

УДК 581.1:581.557:579

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО ЛЕКТИНУ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ СИМБІОЗУ *GLYCINE MAX*—*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* В УМОВАХ ПОСУХИ

Л.І. ВЕСЕЛОВСЬКА, Л.М. МИХАЛКІВ, С.Я. КОЦЬ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: veselovskalili@mail.ru*

В умовах вегетаційного дослідження вивчали ефективність застосування лектину насіння сої для підвищення продуктивності симбіозу *Glycine max*—*Bradyrhizobium japonicum* за посухи. Показано, що в разі використання лектину збільшуються нодуляційна активність бактерій, насіннева продуктивність сої, поліпшується фіксація азоту кореневими бульбочками за умов як оптимального, так і недостатнього водозабезпечення.

Ключові слова: соя, *Bradyrhizobium japonicum*, лектин, азотфіксація, нодуляційна активність, посуха.

Відомо, що в адаптації рослинного організму до негативних чинників навколишнього середовища важливу роль відіграють білки [12]. Серед них слід виділити лектини — глікопротеїни неімунної природи, що здатні вибірково й оборотно зв'язувати вуглеводи та глікополімери без порушення їх ковалентної структури [2, 4, 14].

Залежно від локалізації, активності та вмісту лектинів у різних органах рослин їх функції можуть бути різними [8]. Вчені довели, що ці білки беруть участь у таких фізіологічних процесах рослин, як транспортування моно- і полісахаридів, білкових субодиниць, у регуляції поділу й диференціації клітин, регуляції активності різних ферментних комплексів, розпізнаванні та іммобілізації патогенів, еліситорів [3, 13].

Відомо, що лектини відіграють важливу роль у захисті рослин від несприятливих чинників навколишнього середовища. Експериментально доведено, що у відповідь на інфікування патогенами різної природи (бактеріями, грибами, мікоплазмами, вірусами, нематодами) у рослинах підвищується вміст лектинів [2].

Ці білки сприяють формуванню стійкості рослин до несприятливих абіотичних чинників. Під впливом гіпо- та гіпертермії, важких металів, УФ-випромінювання підвищується їх лектинова активність. Встановлено, що за водного, осмотичного та сольового стресів індукується експресія генів лектинів [1, 13, 18].

Лубянова та співавт. [9] виявили, що попередня обробка проростків квасолі фітогемаглютеніном запобігала спричинюваному засоленням гальмуванню мітотичної активності клітин апікальної меристеми кореня, а обробка проростків цим лектином у післястресовий період пришвидшувала відновлення ростових процесів кореня.

Важливу роль відіграють лектини у формуванні симбіозу між бобовими рослинами і бульбочковими бактеріями [7, 11]. У складі рослинних ексудатів вони слугують сигналами для бульбочкових бактерій, що колонізують ризосферу й ризоплану. За допомогою цих білків зв'язуються ризобії, що сприяє агрегації бактерій у ризосфері рослин і як наслідок — утворенню бульбочок, в яких відновлюється азот [15].

Відомо, що екзогенні лектини та лектиновмісні екстракти можна використовувати для регуляції фізіологічних процесів у рослинах, підвищення їхньої продуктивності [6].

З урахуванням значення лектинів у формуванні стійкості рослин до дії низки стресових чинників як компонента захисного механізму важливими видаються дослідження гемаглютинувальних білків за їх екзогенного використання в умовах водного стресу, оскільки недостатнє водозабезпечення призводить до істотного зниження продуктивності сільськогосподарських культур.

Метою роботи було з'ясування впливу лектину насіння сої на формування симбіозу цих рослин із бульбочковими бактеріями, зокрема на активність процесу бульбочкоутворення й азотфіксацію корневих бульбочок, а також урожайність рослин за недостатнього водозабезпечення.

Методика

У роботі використано рослини сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Васильківська (селекція Селекційно-генетичного інституту—Національного центру насіннезнавства і сортовивчення НАН України, Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, Інституту землеробства НААН України) та бульбочкові бактерії *Bradyrhizobium japonicum* 6436 (активний виробничий штамп-стандарт) із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України.

Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на твердому манітно-дріжджовому середовищі протягом 7 діб за 26—28 °С до початку стаціонарної фази росту.

