

УДК: 581.1; 581.133.1; 581.557; 631.847.1

## РЕАКЦІЯ СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМ СОЇ РІЗНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ НА ПОСУХУ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЕКЗОГЕННОГО ЛЕКТИНУ ЯК ПРОТЕКТОРА ЇЇ НЕГАТИВНОЇ ДІЇ

Л.І. РИБАЧЕНКО, С.Я. КОЦЬ, В.М. МЕЛЬНИК, О.Р. РИБАЧЕНКО

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

Вивчено реакцію симбіотичних систем сої, створених контрастними за ефективністю штамми й Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* на дію недостатнього водозабезпечення, досліджено можливість застосування екзогенного лектину як протектора негативної дії посухи на симбіотичний апарат сої. Виявлено, що недостатнє водозабезпечення негативно впливає на процеси формування і функціонування симбіотичних систем соя—*B. japonicum* усіх досліджених штамів ризобій та Tn5-мутантів. Встановлено, що застосування штамів *B. japonicum* T21-2 для інокуляції насіння сої забезпечило формування більш ефективних симбіотичних систем за оптимального й недостатнього водозабезпечення рослин порівнянно з інокуляцією ризобіями штамів 646. Окрім цього з'ясовано, що в умовах недостатнього зволоження субстрату симбіотичні системи, створені за участю штамів T21-2, формували меншу кількість, але активніших за азотфіксацією кореневих бульбочок порівняно з іншими дослідженими штамми. Доведено, що застосування екзогенного лектину для обробки насіння сої в концентрації 100 мкг/мл незалежно від рівня водозабезпечення активує діяльність симбіотичного апарату, підвищує активність аскорбат- і гваяколпероксидази у коренях та бульбочках рослин. Такі зміни в системах соя—*B. japonicum* імовірно вказують на їх вищу стресостійкість у несприятливих умовах, зокрема за недостатнього водозабезпечення, і дають підставу розглядати лектин насіння сої як протектор негативного впливу посухи.

*Ключові слова:* *Bradyrhizobium japonicum*, гваяколпероксидаза, аскорбатпероксидаза, азотфіксувальна активність, бобово-ризобіальний симбіоз, екзогенний лектин, соя.

У зв'язку з глобальним потеплінням клімату збільшується розмір площ, на яких рослини зазнають негативної дії нестачі вологи. Недостатнє водозабезпечення є одним із основних лімітуючих чинників навколишнього середовища, що обмежує ріст, розвиток і продуктивність рослинних організмів, у тому числі й бобових культур [1]. Окрім цього, доведено, що дефіцит вологи негативно діє не лише на рослини, а й на ризосферні мікроорганізми, зокрема бульбочкові бактерії [2].

Нестача води може опосередковано впливати на ріст мікроорганізмів, а саме через рослину, внаслідок зменшення кількості коре-

невих ексудатів, що надходять у ризосферу, та впливу на ріст рослин і морфологію кореня, а також безпосередньо на ризобії за участю процесів дифузії та зміни концентрації поживних речовин [3]. За нестачі або надлишку вологи у бульбочкових бактерій порушується респіраторна функція, в результаті чого зменшується їх чисельність в екотопі [4].

Посуха негативно впливає і на процеси формування та функціонування симбіотичного апарату бобових. Селлстед і співавт. [5] довели, що за недостатнього водозабезпечення азотфіксувальна активність (АФА) сої знижується на 26 %. Ступінь пригнічення симбіозу залежить від моменту настання, тривалості та сили дії стресового чинника. Наприклад, легкий водний стрес спричинює зниження кількості кореневих бульбочок, у той час як помірний та сильний стрес зменшує не лише їх кількість, а й розмір [6]. Негативна дія посухи на бульбочки та їх азотфіксувальну активність залежить від фази росту рослин. Так, встановлено, що зниження водозабезпечення в період активного вегетативного росту бобових чинило шкідливіший вплив на процеси формування й функціонування бульбочок, аніж настання посухи у репродуктивний період [7].

Посуха як один із несприятливих чинників навколишнього середовища викликає посилене генерування активних форм кисню (АФК) [1], надлишкова внутрішньоклітинна концентрація яких може призвести до окиснення багатьох клітинних компонентів і, як наслідок, до окиснювального стресу [8]. У результаті порушується механізм кисневого контролю, що важливо для активної азотфіксації, порушуються процеси метаболізму і функціонування бульбочок, що спричинює їх передчасне старіння [9]. Для запобігання окиснювальному стресу і захисту клітин від АФК у рослин вмикається каскад реакцій, що супроводжується активуванням ферментів антиоксидантної системи захисту і низькомолекулярних сполук, які знешкоджують або запобігають формуванню проміжних продуктів відновлення молекулярного кисню [8]. Ферментативні системи каталізують в основному детоксикацію супероксидних аніон-радикалів і пероксидів. Припускають, що важливу роль у відповіді рослин на дію посухи відіграє фермент пероксидаза, підвищення активності якої, ймовірно, пов'язано з умиканням механізмів адаптації до водного стресу [10]. У літературі також доведено залежність активності пероксидази проростків гороху від нодуляційної здатності бульбочкових бактерій на ранніх етапах формування симбіотичного апарату [11]. Відомо, що активність гваяколпероксидази у коренях сої в період формування і початку функціонування симбіозу пов'язана з вірулентністю ризобій [12].

