

УДК 581.133.1

## ВПЛИВ ЛЕКТИНУ НА АЗОТФІКСУВАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ТА ВІДНОВЛЕННЯ НІТРАТІВ У РОСЛИНАХ ЛЮЦЕРНИ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ РИЗОБІЯМИ, НА ФОНІ РІЗНОГО ВОДОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

Л.М. МИХАЛКІВ

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

Досліджено вплив екзогенного лектину насіння сої на відновлення нітратів у рослинах, а також азотфіксувальну активність бульбочок люцерни, інокульованої *Sinorhizobium meliloti* 441, за різного водозабезпечення (60 і 40 % ПВ). Виявлено, що в період інтенсивного функціонування симбіотичного апарату істотно знижується нітратредуктазна активність у листках, стеблах і коренях люцерни. При цьому зміни активності відновлення нітратів у стеблах рослин, спричинені дією екзогенного лектину, протилежні змінам процесу азотфіксації. Показано, що за недостатнього водозабезпечення застосування лектину як компонента інокуляційної суспензії сприяє підвищенню азотфіксувальної активності симбіозу, а обробка лектином насіння — нітратредуктазної активності у стеблах і листках рослин. Зроблено висновок, що активування автотрофного чи симбіотрофного типів азотного живлення в симбіотичних системах люцерни, що відбувається на фоні різного водозабезпечення при застосуванні лектину, підтримує оптимальну продуктивність рослин за досліджуваних умов вирощування.

*Ключові слова:* *Medicago sativa*, *Sinorhizobium meliloti*, лектин, відновлення нітратів, азотфіксація, водозабезпечення, продуктивність.

Люцерна як представник родини бобових здатна засвоювати зв'язану, насамперед нітратну, та молекулярну форми азоту в разі формування симбіозу з бульбочковими бактеріями, що зумовлено наявністю відповідних ферментних систем, зокрема нітратредуктази й нітрогенази. Питання взаємодії цих двох ферментів висвітлено в багатьох працях [4, 6, 14], але сьогодні особливого значення набувають дослідження азотно-го живлення бобових рослин і пошук шляхів його оптимізації за дії несприятливих чинників довкілля, передусім за водного стресу [15—17].

Становлення симбіотичних взаємовідносин рослин і мікроорганізмів великою мірою залежить від умов довкілля. При цьому одним із важливих чинників ефективного симбіозу, який запропоновано враховувати при розробці та впровадженні нових підходів до керування продукційним процесом у бобових, є лектини [5]. Крім того, вони — важливий компонент неспецифічної реакції рослин на дію стресових чинників [10], тому актуальним є вивчення ефекту цих білків в умовах, несприятливих для розвитку симбіозу, зокрема, за недостатнього водозабезпечення.

У попередніх дослідженнях ми довели [1, 5], що лектин із насіння сої здатний підвищувати нодуляційну активність ризобій, азотфіксуваль-

ну активність корневих бульбочок, збільшувати продуктивність сої як за оптимального водозабезпечення, так і за посушливих умов. Встановлено [3], що зміни нітратредуктазної активності за дії водного стресу пов'язані з особливостями формування симбіотичних взаємовідносин між рослинами сої та ризобіями, а застосування лектину сумісно з активним штамом бактерій зменшує інгібувальний вплив нестачі вологи на активність нітратредуктази в листках рослин сої.

Метою цієї роботи було вивчення впливу екзогенного лектину насіння сої на активність засвоєння молекулярного азоту та відновлення нітратів у рослинах люцерни, інокульованої *Sinorhizobium meliloti*, за оптимального й недостатнього водозабезпечення.

### Методика

Вегетаційні досліді проводили на базі Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Рослини люцерни посівної (*Medicago sativa* L.) сорту Ярославна вирощували в піщаній культурі на поживному середовищі Гельригеля (0,25 норми азоту) за природного освітлення й оптимального водозабезпечення — 60 % повної вологості (ПВ). Модельну 30-добову посуху створювали, починаючи з фази прихованої бутонізації, шляхом контрольованого поливу рослин (40 % ПВ), після чого його відновлювали до досягнення оптимального рівня водозабезпечення.