Перед посівом насіння стерилізували 70 %-м розчином етанолу і промивали проточною водою. Одну його частину інкубували з розчином комерційного лектину насіння сої (Львів, «Лектинотест») концентрацією 100 мкг/мл, після чого інокулювали бактеріальною суспензією. Іншу частину насіння інкубували у воді та інокулювали суспензією ризобій, попередньо інкубованою з лектином. Тривалість інкубації насіння або ризобій з лектином становила 20 год, інокуляції ризобіями — 1 год (титр суспензії становив 10^8 кл/мл). Було досліджено два способи використання лектину: обробка насіння та обробка ризобій. Контролем слугував варіант з інокуляцією насіння ризобіями без використання лектину.

Рослини вирощували у 16-кілограмових посудинах Вагнера в піщаній культурі з внесенням поживної суміші Гельригеля з 0,25 норми азоту за природного освітлення, оптимального (60 % ПВ) та недостатнього (30 % ПВ) водозабезпечення. Посуху створювали контрольованим поливом протягом двох тижнів, починаючи з фази трьох справжніх листків, після чого полив відновлювали до 60 % ПВ.

Зразки відбирали у фази трьох справжніх листків, бутонізації, цвітіння та формування бобів. Визначали азотфіксувальну активність (АФА) бульбочок ацетиленовим методом [16] на газовому хроматографі

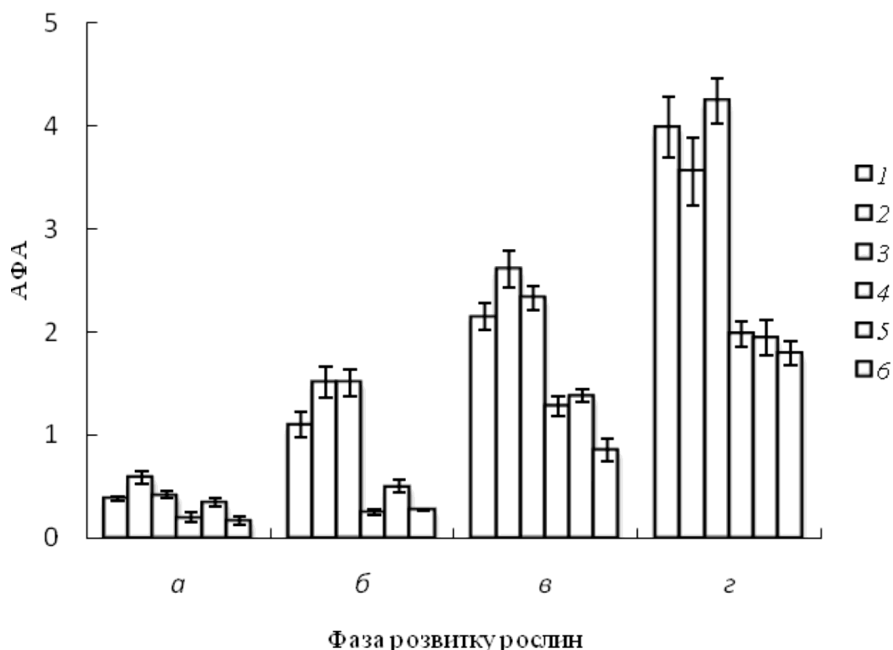
«Agilent GC system 6850» (США), нодуляційну активність ризобій за кількістю бульбочок на коренях рослин, масу сформованих бульбочок, а також урожай насіння рослин сої. Експерименти проводили в десятиразовій повторності. Отримані дані оброблено статистично з використанням програми Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Відомо, що одним із найважливіших показників ефективності функціонування симбіозу бобових рослин із ризобіями є азотфіксувальна активність бульбочок [5]. Результати проведених нами досліджень показали (рисунок), що незалежно від способу обробки застосування лектину приводило до змін азотфіксувальної активності як в умовах оптимального, так і недостатнього водозабезпечення.

Інкубація насіння з лектином із наступною інокуляцією бульбочковими бактеріями виявилась ефективнішою за його обробку ризобіальною суспензією, яку витримували в розчині цього білка. Рівень АФА у фази трьох справжніх листків, бутонізації та цвітіння на фоні оптимального водозабезпечення зростав відповідно на 55, 37 і 21 % порівняно з контролем без лектину. В умовах посухи інкубація насіння з лектином сприяла підвищенню АФА на 70 і 100 % у фази відповідно трьох справжніх листків і бутонізації. Крім того, було виявлено тенденцію до зростання нітрогеназної активності у фазу цвітіння.