З урахуванням зазначеного вище важливим видається пошук шляхів зм'якшення негативного впливу посухи на симбіотичні системи сої. Перспективними в цьому аспекті є екологічно безпечні біологічно активні речовини природного походження — лектини. Цим білкам відведено важливу роль у низці фізіологічних процесів, що супроводжують симбіотичні взаємовідносини макро- і мікросимбіонта [13]. Разом із флавоноїдами та іншими речовинами вони беруть участь у розпізнаванні партнерами симбіозу один одного [2].

Крім цього, на сьогодні встановлено, що лектини залучаються у велику кількість механізмів захисту рослин. У літературі є дані, що свідчать про участь лектинів у захисті рослинного організму як від біотичних, так і абіотичних стресів [14]. Проте фізіологічні особливості дії лектинів на симбіотичні системи, а також реакція рослинного організму на вплив цих білків вивчені недостатньо.

У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчення реакції симбіотичних систем різної ефективності на дію недостатнього водозабезпечення. Для досягнення мети ми поставили перед собою два завдання: 1) пошук найстійкіших до посухи та найефективніших штамів ризобій; 2) дослідження можливості застосування екзогенного лектину як протектора негативної дії посухи на симбіотичний апарат сої.

### Методика

Об'єктами дослідження були симбіотичні системи, створені за участю рослин сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Васильківська (селекція Селекційно-генетичного інституту—Національного центру насінництва і сортовивчення НААН України, Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ НАН України), Інституту землеробства НААН України) та різних за активністю бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України.

Ризобії вирощували на манітно-дріжджовому агарі (МДА) з наступним інкубуванням у термостаті протягом 8 діб за температури 28 °С. Для приготування інокуляційних суспензій біомасу бактерій змивали з поверхні агаризованого поживного середовища стерильною водою. Водні суспензії бульбочкових бактерій вирівнювали між собою за стандартом каламутності. Тривалість бактеризації насіння ризобіальною суспензією становила 60 хв, інфекційне навантаження —  $10^8$ — $10^9$  кл/мл.

Перед висіванням насіння стерилізували 70 %-м розчином етанолу протягом 15 хв і промивали проточною водою. З метою вивчення реакції симбіотичних систем різної ефективності на дію недостатнього водозабезпечення і пошуку найстійкіших та найефективніших штамів ризобій насіння інокулювали різними за азотфіксувальною й нодуляційною активностями бульбочковими бактеріями: штамми *B. japonicum* 646 (активний, вірулентний) і 604к (неактивний, високівірулентний) та мікроорганізмами, отриманими методом транспозонового мутагенезу з вихідного штаму *B. japonicum* 646 — штамом Т21-2 (активний, вірулентний), Тп5-мутантом 113 (малоактивний, вірулентний).

Для дослідження можливості застосування екзогенного лектину як протектора негативної дії посухи на симбіотичний апарат насіння інкубували в розчині комерційного лектину насіння сої (Львів, «Лектинотест») концентрацією 100 мкг/мл упродовж 20 год, після чого інокулювали бактеріальною суспензією *B. japonicum* 6346 (високоактивний, виробничий штам). Контролем був варіант з інокуляцією насіння ризобіями цього штаму без використання лектину.

Досліди проводили на вегетаційному майданчику ІФРГ НАН України. Сою вирощували по 6 рослин у 16-кілограмових посудинах Вагнера за природних освітлення й температури, оптимального (60 % повної вологоємності (ПВ)) чи недостатнього (30 % ПВ) водозабезпечення, як субстрат використовували промитий річковий пісок. Джерелом мінерального живлення слугувала живильна суміш Гельригеля збіднена на азот — 0,25 норми. Вологість субстрату підтримували контрольованим поливом [15]. Посуху створювали, починаючи з фази двох справжніх листків (для вивчення реакції симбіотичних систем різної ефективності на дію недостатнього водозабезпечення та виявлення найстійкіших і найефективніших штамів ризобій) та з фази трьох справжніх листків (для дослідження можливості застосування екзогенного лектину як протектора негативної дії посухи на симбіотичний апарат сої) протягом двох тижнів, після чого полив відновлювали до 60 % ПВ.

Визначали нодуляційну активність ризобій за кількістю та масою сформованих бульбочок, АФА симбіотичних систем — ацетиленовим методом у чотириразовій повторності [16].

Активність гваяколпероксидази (ГПО) (КФ 1.11.1.7) встановлювали за збільшенням оптичної густини при 470 нм протягом 3 хв у результаті окиснення гваяколу, коефіцієнт екстинкції  $E = 26,6 \text{ 1/(мМ} \cdot \text{см)}$  [17, 18]. Активність ферменту виражали у мікромолях гваяколу за 1 хв на 1 мг білка.

Активність аскорбатпероксидази (АПО) (КФ 1.11.1.11) визначали за зменшенням оптичної густини при 290 нм протягом 3 хв у результаті окиснення аскорбату, коефіцієнт екстинкції  $E = 2,8 \text{ 1/(мМ} \cdot \text{см)}$  [19, 20]. Активність ферменту виражали в одиницях активності (ОА) за 1 хв на 1 мг білка.

Вміст білка у ферментному екстракті визначали за методикою Бредфорда [21]. Активність ферментів і вміст білка вимірювали у триразовій біологічній повторності.

Усі результати обчислено статистично [22] з використанням програми Microsoft Excel. У таблицях і на рисунку наведено середньоарифметичні дані та їх стандартні похибки.