Передпосівну інокуляцію насіння проводили упродовж 1 год бульбочковими бактеріями *Sinorhizobium meliloti* штаму 441, отриманими з колекції штамів симбіотичних та асоціативних азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Розчин комерційного лектину сої (Львів, «Лектинотест») концентрацією 100 мкг/мл застосовували для передпосівної обробки насіння люцерни (20 год) із наступною інокуляцією або ж для інкубації білка з інокуляційною суспензією (20 год).

Упродовж вегетації рослин люцерни у фазі стеблуння, бутонізації та цвітіння—формування бобів визначали азотфіксувальну активність бульбочок [11] із використанням хроматографа «Agilent 6850» (США), активність відновлення нітратів [8] у листках, стеблах і коренях рослин, а також підраховували кількість бульбочок на рослинах. Визначення проводили у п'ятиразовій біологічній повторності, кількість бульбочок оцінювали на 30 рослинах із варіанта. Результати досліджень оброблено статистично за загальноприйнятою методикою [2], у таблицях наведено середьарифметичні дані та їх стандартні похибки.

### Результати та обговорення

Дослідженням азотфіксувальної активності симбіотичних систем не виявлено істотної відмінності між варіантами у фазу стеблуння (табл. 1), відзначено лише тенденції до збільшення азотфіксувальної активності бульбочок рослин на фоні обробки насіння лектином і, навпаки, зниження цього показника у разі застосування лектину як компонента інокуляційної суспензії. У фазу бутонізації як за оптимального, так і недостатнього водозабезпечення, в усіх варіантах досліді, де застосовували лектин (незалежно від способу обробки), азотфіксувальна активність зростала. В період цвітіння—формування бобів позитивний ефект від застосування лектину спостерігався лише за обробки ним бактеріальної

ТАБЛИЦЯ 1. Ацетиленвідновлювальна активність (мкмоль  $C_2H_4$ /(рослину · год)) симбіотичних систем люцерна—*S. meliloti* при застосуванні лектину на фоні різного їх водозабезпечення

Варіант	Стеблювання	Бутонізація	Цвітіння— формування бобів
60 % ПВ			
Насіння + <i>S. meliloti</i> , контроль 1	0,26±0,04	3,17±0,52	13,12±2,36
(Насіння + лектин) + <i>S. meliloti</i>	0,35±0,03	14,22±1,18	7,54±0,33
Насіння + ( <i>S. meliloti</i> + лектин)	0,18±0,04	9,32±0,54	21,11±2,77
40 % ПВ			
Насіння + <i>S. meliloti</i> , контроль 2	—	2,31±0,56	1,72±0,39
(Насіння + лектин) + <i>S. meliloti</i>	—	2,61±0,81	1,00±0,14
Насіння + ( <i>S. meliloti</i> + лектин)	—	8,08±0,81	4,43±0,76

культури у варіантах 60 і 40 % ПВ — відповідно в 1,6 і 2,6 рази. Слід зазначити, що за оптимального водозабезпечення в контрольному варіанті, як і за обробки лектином ризобій, пік азотфіксувальної активності виявлено в період цвітіння—формування бобів. За недостатнього водозабезпечення в усіх досліджених варіантах, а також за 60 % ПВ у варіанті з обробкою лектином насіння активність симбіозу в цей час знижувалась порівняно з попередньою фазою.

Очевидно, за оптимального водозабезпечення інтенсивніше функціонування симбіотичного апарату люцерни в період стеблювання—бутонізації на фоні обробки насіння лектином було зумовлене швидшим формуванням симбіотичного апарату (табл. 2), тоді як внесення лектину в бактеріальну суспензію сприяло утворенню більшої кількості бульбочок на коренях люцерни порівняно з контролем у фазу бутонізації. Під

ТАБЛИЦЯ 2. Вплив обробки лектином на формування бульбочок на коренях люцерни, інокульованої *S. meliloti*

Варіант	Стеблювання		Бутонізація		Цвітіння— формування бобів	
	кількість бульбочок, шт/рослину	% грон	кількість бульбочок, шт/рослину	% грон	Кількість бульбочок, шт/рослину	% грон
60 % ПВ						
Насіння + <i>S. meliloti</i> , контроль 1	7,1±0,6	11,3	18,0±1,3	16,7	32,4±1,4	25,9
(Насіння + лектин) + + <i>S. meliloti</i>	11,7±1,5	4,3	59,4±5,6	17,2	22,4±0,9	24,1
Насіння + ( <i>S. meliloti</i> + + лектин)	7,1±0,5	5,6	43,6±4,7	6,42	47,0±4,7	35,3
40 % ПВ						
Насіння + <i>S. meliloti</i> , контроль 2	—		10,6±1,4	0	16,4±1,8	0
(Насіння + лектин) + + <i>S. meliloti</i>	—		32,8±3,3	0,6	11,2±0,9	1,8
Насіння + ( <i>S. meliloti</i> + + лектин)	—		64,0±3,4	2,8	21,0±1,8	23,8