У варіантах із використанням ризобіальної суспензії, інкубованої з лектином, ми отримали дещо інші результати. Якщо за 60 % ПВ азотфіксувальна активність збільшувалась на 37 % у фазу бутонізації і



Азотфіксувальна активність (АФА, мкмоль C_2H_4 /(рослину · год)) симбіотичних систем *Glycine max*—*Bradyrhizobium japonicum* 6346 за використання лектину при оптимальному й недостатньому водозабезпеченні у різні фази розвитку рослин (а — три справжні листки; б — бутонізація; в — цвітіння; з — формування бобів)

1 — без лектину, 60 % ПВ (контроль 1); 2 — насіння + лектин, 60 % ПВ; 3 — ризобії + лектин, 60 % ПВ; 4 — без лектину, 30 % ПВ (контроль 2); 5 — насіння + лектин, 30 % ПВ; 6 — ризобії + лектин, 30 % ПВ

ТАБЛИЦЯ 1. Нодуляційна активність (бульбочки, шт/рослину) *Bradyrhizobium japonicum* 6346 за використання лектину насіння сої в умовах різного водозабезпечення

Варіант	Фаза розвитку рослин			
	Три справжні листки	Бутонізація	Цвітіння	Формування бобів
Без лектину, 60 % ПВ (контроль 1)	33,4±4,7	33,7±0,8	41,8±4,2	55,9±2,8
Насіння + лектин, 60 % ПВ	30,9±2,7	30,5±3,9	30,0±2,8*	32,7±2,1*
Ризобії + лектин, 60 % ПВ	38,4±1,8	39,3±9,9	45,7±3,1	66,7±4,9*
Без лектину, 30 % ПВ (контроль 2)	28,2±1,8	24,8±3,4	26,7±1,5	39,2±3,8
Насіння + лектин, 30 % ПВ	42,4±2,6*	44,2±5,0*	46,6±3,5*	45,9±4,0
Ризобії + лектин, 30 % ПВ	38,8±6,9*	45,0±3,1*	38,8±4,9*	35,6±2,4

*Тут і в табл. 2, 3: різниця вірогідна за $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

мала тенденцію до зростання протягом інших фаз розвитку рослин, то в умовах посухи незначне підвищення АФА зафіксовано лише у фазу бутонізації. На інших етапах формування рослинного організму цей показник знижувався.

Аналіз нодуляційної активності ризобій показав (табл. 1), що ефект від використання лектину залежав від способу обробки цим білком та рівня водозабезпечення рослин. Так, якщо за оптимального водозабезпечення інкубація насіння з лектином призводила до зменшення кількості бульбочок, зокрема у фазі бутонізації, цвітіння та формування бобів відповідно на 10, 28 і 42 %, то за недостатнього водозабезпечення цей показник значно зростав — на 17—78 % залежно від фази розвитку рослин.

Інкубація ризобіальної суспензії з лектином сприяла збільшенню кількості бульбочок на рослинах як за оптимального, так і за недостатнього водозабезпечення за винятком варіанта, де рослини вирощували за умови 30 % ПВ (фаза формування бобів). Максимальне збільшення кількості бульбочок відмічено за посухи у фазу бутонізації — на 81 % та за оптимального водозабезпечення у фазу формування бобів — на 19 %.

Встановлено, що лектин насіння сої впливає не лише на кількість, а й на масу кореневих бульбочок (табл. 2). В умовах оптимального водозабезпечення маса бульбочок збільшувалась за обох способів обробки лектином у фазі трьох справжніх листків, бутонізації та цвітіння. Так, за обробки цим білком насіння маса бульбочок зросла на 66, 45 і 16 %, а інкубації ризобіями — на 24, 51 і 13 % порівняно з контролем у відповідні фази розвитку рослин. У посушливих умовах ефективнішою за впливом на масу бульбочок була інкубація насіння з лектином. Ми виявили збільшення маси бульбочок у фазі трьох справжніх листків, цвітіння та формування бобів на 25—50 % порівняно з контролем. У фазу бутонізації цей показник знижувався на 31 %. Обробка лектином бактеріальної суспензії призвела до зменшення маси бульбочок в усі досліджувані фази розвитку рослин окрім фази формування бобів, де цей показник незначно зріс.