## Результати та обговорення

У результаті досліджень ми виявили, що за оптимальних умов вирощування сої максимальну кількість бульбочок на коренях мали симбіотичні системи, створені за участю штамів 604к та T21-2. Крім цього, встановлено, що у рослин, вирощених за недостатнього поливу, кількість кореневих бульбочок була меншою порівняно з аналогічними варіантами, вирощеними за оптимального водозабезпечення (табл. 1). При цьому зі зростанням тривалості посухи збільшувалась і різниця кількостей бульбочок на коренях сої, що зазнавала стресу, відносно контрольних рослин.

За нодуляційною активністю найчутливішими до стресу виявилися штами *V. japonicum* 604к і T21-2: кількість бульбочок, утворених ними за 30 % ПВ, була меншою порівняно із варіантами з 60 % ПВ (відповідно на 33 і 40 % — 3-тя, на 45 % — 10-та, на 48 і 51 % — 16-та

РЕАКЦИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОИ

ТАБЛИЦЯ 1. Кількість бульбочок (шт/рослину) на коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями *V. жорнісит* за різного водозабезпечення

Варіант	Тривалість посухи, доба		
	3-тя	10-та	16-та
	60 % ПВ		
646	19,0±0,6	27,5±1,2	38,3±1,4
604к	32,3±0,9	80,0±5,5	114,0±5,8
113	20,0±0,6	26,2±1,2	33,3±1,4
T21-2	24,3±0,9	38,2 ± 4,3	48,0±1,5
	30 % ПВ		
646	15,7±0,9	25,2±1,1	27,3±1,4
604к	21,7±0,9	44,0±2,0	60,3±2,6
113	15,0±0,6	23,0±1,1	28,7±0,9
T21-2	14,7±0,3	21,2±0,8	23,0±0,6

доба посухи) (див. табл. 1). Протягом усього періоду досліджень посуха спричинювала формування меншої кількості бульбочок на коренях сої, інокульованої Tn5-мутантом 113, зокрема, на 12–25 % порівнянно з рослинами, вирощеними за оптимального поливу. При цьому слід зауважити, що, незважаючи на дію стресового чинника, кількість бульбочок на коренях рослин наростала протягом усього періоду спостережень в усіх досліджуваних варіантах.

Аналізом маси кореневих бульбочок встановлено, що протягом усього досліджуваного періоду за оптимального водозабезпечення цей показник найбільше зростає після обробки штамми T21-2 і 646 (табл. 2). Крім цього, доведено, що за недостатнього водозабезпечення зменшувалась не лише кількість, а й маса кореневих бульбочок порівняно з рослинами, вирощеними за оптимального поливу (60 % ПВ). Виявлено, що за 30 % ПВ маса бульбочок, сформованих

ТАБЛИЦЯ 2. Динаміка наростання маси бульбочок (г сухої речовини/рослину) на коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями *V. жорнісит* за різного водозабезпечення

Варіант	Тривалість посухи, доба		
	3-тя	10-та	16-та
	60 % ПВ		
646	0,014±0,001	0,023±0,003	0,050±0,007
604к	0,010±0	0,014±0	0,029±0,001
113	0,007±0,001	0,018±0,002	0,051±0,008
T21-2	0,008±0,001	0,042±0,004	0,073±0,005
	30 % ПВ		
646	0,008±0	0,013±0,001	0,032±0,005
604к	0,007±0	0,009±0,001	0,016±0,001
113	0,006±0	0,012±0,001	0,022±0,002
T21-2	0,008±0	0,016±0,002	0,022±0,004

*V. jaronicum* 646, зменшувалася на 43, 44 та 36 % відповідно на 3-тю, 10-ту і 16-ту доби, а сформованих штамом Т21-2 — відповідно на 62 і 70 % на 10-ту і 16-ту доби посухи порівняно з рослинами, культивованими за 60 % ПВ.

Відомо, що на інфікування бобових рослин бульбочковими бактеріями впливає здатність останніх проникати в тканину кореня і там розмножуватись [23]. Ймовірно, посуха пригнічувала цей процес, унаслідок чого кількість і маса бульбочок, сформованих на коренях рослин за недостатнього поливу, зменшувалися порівняно з контрольними варіантами.

Літературні дані та результати наших досліджень (табл. 3) вказують на те, що водний дефіцит негативно впливає на функціонування симбіотичних систем і призводить до зниження їх продуктивності [24]. Доведено, що за 30 % ПВ у варіантах з інокуляцією штамом Т21-2 АФА кореневих бульбочок сої протягом усього досліджуваного періоду зменшувалася на 57–88 % порівняно з рослинами, інокульованими цим штамом, але вирощеними за нормального водозабезпечення (60 % ПВ). За оптимальних умов вирощування цей штам утворював найефективніші симбіотичні системи з усіх досліджених штамів. За бактеризації насіння *V. jaronicum* 646 посуха призводила до зниження АФА на 54–85 % відносно аналогічного варіанта за 60 % ПВ.

Слід зауважити, що за дефіциту вологи АФА бульбочок, сформованих штамом Т21-2, на 10-ту добу посухи була більшою на 26 %, на 16-ту добу — на 71 % порівняно з інокуляцією насіння *V. jaronicum* 646 (див. табл. 3). Проте за кількістю сформованих корневих бульбочок *V. jaronicum* Т21-2 поступався штаму 646 (див. табл. 1). Такі результати підтвердили, що між нодуляційною здатністю та АФА бульбочкових бактерій не завжди існує прямий зв'язок [25]. Отже, встановлено, що штам Т21-2 за посушливих умов формує меншу кількість, але ефективніших корневих бульбочок.

