pavlyshche et al., 2017). Із літератури відомо, що бензойна кислота виконує протекторну роль у рослинах, її вміст позитивно корелює з підвищенням стійкості рослин до абіотичних стресів – холоду й посухи (Senaratna, 2003; Widhalm, 2009). Бензойна кислота за структурою подібна до саліцилової, сульфосаліцилової, метилсаліцилової, й, вірогідніше за все, являє собою основну функціональну молекулярну одиницю, яка задіяна у формуванні стійкості рослин за умов стресу (Williams et al., 2003). Саліцилова кислота за низьких концентрацій є сигнальною молекулою, яка синтезується рослинами, що, вірогідно, не дозволило виявити її в наших дослідженнях (табл. 1, 2). Вважають (Kolupaev et al., 2013), що саліцилова кислота та її структурні аналоги (бензойна, 4-оксибензойна кислоти) беруть участь в індукуванні адаптивних реакцій рослин, оскільки екзогенна обробка даними сполуками приводить до посилення генерації активних форм кисню, яке обумовлене активацією відповідних ферментів – НАДФН-оксидаз, пероксидаз і супероксиддисмутази.

На основі отриманих нами результатів (табл. 1, 2) можна припустити, що бензойна кислота, яка продукується в коренях рослин сої, починаючи з фази III розвитку двох справжніх листків у симбіозі з бульбочковими бактеріями за умов протруювання насіння фунгіцидами Февер і Стандак Топ, виконує

роль захисної сполуки. Яблучна, бурштинова й оцтова кислоти як інтермедіати циклу Кребса та гліоксилатного циклу синтезуються рослинами постійно, що дозволяє залучати їх до формування захисних реакцій рослин сої на стресовий фактор (фунгіциди) протягом ранніх фаз формування й функціонування симбіотичних систем.

У всіх досліджуваних фазах вегетації сої встановлено наявність одноосновних карбонових жирних кислот – пальмітинової та стеаринової у коренях рослин як контрольного, так і дослідних варіантів, а також пропіонової (метилоцтової) кислоти (табл. 1). Стеаринова кислота синтезується з пальмітинової за дії ферментів елонгаз, які здійснюють подовження аліфатичного ланцюга жирних кислот. Дані сполуки входять до складу рослинних жирів, які виконують функцію енергетичних депо. Пропіонова кислота – активний метаболіт рослинних організмів. Вона є попередником синтезу основних кислот циклу Кребса (Prudnikova et al., 1994), а саме: піровиноградної (пірувату), оцтової у вигляді ацетил КоА і бурштинової (сукцинату) кислот, використовується як енергетичний субстрат, має антиоксидантні й антимікробні властивості. Пропіонова кислота може також брати участь у синтезі аланіну шляхом амінування акрилоїл-КоА (Prudnikova et al., 1994).

Нами встановлено суттєве підвищення від 4 до 40 разів (табл. 3) рівня цієї кислоти у порівнянні з пальмітиною саме на початкових етапах розвитку сої у варіантах із обробкою насіння фунгіцидами, коли активні діючі речовини хімічних протруйників максимально впливали на молоді рослини та інтродуковані на насіння бульбочкові бактерії.

Попередні дослідження показали значне збільшення вмісту малонової та бурштинової кислот, а також цукрів і багатоатомних спиртів (Levishko et al., 2012, 2014) за інокуляції насіння бульбочковими бактеріями на фоні абіотичного стресору посухи (контрольовані умови поливу: рослини вирощували за нормального (60%) та недостатнього (40%) ПВ водозабезпечення). При цьому також відзначено наявність насичених і ненасичених жирних кислот, серед яких переважали стеаринова й пальмітинова кислоти їхній вміст зростав до максимального під час активного утворення симбіотичних структур на коренях сої.

Отже, у коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями, суттєво змінюється вміст органічних кислот, що може розглядатися як складова адаптації бобових рослин до дії антропогенного стресора (фунгіцидів) і підтримання за таких умов функціонування симбіотичних систем.