ТАБЛИЦА 2. Влияние лектина на массу (с сухой речовини/рослини) корневых бобовочек сои, инокулированной *Vigna fabariformis* жаронисом б34б, в условиях различного водозабезпечення

Вариант	Фаза розвитку рослин				Формування бобів
	Три справжні листки	Бутонізація	Цвітіння		
Без лектину, 60 % ПВ (контроль 1)	0,021±0,001	0,047±0,007	0,099±0,012		0,251±0,036
Насіння + лектин, 60 % ПВ	0,035±0,002*	0,068±0,007*	0,115±0,016		0,236±0,051
Ризобії + лектин, 60 % ПВ	0,026±0,005	0,071±0,010*	0,112±0,009		0,238±0,042*
Без лектину, 30 % ПВ (контроль 2)	0,018±0,004	0,032±0,006	0,054±0,010		0,131±0,020
Насіння + лектин, 30 % ПВ	0,027±0,005*	0,022±0,004*	0,068±0,003*		0,168±0,023*
Ризобії + лектин, 30 % ПВ	0,016±0,003	0,024±0,001*	0,041±0,008		0,139±0,024

ТАБЛИЦЯ 3. Насіннева продуктивність сої (г/рослину), інокульованої *Bradyrhizobium japonicum* 6346, за використання лектину в умовах різного водозабезпечення

Варіант	г/рослину	% відповідного контролю
Без лектину, 60 % ПВ (контроль 1)	4,78±0,23	100
Насіння + лектин, 60 % ПВ	5,31±0,26*	111
Ризобії + лектин, 60 % ПВ	5,47±0,28*	114
Без лектину, 30 % ПВ (контроль 2)	4,17±0,21	100
Насіння + лектин, 30 % ПВ	4,96±0,16*	119
Ризобії + лектин, 30 % ПВ	4,21±0,12	101

Отже, хоча за оптимального водозабезпечення в період від трьох справжніх листків до цвітіння рослин за використання лектину вірогідного збільшення кількості бульбочок не виявлено, активність азотфіксації підвищувалась, особливо у варіанті, де цим білком обробляли насіння. Збільшувалась також маса бульбочок. У результаті за використання лектину сої, а саме при інкубуванні з ним насіння та бактеріальної суспензії, отримано приріст насінневої продуктивності сої на 11–14 % порівняно з контролем (табл. 3).

За недостатнього водозабезпечення у варіантах із використанням лектину нодуляційна активність ризобій зростала у період три справжні листки—цвітіння. При цьому маса бульбочок збільшувалась лише за обробки лектином насіння. Саме рослини цього варіанта в симбіозі з ризобіями найактивніше фіксували молекулярний азот. Очевидно, через цей ефект було отримано істотний приріст насінневої продуктивності — 19 % порівняно з контролем без лектину (18 % — порівняно з варіантом із внесенням лектину в бактеріальну суспензію) (див. табл. 3).

Встановлено [10], що додавання гомологічного лектину в суспензію бульбочкових бактерій позитивно впливало на нодуляційний процес, азотфіксувальну активність бульбочок і продуктивність рослин залежно від концентрації лектину в інокуляційній суспензії та умов вирощування рослин. Це означає, що лектини як сигнальні молекули опосередковано, через бактеріальну клітину, регулюють процес формування симбіотичної системи та активність азотфіксації. Разом з тим за екзогенної обробки насіння сої специфічними лектинами підвищувалась продуктивність рослин [17]. Аналіз структури урожаю показав, що урожай насіння сої підвищувався внаслідок збільшення кількості бобів та насінин на рослині, а також маси насіння на рослину.

Вплив лектину на рослини, виявлений у наших експериментах, за умов недостатнього водозабезпечення може бути пов'язаний як із поліпшенням симбіотичних властивостей бульбочкових бактерій, так і з його впливом на ростові процеси рослин [7].

Є відомості щодо можливості безпосереднього зв'язування рослинних лектинів із фітогормонами, зокрема встановлено здатність аглютиніну зародків пшениці взаємодіяти з природним цитокініном зеатином у системі *in vitro*. Внаслідок взаємодії з гормонами рослинні лектини здатні впливати на гормональний статус рослин, включатись у сигнальну регуляцію їх росту і розвитку [6].

У результаті проведених нами досліджень встановлено можливість зниження негативного впливу посухи на процеси формування і функціонування симбіотичних систем сої з *V. japonicum* за використання екзогенного лектину насіння сої. Отримані дані дають підставу припустити, що застосування лектину сприяє адаптації бобово-ризобіальних симбіотичних систем до посухи і може стати одним із важливих заходів підвищення їх стійкості до недостатнього водозабезпечення.