ТАБЛИЦЯ 3. Динаміка загальної азотфіксувальної активності (мкмоль  $C_2H_4$ /(рослину · год)) корневих бульбочок сої за інокуляції бульбочковими бактеріями *V. jaronicum* за різного водозабезпечення

Варіант	Тривалість посухи, доба		
	3-тя	10-та	16-та
60 % ПВ			
646	0,033±0,001	0,041±0,010	0,415±0,093
604к	0	0	0
113	0,004±0	0,030±0,003	0,123±0,025
Т21-2	0,014±0,001	0,202±0,019	0,771±0,095
30 % ПВ			
646	0,005±0	0,019±0,005	0,069±0,014
604к	0	0	0
113	0,001±0	0,006±0,001	0,011±0,001
Т21-2	0,006±0	0,024±0,004	0,118±0,001

РЕАКЦИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОИ

ТАБЛИЦЯ 4. Динаміка активності гваяколпероксидази (мкмоль гваяколу/(мг білка · хв)) у коренях сої, інокульованої бульбочковими бактеріями *V. jarrowii* за різного водозабезпечення

Варіант	Тривалість посухи, доба		
	3-тя	10-та	16-та
60 % ПВ			
646	0,637±0,020	0,290±0,023	0,870±0,043
604к	0,650±0,075	0,867±0,047	0,997±0,026
113	0,450±0,029	0,510±0,104	0,557±0,044
T21-2	0,590±0,092	0,490±0,042	0,940± 0,070
30 % ПВ			
646	1,073±0,046	0,473±0,028	1,600±0,144
604к	1,337±0,032	1,323±0,024	1,293±0,046
113	0,723±0,029	0,717±0,020	1,010±0,030
T21-2	1,150±0,065	0,603±0,033	1,410±0,139

Активність антиоксидантних ферментів є найчутливішим критерієм впливу різних стресових чинників. Відомо, що антиоксиданти знешкоджують АФК і забезпечують комплексний захист від них біополімерів. До того ж це важливий критерій ефективного функціонування симбіотичних систем.

Аналізом активності ГПО встановлено, що як за оптимальних, так і за стресових умов вирощування найвищу активність ферменту в коренях мав варіант рослин із застосуванням штаму 604к (табл. 4). При цьому порівняння активності ГПО у коренях рослин, вирощених в умовах посухи та за оптимальних умов, дало змогу виявити, що в усіх дослідних симбіотичних системах водний дефіцит спричинював істотне підвищення активності цього ферменту протягом усього періоду спостереження. Зокрема, на 3-тю добу посухи цей показник найбільше зростав у коренях рослин, інокульованих штамом 604к (на 105 %), тоді як на 10- й 16-ту доби максимальним підвищенням активності ГПО характеризувався варіант із застосуванням штаму 646 — на 63 і 83 % відносно аналогічних варіантів рослин, вирощених за оптимального водозабезпечення.

На 10-ту добу дії водного дефіциту порівняно з попередньою фазою спостереження виявлено істотне зниження активності ГПО у коренях рослин, інокульованих ефективними штамми 646 і T21-2 (відповідно на 56 і 47 %) (див. табл. 4). Водночас цей показник для сої, бактеризованої малоєфективними штамом 604к і Tn5-мутантом 113, зменшувався не так істотно і знаходився в межах похибки. Проте на 16-ту добу посухи активність ГПО у коренях за інокуляції ефективними штамми 646 і T21-2 підвищувалась порівняно з попередньою фазою дослідження. Ці результати можуть свідчити про вищий рівень адаптації ефективних штамів до дії короткотривалого (до 10 діб) стресового впливу.

Встановлено, що активність ГПО у бульбочках рослин, вирощених за 30 % ПВ, була вищою, ніж у відповідних варіантах із оптимальним водозабезпеченням (табл. 5). Так, на 10-ту добу посухи ак-

ТАБЛИЦЯ 5. Активність гваяколпероксидази (мкмоль гваяколу/(мг білка · хв)) у бульбочках сої, інокульованої *V. jarrowii* за різного водозабезпечення

Варіант	Тривалість посухи, доба	
	10-та	16-та
60 % ПВ		
646	0,296±0,013	0,322±0,015
604к	0,432±0,010	0,409±0,010
113	0,415±0,015	0,470±0,022
T21-2	0,557±0,017	0,595±0,014
30 % ПВ		
646	0,743±0,014	0,832±0,018
604к	0,488±0,014	0,725±0,020
113	0,522±0,015	0,792±0,027
T21-2	0,710±0,015	0,841±0,022

тивність ферменту максимально зростала в симбіотичних системах, утворених ризобіями штаму 646, порівняно з рослинами відповідного варіанта за 60 % ПВ. Найнижчою була різниця у варіанті з використанням штаму 604к — 13 %, тоді як на 16-ту добу посухи найбільше зростання цього показника зафіксовано у рослин, інокульованих штамом 604к (на 77 %) і Tn5-мутантом 113 (на 68 %) відносно аналогічних варіантів, вирощених за оптимальних умов. Припускають, що пероксидаза відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті рослин від стресових чинників, тому підвищення активності ГПО як відповідь рослин на дію посухи є важливим у роботі антиоксидантної системи і, ймовірно, пов'язане з вмиканням механізмів адаптації і формуванням стійкості до водного стресу [10].