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА

ТАБЛИЦЯ 3. Активність відновлення нітратів (мкг  $NO_2^-/(г \cdot 30 хв)$ ) в органах рослин люцерни за обробки лектином на фоні оптимального водозабезпечення, фаза стеблування

Варіант	Листки	Стебла	Корені
Насіння + <i>S. meliloti</i> , контроль	26,11±0,27	14,77±1,13	3,80±0,26
(Насіння + лектин) + <i>S. meliloti</i>	19,72±1,53	15,58±1,14	0
Насіння + ( <i>S. meliloti</i> + лектин)	13,68±0,14	11,09±1,20	2,81±0,18

час цвітіння—формування бобів кількість бульбочок, сформованих модифікованими білком ризобіями, перевищувала показники і контролю, і варіанта з обробкою насіння лектином. За недостатнього водозабезпечення позитивний ефект лектину на утворення бульбочок виявлено в період бутонізації—формування бобів у варіанті внесення його в інокуляційну суспензію, а за обробки лектином насіння — лише в період бутонізації, що відбилося відповідно й на азотфіксувальній активності симбіотичних систем (див. табл. 1). Слід зазначити, що за 40 % ПВ на фоні використання лектину, особливо при внесенні його в інокуляційну суспензію, збільшувались не лише кількість бульбочок, а й відсоток їх гроноподібної форми (див. табл. 2).

Поряд із симбіотичною азотфіксацією важливим способом забезпечення бобових азотом є його поглинання з ґрунту і зв'язування рослинами. Так, згідно з даними праці [9], у сортових популяціях люцерни (*Medicago varia* Mart.) лише 2—6 % рослин здатні до повноцінного розвитку за використання  $N_2$  як єдиного джерела азоту.

У фазу стеблування виявлено зниження порівняно з контролем нітратредуктазної активності у листках і коренях люцерни на фоні застосування лектину (табл. 3). У стеблах такий ефект спостерігали лише за використання лектину як компонента інокуляційної суспензії.

У період цвітіння—формування бобів (табл. 4) активність відновлення нітратів у всіх органах люцерни знижувалась порівняно з фазою стеблування, що очевидно зумовлено активним функціонуванням симбіотичного апарату (див. табл. 1) і, можливо, частковим вичерпанням запасів мінерального азоту в субстраті вирощування рослин. За оптимального водозабезпечення на фоні використання лектину активність відновлення нітратів у листках рослин знижувалась, особливо значно в разі внесення білка в інокуляційну суспензію, тоді як у стеблах за обробки лектином насіння активність відновлення нітратів зростала, а за вне-

ТАБЛИЦЯ 4. Активність відновлення нітратів (мкг  $NO_2^-/(г \cdot 30 хв)$ ) у листках і стеблах люцерни за різного водозабезпечення та обробки лектином, фаза цвітіння—формування бобів

Варіант	Листки	Стебла
60 % ПВ		
Насіння + <i>S. meliloti</i> , контроль 1	11,11±0,87	8,29±0,86
(Насіння + лектин) + <i>S. meliloti</i>	8,99±0,89	12,28±0,54
Насіння + ( <i>S. meliloti</i> + лектин)	3,66±0,21	6,87±0,46
40 % ПВ		
Насіння + <i>S. meliloti</i> , контроль 2	2,26±0,06	3,55±0,05
(Насіння + лектин) + <i>S. meliloti</i>	5,08±0,49	6,01±0,44
Насіння + ( <i>S. meliloti</i> + лектин)	2,21±0,05	2,83±0,16

сення його в інокуляційну суспензію, навпаки, знижувалась порівняно з контролем. За недостатнього водозабезпечення активність відновлення нітратів у всіх досліджених варіантах знижувалась порівняно з 60 % ПВ. При цьому нітратредуктазна активність у листках люцерни на фоні застосування лектину не відрізнялась від контрольного показника (варіант інкубації ризобій з лектином) або перевищувала контроль (варіант з обробкою лектином насіння). Зміни нітратредуктазної активності в стеблах за використання лектину були аналогічні її змінам за 60 % ПВ. Отже, гальмівний вплив нестачі вологи на відновлення нітратів у листках і стеблах рослин зменшувався лише на фоні обробки лектином насіння.