1. *Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Белоусов А.А. и др.* Активность лектинов клеточных стенок и нитратредуктазы у проростков кукурузы при действии водного дефицита и гипертермии // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — **42**, № 4. — С. 330—338.
2. *Бабоша А.В.* Индуцибельные лектины и устойчивость растений к патогенным организмам и абиотическим стрессам // Биохимия. — 2008. — **73**, № 7. — С. 1007—1022.
3. *Бабоша А.В.* Лектины и проблемы распознавания фитопатогенов растением-хозяином // Журн. общей биологии. — 2008. — **69**, № 5. — С. 379—396.
4. *Волошин Н.А., Григорьева Е.А.* Лектины животного и растительного происхождения: роль в процессах морфогенеза (обзор литературы и собственных исследований) // Журн. АМН України. — 2005. — **1**, № 2. — С. 223—237.
5. *Даценко В.К., Мельник В.М., Коць С.Я., Омельчук С.В.* Фізіологічна взаємодія сої з новими Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // С.-г. мікробіологія: Міжвідомчий темат. наук. зб. — Чернігів, 2008. — Вип. 8. — С. 52—61.
6. *Кириченко О.В.* Біологічна активність екзогенних рослинних лектинів при утворенні та функціонуванні фітобактеріальних асоціацій // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2011. — Вип. 2 (23). — С. 46—59.
7. *Кириченко О.В.* Роль лектинів бобових рослин в активізації симбіотичних властивостей специфічних ризобій при утворенні та функціонуванні симбіозу // С.-г. мікробіологія. — 2009. — Вип. 9. — С. 43—58.
8. *Коць С.Я., Маменко П.М., Маліченко С.М.* Структурні особливості та біологічні функції лектинів бобових // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — **40**, № 2. — С. 111—125.
9. *Лубянова А.Р., Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Шакирова Ф.М.* Ростстимулирующий и защитный эффекты фитогемагглютина на растения фасоли // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2009. — Вип. 2 (17). — С. 40—46.
10. *Маменко П.М.* Лектини бобових і їхня фізіологічна роль у формуванні і функціонуванні симбіозу: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2004. — 21 с.
11. *Мельникова Н.Н., Ковальчук Н.В., Коць С.Я., Мусатенко Л.И.* Влияние лектинов семян сои на формирование и функционирование бобово-ризобияльного симбиоза // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 5. — С. 439—446.
12. *Молодченкова О.О., Адамовська В.Г., Цісельська Л.Й. та ін.* Оцінка генофонду пшениці за рівнем активності лектинів та вмістом абсцизової кислоти в зв'язку з посухо-жаростійкістю // Зб. наук. праць СГІ—НЦНС. — Одеса. — 2010. — Вип. 16 (56). — С. 221—233.
13. *Шакирова Ф.М., Безрукова М.В.* Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журн. общей биологии. — 2007. — **68**, № 2. — С. 109—125.
14. *Sammue B.P.A., Broecaert W.F., Kellens T.S. et al.* Stress-induced accumulation of wheat germ agglutinin and abscisic acid in roots of wheat seedlings // Plant Physiol. — 1989. — **91**. — P. 1432—1435.
15. *Dazzo F.B., Truchet G.L.* Interaction of lectins and their saccharide receptors in *Rhizobium-legume symbiosis* // J. Membrane Biol. — 1983. — **73**. — P. 1—16.
16. *Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C.* The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. — 1968. — **43**. — P. 1185—1207.
17. *Курьченко О.В.* Practice of soybean and wheat lectins use for the plant growing // Problems of Biogeochemistry and Geochemical Ecology. — 2008. — **1**, N 5. — P. 99—105.
18. *Zhang W., Peumans W.J., Barre A. et al.* Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants // Planta. — 2000. — **210**. — P. 970—978.

Отримано 01.04.2013

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ЛЕКТИНА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОЗА
GLYCINE MAX—BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ

Л.И. Веселовская, Л.М. Михалкив, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

В условиях вегетационного опыта изучали эффективность применения лектина семян сои для повышения продуктивности симбиоза *Glycine max—Bradyrhizobium japonicum* при засухе. Показано, что при использовании лектина увеличиваются нодуляционная активность бактерий, семенная продуктивность сои, улучшается фиксация азота корневыми клубеньками в условиях как оптимального, так и недостаточного водообеспечения.

THE INFLUENCE OF EXOGENOUS LECTIN ON THE EFFECTIVITY OF *GLYCINE MAX—BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* SYMBIOSIS UNDER DROUGHT CONDITIONS

L.I. Veselovska, L.M. Mykhalkiv, S.Ya. Kots

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

The effectivity of use of soybean seeds lectin to increase the productivity of *Glycine max—Bradyrhizobium japonicum* symbiosis under drought conditions was studied in pot experiment. It is shown that the application of lectin increased the nodulation activity of bacteria and soybean seed productivity, and improved nitrogen fixation by root nodules in conditions of optimal and insufficient water supply.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, lectin, nitrogen fixation, nodulation activity, drought.