В умовах посухи у бульбочках рослин, інокульованих високовірулентним неактивним штамом 604к активність ГПО була нижчою, ніж у варіантах, інокульованих активними штамми 646 і T21-2 (див. табл. 5). У рослин, інокульованих вірулентним малоактивним Tn5-мутантом 113, на 10-ту добу посухи активність ГПО у бульбочках також була нижчою, ніж у бульбочках, утворених за ефективного симбіозу (штами 646 і T21-2). На 16-ту добу цей показник зменшувався відносно тих же симбіотичних систем недостовірно, що може свідчити про відсутність чіткої залежності між активністю ГПО у бульбочках і симбіотичними характеристиками досліджуваних ризобій.

Оскільки водний дефіцит пов'язаний із накопиченням АФК, то стійкість до цього несприятливого чинника залежить від регуляції системи антиоксидантного захисту, в тому числі антиоксидантних ферментів [26]. Збільшення активності ГПО за умов недостатнього водозабезпечення свідчить про активування механізмів, які захищають рослини від окиснювальних пошкоджень, спричинених стресом. Отже, можна припустити, що симбіотичні системи, створені за участю штамів 646 і T21-2, стійкіші до дії посухи.

Відомо, що АПО належить до ключових антиоксидантних ферментів, що входить до аскорбат-глутатіонового шляху, функціонуван-



РЕАКЦИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОИ

ТАБЛИЦЯ 6. Активність аскорбатпероксидази (ОА/(мг білка · хв)) у бульбочках сої, інокульованої *V. japonicum* за різного водозабезпечення

Варіант	Тривалість посухи, доба	
	3-тя	16-та
60 % ПВ		
646	6,26±0,81	6,37±0,30
604к	3,03±0,18	3,53±0,23
113	4,70±0,11	6,10±0,78
T21-2	10,17±0,88	10,63±0,23
30 % ПВ		
646	7,77±1,33	8,07±1,10
604к	6,10±0,32	5,13±0,12
113	7,17±0,87	6,67±0,52
T21-2	12,6±1,22	11,4±1,10

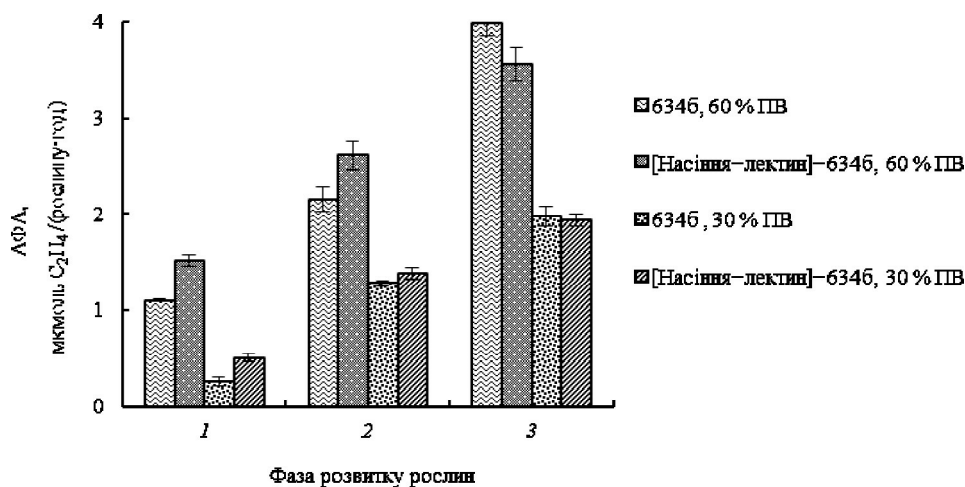
ня якого відіграє істотну роль у детоксикації пероксиду водню [27]. Доведено, що активність АПО у бульбочках сої за інокуляції всіма досліджуваними штамми й транспозоновим мутантом вища в умовах посухи порівняно з рослинами, вирощеними за оптимального водозабезпечення (табл. 6). Окрім цього, виявлено, що на 16-ту добу посухи активність АПО у бульбочках, сформованих *V. japonicum* 604к і Tn5-мутантом 113, була більш як на 50 % нижчою за активність цього ферменту в бульбочках рослин, інокульованих штамми 646 і T21-2 (див. табл. 6). Така тенденція спостерігалась і за оптимального водозабезпечення.

Показано, що активність АПО у бульбочках, сформованих штамом T21-2, вища за водного дефіциту, що поєднується з вищою за таких умов АФА цього штаму порівняно з варіантом, інокульованим *V. japonicum* 646 (див. табл. 6). Опосередковано це може свідчити про більшу толерантність симбіозу, створеного за участю штаму T21-2, до дії стресових чинників, зокрема посухи.

У бульбочках рослин, інокульованих *V. japonicum* 604к, активність АПО на 16-ту добу посухи була нижчою, ніж на 3-тю добу дії стресового чинника, що можливо пов'язано зі зниженням кількості субстрату цього ферменту, оскільки показано, що однією з причин зниження активності АПО може бути спадання рівня ендogenous аскорбату [28].

Отже, простежується залежність між АФА та активністю АПО у корневих бульбочках сої. Так, штам 604к і Tn5-мутант 113 характеризувалися низькою АФА (див. табл. 3), водночас найнижчу активність АПО у бульбочках ми спостерігали у варіантах з обробкою цими бактеріями.