Слід зауважити, що в період цвітіння—формування бобів зміни активності відновлення нітратів у стеблах рослин, спричинені екзогенним лектином, були протилежні тим, яких зазнала ацетиленвідновлювальна активність (див. табл. 1, 4). Залежність нітратного метаболізму від симбіотичної фіксації азоту — характерна ознака бобових рослин, підкреслена багатьма дослідниками [7, 13, 14]. Водночас виявлено, що нітрогеназа й нітратредуктаза здатні як конкурувати між собою, так і однаково ефективно функціонувати. У наших дослідженнях залежно від дії зовнішніх чинників (лектин чи рівень водозабезпечення) відбувався частковий перехід симбіотичної системи люцерна—ризобії з одного типу живлення азотом на інший. Очевидно, це дало рослинам змогу сформувати оптимальні наземну масу та урожай насіння за умов, що склалися [12]. При цьому за недостатнього водозабезпечення симбіотичні системи у варіантах внесення лектину в інокуляційну суспензію були особливо ефективними. Так, надземна маса рослин у фазу початку цвітіння на фоні інокуляції люцерни модифікованими лектином ризобіями істотно не відрізнялась від показників варіантів з оптимальним водозабезпеченням, а приріст маси насіння порівняно з відповідним контролем становив 32 % [12].

Отже, у результаті проведених досліджень виявлено, що лектин сої інтенсифікує формування симбіотичного апарату люцерни та засвоєння молекулярного азоту бульбочками, при цьому в разі ефективного функціонування азотфіксувальної системи активність відновлення нітратів знижується, що особливо помітно в стеблах рослин. Поєднання автотрофного й симбіотрофного типів азотного живлення за використання лектину насіння сої дало змогу підвищити продуктивність рослин люцерни на фоні як оптимального, так і недостатнього водозабезпечення.

1. Веселовська Л.І., Михалків Л.М., Коць С.Я. Вплив екзогенного лектину на ефективність симбіозу *Glucine max—Bradyrhizobium japonicum* в умовах посухи // Физиология растений и генетика. — 2013. — 45, № 4. — С. 319—326.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
3. Коць С.Я., Веселовська Л.І., Михалків Л.М. Нітратредуктазна активність у листках сої, інокульованої *Bradyrhizobium japonicum*, на фоні різного водозабезпечення та використання лектину // Наук. зап. Тернопіл. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2014. — 60, № 3. — С. 114—117.
4. Коць С.Я., Михалків Л.М., Мельник В.М. та ін. Активність відновлення нітратів та азотфіксація в симбіотичних системах соя— *Bradyrhizobium japonicum* за інокуляції штамми і транспозоновими мутантами на фоні різного забезпечення рослин мінеральним азотом // Зб. наук. праць «Сільськогосподарська мікробіологія: здобутки та перспективи». — Чернігів: Б.в., 2012. — С. 222—228.
5. Коць С.Я., Моргул В.В., Патыка В.Ф. и др. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз. — Киев: Логос, 2011. — Т. 2. — 523 с.