Висновки

Протягом ранніх фаз розвитку сої, інокульованої специфічними бульбочковими бактеріями, у коренях рослин відбуваються онтогенетично зумовлені зміни вмісту основних органічних кислот, а саме: пропіонової, малонової, масляної, яблучної, бурштинової, оцтової, шавлевої, пальмітинової, стеаринової, бензойної. Передпосівна обробка насіння сої фунгіцидами Февер і Стандак Топ спричинює підвищення в коренях сої вмісту пропіонової, яблучної, бурштинової, оцтової кислот. Ці сполуки як інтермедіати циклу Кребса та гліоксилатного циклу опосередковано можуть бути залучені до формування захисних реакцій рослин за умов дії фунгіцидів. Особливе значення для таких реакцій на ранніх етапах розвитку сої (від проростків до рослин із трьома справжніми листками) може мати виявлене нами за інокуляції насіння ризобіями та дії фунгіцидів накопичення яблучної, бурштинової та бензойної кислот.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Badri D.V., Vivanco J.M. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 2009, 32(6): 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- 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, 153(4): 1808–1822. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157800>
- Bürgmann H., Meier S., Bunge M., Widmer F., Zeyer J. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ. Microbiology*, 2005, 7(11): 1711–1724. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00818.x>
- Colebatch G., Desbrosses G., Ott T., Krusell L., Montanari O., Kloska S., Kopka J., Udvardi M.K. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 2004, 39(4): 487–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02150.x>
- Couto C., Silva L.R., Valentao P., Velazquez E., Peix A., Andrade P. Effects induced by the nodulation with *Bradyrhizobium japonicum* on *Glycine max* (soybean) metabolism and antioxidant potential. *Food Chemistry*,