Оскільки фітолектини розглядають як один із основних чинників формування та функціонування ефективного симбіозу важливим видається дослідження їх впливу на процеси функціонування симбіотичних систем та їх адаптації до умов недостатнього водозабезпечення. З огляду на це ми обрали високоактивний виробничий



Азотфіксувальна активність симбіотичних систем *Glycine max*—*B. japonicum* 6346 за використання лектину при оптимальному й недостатньому водозабезпеченні у фази бутонізації (1), цвітіння (2), формування бобів (3)

штам-стандарт 6346 для дослідження впливу цього білка на функціонування симбіотичних систем в умовах стресу.

У результаті проведених досліджень виявлено, що за оптимального водозабезпечення екзогенний лектин спричинював зниження кількості бульбочок в усі досліджувані фази розвитку рослин на 28–42 % порівняно із симбіотичними системами, що не зазнали впливу білка (табл. 7). Слід зауважити, що маса кореневих бульбочок за обробки насіння лектином була вищою на 45 і 16 % у фази бутонізації та цвітіння відносно рослин без застосування лектину (див. табл. 7). Винятком був період формування бобів, коли спостерігалась тенденція до зниження маси бульбочок. Якщо ці дані порівняти з результатами досліджень АФА (рисунок), то можна помітити, що за використання лектину при зменшенні кількості бульбочок АФА симбіотичних систем відносно рослин без застосування лектину зростала. Отже, в разі обробки екзогенним лектином на коренях рослин, вирощених в умовах оптимального водозабезпечення, утворюється менша кількість, проте більших за розміром бульбочок із високою АФА. Згідно з результатами досліджень, посуха негативно вплинула на процеси формування бульбочок. Так, у варіантах без застосування екзогенного лектину кількість і маса бульбочок на коренях рослин, які зазнавали посухи, була значно нижчою, ніж у рослин, вирощених за 60 % ПВ, а саме, починаючи із фази бутонізації кількість бульбочок зменшувалася відносно рослин, вирощених за 60 % ПВ, на 26–36 % в усі досліджувані фази розвитку. Маса бульбочок була меншою на 32 % у фазу бутонізації, у фазу цвітіння і формування бобів різниця становила майже 50 %. На нашу думку, зниження інтенсивності нодуляційних процесів за стресових умов пов'язане з порушенням метаболізму в клітинах ризобій за недостатнього водозабезпечення і, як наслідок, зменшення кількості інфекційних ниток у корневих волосках або повним пригніченням їх утворення [29].

ТАБЛИЦА 7. Кількість (шт./рослину) та маса (г сухої речовини/рослину) бульбочок на коренях сої, інокульованої *V. jarrowii* за використання екзогенного лектину та впливу недостатнього водозабезпечення

Варіант	Фаза розвитку рослини							
	бутонізації		цвітіння		формування бобів			
	кількість бульбочок	маса бульбочок	кількість бульбочок	маса бульбочок	кількість бульбочок	маса бульбочок	кількість бульбочок	маса бульбочок
6345 [Насіння + лектин] + 6346	60 % ПВ							
	33,67±0,88	0,047±0,007	41,80±4,28	0,099±0,012	55,96±2,83	0,251±0,026		
6346 [Насіння + лектин] + 6346	30 % ПВ							
	23,48±3,98	0,068±0,007	30,04±2,85	0,115±0,016	32,72±2,11	0,236±0,021		
6345 [Насіння + лектин] + 6346	60 % ПВ							
	24,80±3,40	0,032±0,006	26,75±1,50	0,054±0,010	39,20±3,84	0,131±0,020		
6346 [Насіння + лектин] + 6346	30 % ПВ							
	44,16±5,01	0,022±0,004	46,60±3,50	0,068±0,003	45,92±4,06	0,168±0,023		

Застосуванням екзогенного лектину зм'якшено негативну дію посухи на процеси нодуляції (див. табл. 7). Так, кількість бульбочок на коренях рослин цього варіанта була більшою, ніж на контрольних варіантах рослин, не оброблених білком і вирощених за 30 % ПВ, починаючи із фази бутонізації, на 78, 74 і 17 %. При цьому у фази бутонізації та цвітіння екзогенний лектин повністю усував негативний вплив посухи на активність бульбочкоутворення, кількість бульбочок у цьому разі була більшою, ніж навіть у симбіотичних системах, сформованих за оптимальних умов. Позитивна дія лектину не обмежувалася впливом лише на кількість бульбочок, за використання білка для обробки насіння наростала і їх маса (див. табл. 7). Цей показник зростав відносно рослин без обробки лектином у фази цвітіння та формування бобів відповідно на 26 і 28 %. Винятком була фаза бутонізації, в яку ми зафіксували зменшення маси бульбочок на 31 % порівняно з рослинами, вирощеними з насіння, не обробленого білком, і вирощеними за 30 % ПВ.

У результаті вивчення АФА корневих бульбочок встановлено (див. рисунок), що застосування лектину приводило до змін цього показника як за оптимального, так і недостатнього водозабезпечення. Так, за обробки насіння лектином і подальшої інокуляції його ризобіями рівень АФА у фази бутонізації та цвітіння на фоні оптимального водозабез-

печення зростав відповідно на 37 і 21 % порівняно з варіантом без застосування лектину.