6. Коць С.Я., Старченков Е.П., Ничик М.М. Нитратредуктазная активность люцерны при инокуляции разными штаммами *Rhizobium meliloti* на фоне возрастающих доз минерального азота // Физиология растений. — 1996. — **43**, № 4. — С. 554—560.
7. Львов Н.П., Буриханов Ш.С., Кретович В.Л. Взаимоотношение нитрогеназы и нитратредуктазы в клетках азотфиксаторов // Прикл. биохимия и микробиология. — 1980. — **XVI**, № 6. — С. 805—817.
8. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: Колос, 1972. — 456 с.
9. Сметанин Н.И., Родынюк И.С., Шумный В.К. Популяционный полиморфизм бобовых по уровню симбиотической азотфиксации // Изв. СО АН СССР. — 1985. — Вып. 3. — С. 38.
10. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектина растений // Журн. общей биологии. — 2007. — **68**, № 2. — С. 109—125.
11. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. — 1968. — **43**, N 8. — P. 1185—1207.
12. Kots S.Ya., Mykhalkiv L.M., Mamenko P.M., Volkogon M.V. The study of alfalfa—*Sinorhizobium meliloti* symbiosis productivity under different water conditions and the influence of the legume seed lectin // J. Agr. Sci. and Technol. B 1. — 2011. — N 3. — P. 454—457.
13. Li Z.Z., Gresshoff P.M. Development and biochemical regulation of «constitutive» nitrate reductase activity in leaves of nodulating soybean // J. Exp. Bot. — 1991. — **41**. — P. 1231—1238.
14. Lucinski R., Polcyn W., Ratajczak L. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium-legumes* // Acta Biochimica Polonica. — 2002. — **49**, N 2. — P. 537—546.
15. Padder B.M., Yadav R., Agarwal R.M. Effect of salinity and water stress in mungbean (*Vigna radiate*) L. Wilczek var. Hum-1 // Plant Sci. Feed. — 2012. — **2**, N 9. — P. 130—134.
16. Vasilieva G.G., Mironova N.V., Glyanko A.K. The low above-zero temperature effect in the zone of roots on nitrate reductase activity in pea organs in the process of vegetating // Turk. J. Bot. — 2001. — **25**. — P. 255—260.
17. Yasuo F. Effect of water stress on nitrate assimilation in soybean leaves // Bull. Fag. Agr. Saga University. — 1996. — **80**. — P. 69—70.

Отримано 29.07.2015

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА НА АЗОТФИКСИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРАТОВ В РАСТЕНИЯХ ЛЮЦЕРНЫ, ИНОКУЛИРОВАННОЙ РИЗОБИЯМИ, НА ФОНЕ РАЗНОГО ВОДООБЕСПЕЧЕНИЯ

Л.М. Михалкив

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины,  
Киев

Исследовано влияние экзогенного лектина семян сои на восстановление нитратов в растениях, а также азотфиксирующую активность клубеньков люцерны, инокулированной *Sinorhizobium meliloti* 441, при разном водообеспечении (60 и 40 % ПВ). Выявлено, что в период интенсивного функционирования симбиотического аппарата существенно снижается нитратредуктазная активность в листьях, стеблях и корнях люцерны. При этом изменения активности восстановления нитратов в стеблях растений, обусловленные действием экзогенного лектина, противоположны изменениям процесса азотфиксации. Показано, что при недостаточном водообеспечении применение лектина как компонента инокуляционной суспензии способствует повышению азотфиксирующей активности симбиоза, а обработка лектином семян — нитратредуктазной активности в стеблях и листьях растений. Сделан вывод, что активизация автотрофного или симбиотрофного типов азотного питания в симбиотических системах люцерны, происходящая на фоне разного водообеспечения при применении лектина, поддерживает оптимальную продуктивность растений в исследуемых условиях выращивания.

THE INFLUENCE OF LECTIN ON NITROGEN FIXATION ACTIVITY AND NITRATE REDUCTION IN ALFALFA PLANTS INOCULATED WITH RHIZOBIA UNDER DIFFERENT WATER SUPPLY

*L.M. Mykhalkiv*

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

The influence of exogenous soybean seed lectin on nitrate reduction in plants and nitrogen fixation activity in nodules of alfalfa inoculated by *Sinorhizobium meliloti* 441 under different water supply (60 % and 40 % of total moisture capacity) was investigated. It was found that in period of active functioning of symbiotic apparatus the nitrate reductase activity in leaves, stems and roots of alfalfa decreased significantly. At the same time the changes in activity of nitrate reduction in plant stems caused by exogenous lectin are opposite to changes in nitrogen fixation process. It was shown that under insufficient water supply the application of lectin as a component of inoculation suspension, caused increase of the nitrogen fixing activity of the symbiosis whereas the treatment of seeds with soybean lectin promoted nitrate reductase activity in plant stems and leaves. The conclusion was made that the activation of autotrophic or symbiotrophic types of nitrogen nutrition in symbiotic systems of alfalfa, which takes place under the different water supply and the application of lectin, provides the optimal plant productivity under investigated conditions of plant growing.

*Key words:* *Medicago sativa*, *Sinorhizobium meliloti*, lectin, nitrate reduction, nitrogen fixation, water supply, productivity.