- 2011, 127(4): 1487–1495. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.135>
- Hall R.D. Plant metabolomics in a nutshell: potential and future challenges. *Ann. Plant Rev.*, 2011, 43: 1–24.
- Kaschuk G., Kuyper T.W., Leffelaar P.A., Hungria M., Giller K.E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biol. Biochem.*, 2009, 41(6): 1233–1244. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005>
- Kirizii D.A., Stasik O.O., Pryadkina G.A., Shadchina T.M. *Fotosintez: assimilyatsiya SO₂ i mehanizmy ego regulyatsii*. Kiev: Logos, 2014, vol. 2, 480 pp. [Киризи́й Д.А., Стасик О.О., Прядкина Г.А., Шадчина Т.М. *Фотосинтез: ассимиляция СО₂ и механизмы ее регуляции*. Киев: Логос, 2014, т. 2, 480 с.]
- Kolupaev Yu.E., Yastrebo T.O. *Fiziologiya i biokhimiya kulturnykh rasteniy*, 2013, 45(2): 113–126. [Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и ее структурных аналогов. *Физиол. и биохим. культур. раст.*, 2013, 45(2): 113–126].
- Kots S.Ya., Morhun V.V., Palyka V.F., Datsenko V.K., Kruhova E.D., Kyrychenko E.V., Melnikova N.N., Mykhalkov L.M. *Biologicheskaya fiksatsiya azota (Biological fixation of nitrogen)*. Kiev: Logos, 2010, vol. 1, 505 pp. [Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф., Даченко В.К., Кругова Е.Д. Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н., Михалкив Л.М. *Биологическая фиксация азота*. Киев: Логос, 2010, т. 1, 505 с.]
- Levishko A.S., Mamenko P.M. *Visnyk KhNAU*. Ser. Biolohiia, 2016, 1(37): 88–95. [Левішко А.С., Маменко П.М. Особливості метаболічного профілю коренів сої за інокуляції штамми *Bradyrhizobium japonicum* різної активності. *Вісн. Харків. нац. ун-ту*. Сер. Біологія, 2016, 1(37): 88–95]. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vkhnau_biol_2016_1_8
- Levishko A.S., Mamenko P.M., Kots S.Ya. *Fiziologiya rasteniy i genetika*, 2014, 46(1): 19–26. [Левішко А.С., Маменко П.М., Коць С.Я. Метаболоміка рослин: її основи та роль у вивченні рослинно-мікробних взаємодій. *Физиология растений и генетика*, 2014, 46(1): 19–26]. http://nbuv.gov.ua/UJRN/FBKR_2014_45_1_4
- Levishko A.S., Shymanska D.F., Khomenko Yu.O., Petchel L.V., Mamenko P.M. In: *Materialy Vseukrainskoi naukovopraktychnoi konferencii, Ekologichnyi shliakh i maibutnie*. Kyiv; Uman, 2012, pp. 129–131. [Левішко А.С., Шиманська Д.Ф., Хоменко Ю.О., Петечел Л.В., Маменко П.М. Вплив інокуляції на білковий та метаболічний профілі симбіотичних систем сої за різного водозабезпечення. В кн.: *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції "Екологічний шлях у майбутнє"*. Київ; Умань, 2012, с. 129–131].
- Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A.R. Gas chromatography mass spectrometry – based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 387–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>
- Lopez-Bucio J., Nieto-Jacobo M.F., Ramirez-Rodriguez V., Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 2000, 160: 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00347-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00347-2)
- Obata T., Fernie A.R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, 69(19): 3225–3243. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1091-5>
- Pavlyshche A.V., Kirizii D.A., Kots S.Ya. *Plant physiology and genetics (Fiziologiya rasteniy i genetika)*, 2017, 49(3): 237–247. [Павлище А.В., Кіризі́й Д.А., Коць С.Я. Реакція симбіотичних систем сої на дію фунгіцидів за різних способів обробки. *Физиология растений и генетика*, 2017, 49(3): 237–247].
- Provorov N.A., Shtark O.Y., Zhukov V.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. *Developmental genetics of plant-microbe symbioses*. New York: NOVA Science Publ. Inc., 2010, 135 pp.
- Prudnikova T.N., Roslyakov Yu.F. *Izvestiya vuzov. Pischevaya tehnologiya*, 1994, 5–6: 23–27. [Прудникова Т.Н., Росляков Ю.Ф. Пропионовая кислота в метаболизме живых организмов. *Изн. вузов. Пищевая технология*, 1994, 5–6: 23–27].
- Roessner U., Bacic A. Metabolomics in plant research. *Austral. biochemist*, 2009, 40(3): 9–20.
- Senaratna T., Merrit D., Dixon K., Bunn E., Touchell D., Sivasithamparam K.. Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants. *Plant Growth Regul.*, 2003, 39(1): 77–81.
- Thapa G., Dey M., Sahoo L., Panda S.K. An insight into the drought stress induced alterations in plants. *Biol. Plantarum*, 2011, 55(4): 603–613. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0158-8>
- Widhalm J.R., Kuyper T.W., Leffelaar P.A., Hungria M., Giller K.E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biol. Biochem.*, 2009, 41(6): 1233–1244.
- Williams M., Senaratna T., Dixon K., Sivasithamparam K. Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants. *Plant Growth Regulation*, 2003, 39(1): 77–81. <https://doi.org/10.1023/A:1021865029762>
- Yastrebo T.O. *Visnyk Kharkiv. Nats. Univ. Ser. Biolohiia*, 2012, 2(26): 92–97. [Ястреб Т.О. Індукування посухостійкості рослин проса дією екзогенних салицилової і янтарної кислот. *Вісн. Харків. нац. ун-ту*. Сер. Біологія, 2012, 2(26): 92–97].
- Zaimenko N.V., Ivanytska B.O. *Fizioloho-biokhimichni doslidzhennia. Introduktsiia roslyn*, 2013, 3: 108–114. [Заїменко Н.В., Іваницька Б.О. Вплив органічних кислот на ростові процеси рослин різних екоморфотипів. *Фізіолого-біохімічні дослідження. Інтродукція рослин*, 2013, 3: 108–114].

Рекомендує до друку Надійшла 09.08.2018
О.К. Золотарьова

Павлище А.В., Кириченко О.В., Коць С.Я. **Метаболічні зміни вмісту органічних кислот у коренях рослин *Glycine max* (Fabaceae) на ранніх етапах формування симбіозу за дії фунгіцидів.** Укр. бот. журн., 2018, 75(5): 480–488.