У фазу формування бобів симбіотичні системи, що зазнали впливу лектину, характеризувались зниженням досліджуваного показника відносно рослин сої без обробки білком на 11 %. Очевидно зниження активності фіксації молекулярного азоту є результатом старіння клітин бактероїдної тканини бульбочок, яке відбувається у пізню фазу розвитку макросимбіонта. АФА симбіотичних систем, які функціонували в умовах недостатнього водозабезпечення, була майже наполовину нижчою порівняно з активністю аналогічних систем за оптимального водозабезпечення. На нашу думку, інгібування симбіотичної азотфіксації може бути наслідком порушення газообміну в бульбочках сої. Лайзел та співавт. [30] виявили, що зниження ацетиленвідновлювальної активності за впливу несприятливих чинників навколишнього середовища пов'язане зі зменшенням у бульбочках концентрації  $O_2$  нижче за оптимальну через різке зниження проникності бар'єру газової дифузії. Згідно з результатами наших досліджень, за умов посухи у фазу бутонізації інкубація насіння з лектином удвічі підвищувала АФА порівняно з рослинами, що не зазнали впливу білка. Крім того, було зафіксовано тенденцію до зростання АФА у цьому варіанті у фазу цвітіння, тоді як у фазу формування бобів ми спостерігали тенденцію до зниження цього показника, що, на нашу думку, пов'язано з перерозподілом продуктів фотосинтезу на процеси формування насіння.

Отже, встановлено, що застосування лектину сої для передпосівної обробки насіння ослаблює негативний вплив посухи на функціонування бобово-ризобіального симбіозу і регулює процеси фіксації молекулярного азоту симбіотичними системами соя—*V. japonicum* 6346.

Як ми уже зазначали, у процесі адаптації до різноманітних несприятливих чинників навколишнього середовища в рослинному організмі активуються компоненти ферментативної системи захисту, що підтверджено результатами й інших досліджень [31]. Зокрема встановлено, що одну з найважливіших ролей у відповіді рослин на дію посухи відіграє фермент пероксидаза, підвищення активності якої, ймовірно, пов'язане з вмиканням механізмів адаптації до водного стресу [27].

У результаті досліджень активності пероксидаз у коренях сої в передстресовий період (фаза двох справжніх листків) виявлено, що за обробки насіння лектином активність АПО знижувалась відносно рослин, вирощених за оптимальних умов, без впливу білка на 47 %, тоді як активність ГПО залишалась на рівні цих рослин (табл. 8). У зв'язку з погодними умовами процес фіксації азоту рослинами розпочинався в пізніші фази розвитку, тому активність АПО у цьому випадку не пов'язана з діяльністю симбіотичного апарату. Очевидно, такі зміни зумовлені безпосередньою дією лектину на рослини.

У фазу цвітіння в сої, вирощеної за умов оптимального водозабезпечення, екзогенний лектин приводив до зростання активності ГПО у коренях рослин порівняно з рослинами, вирощеними за оптимальних умов, без впливу білка на 75 %. При цьому активність АПО не зазнавала істотних змін.

**ТАБЛИЦА 8.** Активность гваяколероксидазы (ГПО, мкмоль гваяколу/(мг белка · хв)) та аскорбатпероксидазы (АПО, ОА/(мг белка · хв)) у корнях сои, инокулированной штамом *V. jarrowii* 6346, за використання екзогенного лектину та недостатнього водозабезпечення

Вариант	Фаза розвитку рослин							
	листок справжніх листків		цвітіння		формування бобів			
	ГПО	АПО	ГПО	АПО	ГПО	АПО	ГПО	АПО
6346 [Насіння + лектин] + 6346	60 % ПВ							
	0,127±0,004	0,189±0,013	0,119±0,008	1,606±0,077	0,344±0,015	3,545±0,205	0,269±0,018	3,343±0,127
6346 [Насіння + лектин] + 6346	30 % ПВ							
	-	-	0,361±0,021	1,112±0,089	0,236±0,013	1,377±0,097	0,264±0,014	1,539±0,107

**ТАБЛИЦА 9.** Активность гваяколероксидазы (ГПО, мкмоль гваяколу/(мг белка · хв)) та аскорбатпероксидазы (АПО, ОА/(мг белка · хв)) у бульбочках сои, инокулированной штамом *V. jarrowii* 6346, за використання екзогенного лектину та недостатнього водозабезпечення

Вариант	Фаза розвитку рослин							
	цвітіння		формування бобів					
	ГПО	АПО	ГПО	АПО	ГПО	АПО	ГПО	АПО
6346 [Насіння + лектин] + 6346	60 % ПВ							
	0,346±0,015	1,758±0,054	0,751±0,051	3,458±0,207	0,301±0,018	1,815±0,067	0,794±0,042	3,615±0,134
6346 [Насіння + лектин] + 6346	30 % ПВ							
	0,423±0,034	1,657±0,089	0,398±0,027	2,268±0,115	0,331±0,029	1,856±0,100	0,425±0,030	2,531±0,156

У фазу формування бобів на фоні інкубації насіння з лектином активність ГПО знижувалась на 22 % порівняно з контрольними рослинами, що, очевидно, є наслідком припинення нодуляційних процесів у рослинах в цей період. У варіанті із застосуванням лектину активність АПО зростала на 15 % відносно симбіотичних систем, що функціонували за оптимальних умов, без впливу білка.

Дослідження активності обох ферментів у коренях рослин, які знавали впливу посухи, показали її зниження порівняно з аналогічними рослинами, вирощеними за оптимального водозабезпечення. Можливо такий ефект зумовлений зниженням у цих рослин АФА.

На фоні застосування лектину у фазу цвітіння активність ГПО під час стресу зростала відносно рослин, вирощених за недостатнього водозабезпечення без впливу білка на 13 %. Що стосується АПО, то її активність була нижчою в усіх варіантах порівняно з рослинами, вирощеними за оптимального водозабезпечення. До того ж за обробки лектином активність АПО знижувалась відносно тих самих контрольних рослин на 18 %.