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

Метою даної роботи було дослідження методом газорідинної хроматографії та мас-спектрометрії метаболомного профілю органічних кислот у коренях сої на ранніх етапах формування симбіотичних систем (від проростків до фази утворення трьох справжніх листків) за інокуляції насіння *Bradyrhizobium japonicum* 6346 на фоні протруєння фунгіцидами Февер (клас триазолів), Стандак Топ (клас фенілпіразолів + бензимидазолів + стробілуринів) в умовах вегетаційного досліду із піщаною культурою. Встановлено суттєві метаболічні якісні та кількісні зміни вмісту основних органічних кислот, а саме: маленової, масляної, яблучної, бурштинової, пропіонової, оцтової, шавлевої, пальмітинової, стеаринової, бензойної, що пов'язані з онтогенетичним розвитком рослин сої. Фунгіциди Февер і Стандак Топ за протруєння насіння з подальшою інокуляцією ризобіями істотно змінюють рівень накопичення сполук даного класу, значно підвищуючи вміст пропіонової, яблучної, бурштинової, оцтової кислоти. Це зумовлено залученням їх як інтермедіатів циклу Кребса і гліоксилатного циклу та сполук із протекторним ефектом до формування захисних реакцій рослин за умов дії антропогенного стресу. На етапі функціонування симбіотичного апарату сої виявлено бензойну кислоту – речовину із ймовірною протекторною дією. У коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями на фоні обробки фунгіцидами спостерігаються суттєві зміни вмісту органічних кислот, що може розглядатися як складова адаптації бобових рослин до дії антропогенного стресора і підтримання за таких умов функціонування симбіотичних систем.

Ключові слова: *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum* 6346, соя, симбіоз, фунгіциди, метаболом, органічні кислоти

Павлище А.В., Кириченко Е.В., Коць С.Я. **Метаболические изменения содержания органических кислот в корнях растений *Glycine max* (Fabaceae) на ранних этапах формирования симбиоза под влиянием фунгицидов.** Укр. бот. журн., 2018, 75(5): 480–488.

Институт физиологии растений и генетики
НАН Украины
ул. Васильковская, 31/17, Киев 03022, Украина

Целью данной работы было исследование методом газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии метаболомного профиля органических кислот в корнях сои на ранних этапах формирования симбиотических систем (от проростков до фазы развития трех настоящих листьев) при инокуляции семян *Bradyrhizobium japonicum* 6346 на фоне протравливания фунгицидами Февер (класс триазолов), Стандак Топ (классы фенилпиразолов + бензимидазолов + стробилуринов) в условиях вегетационного опыта с песчаной культурой. Установлены существенные метаболические качественные и количественные изменения содержания основных органических кислот, а именно: маленовой, масляной, яблочной, янтарной, пропионовой, уксусной, шавелевой, пальмитиновой, стеариновой, бензойной, связанные с онтогенетическим развитием растений сои. Фунгициды Февер и Стандак Топ при протравливании семян с последующей инокуляцией ризобиями существенно изменяют уровень накопления соединений данного класса, значительно повышая содержание пропионовой, яблочной, янтарной, уксусной кислоты. Это обусловлено вовлечением их как медиаторов цикла Кребса, глиоксилатного цикла и соединений с протекторным эффектом к формированию защитных реакций растений в условиях действия антропогенного стресса. На этапе функционирования симбиотического аппарата сои обнаружена бензойная кислота – вещество, обладающее, вероятно, протекторным эффектом. В корнях сои, инокулированной клубеньковыми бактериями на фоне обработки семян фунгицидами, наблюдаются существенные изменения содержания органических кислот, что можно рассматривать как составляющую адаптации бобовых растений к действию антропогенного стрессора и поддержания при таких условиях функционирования симбиотических систем.

Ключевые слова: *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum* 6346, соя, симбиоз, фунгициды, метаболом, органические кислоты