У постстресовий період (фаза формування бобів) обробка насіння лектином сприяла підвищенню активності обох ферментів на 12 % порівняно з рослинами, вирощеними за недостатнього водозабезпечення без впливу лектину. Можливо, таке зростання активності обох ферментів є захисною реакцією коренів від продуктів старіння і розкладання бульбочок [32], які може ініціювати посуха. Так, на рослинах сої продемонстровано, що старіння бульбочок супроводжується окиснювальними процесами [33].

Дослідження активності пероксидаз у бульбочках, сформованих на коренях сої, показало, що у фазу цвітіння незалежно від рівня водозабезпечення у варіанті із застосуванням лектину активність ГПО знижувалась відносно відповідних варіантів без застосування білка (див. табл. 9). Так, за 60 % ПВ у бульбочках рослин, вирощених із насіння, попередньо проінкубованого з лектином, активність ГПО була нижчою на 13 % порівняно з рослинами, вирощеними за оптимального водозабезпечення, без дії лектину. В умовах посухи у цьому ж варіанті активність ГПО знижувалась відносно рослин, що не зазнали впливу лектину, але вирощувались у стресових умовах, на 22 %. Активність АПО істотно не змінювалась, зокрема в умовах оптимального водозабезпечення за обробки цим білком насіння активність АПО була на рівні з рослинами, вирощеними за оптимального водозабезпечення без впливу лектину. У кореневих бульбочках рослин, вирощених за посушливих умов, зафіксовано підвищення активності АПО у варіанті з обробкою насіння білком на 12 % порівняно з рослинами, вирощеними за недостатнього водозабезпечення без впливу лектину.

У фазу формування бобів ми спостерігали зростання активності пероксидаз в усіх досліджуваних варіантах, що може бути наслідком старіння бульбочок. За оптимального водозабезпечення обробка лектином насіння не призводила до істотних змін активності обох досліджуваних ферментів відносно рослин, вирощених з необробленого насіння. В умовах посухи виявлено тенденцію до зростання активності АПО за інкубації насіння з лектином.

Отже, в результаті досліджень ми виявили, що недостатнє водозабезпечення (30 % ПВ) негативно впливає на процеси формування і функціонування симбіотичних систем соя—*V. japonicum* усіх досліджених штамів ризобій та їх Tn5-мутантів. Посуха пригнічувала ріст корневих бульбочок, знижувала АфА симбіотичного апарату, змінювала активності аскорбат- і гваяколпероксидази у коренях та бульбочках рослин сої. При цьому встановлено, що в разі застосування *V. japonicum* T21-2 для інокуляції насіння сої формувались високоефективні симбіотичні системи за оптимального й недостатнього водозабезпечення рослин порівняно з інокуляцією ризобіями штаму 646. Окрім цього, з'ясовано, що в умовах недостатнього зволоження субстрату симбіотичні системи, створені за участю штаму T21-2, формували меншу кількість, проте активніших за азотфіксацією корневих бульбочок порівняно з іншими дослідженими штамми.

Виявлено, що використання екзогенного лектину для обробки насіння сої незалежно від рівня водозабезпечення активує діяльність симбіотичного апарату, підвищує активність аскорбат- і гваяколпероксидази у коренях та бульбочках рослин. Такі зміни у системах соя—*V. japonicum*, ймовірно, вказують на вищу стресостійкість цих систем до несприятливих умов, зокрема до недостатнього водозабезпечення, і дають підставу розглядати лектин насіння сої за передпосівної обробки в концентрації 100 мкг/мл як протектор негативного впливу посухи.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Marino D., Frendo P., Ladrera R., Zabalza A., Puppo A., Arrese-Igor C., González E.M. Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? *Plant Physiol.* 2008. **143**. P. 1968—1974. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.106.097139>
2. Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф., Маличенко С.М., Маменко П.Н., Киризий Д.А., Михалкив Л.М., Береговенко С.К., Мельникова Н.Н. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобияльный симбиоз: В 4 т. Т. 2. Киев: Логос, 2011. 523 с.
3. Спайк Г., Кондорози А., Хукас П. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями/Перевод под ред. И.А. Тихановича, Н.А. Проворова. Санкт-Петербург. 2002. 567 с.
4. Крутило Д.В. Бульбочкові бактерії — гетеротрофний та симбіотрофний способи життя. *С.-г. мікробіологія*. Міжвід. темат. наук. зб. Чернігів, 2008. Вип. 7. С. 147—161.
5. Sellstedt A., Staahl L., Mattsson M., Jonsson K., Hoegberg P. Can the <sup>15</sup>N dilution technique be used to study N<sub>2</sub> fixation in tropical tree symbioses as affected by water deficit? *J. Exp. Bot.* 1993. **44**. P. 1749—1755.
6. Williams P.M., De Mallorca M.S. Effect of osmotically induced leaf moisture stress on nodulation and nitrogenase activity of *Glycine max* L. *Plant Soil.* 1984. **80**. P. 267—283.
7. Pena-Cabriales J.J., Castellanos J.Z. Effect of water stress on N<sub>2</sub> fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil.* 1993. **152**. P. 151—155.
8. Глянько А.К., Васильева Г.Г. Активные формы кислорода и азота при бобово-ризобияльном симбиозе. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2010. **46**, № 1. С. 21—28.
9. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. **55**. P. 373—399. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
10. Esfahani M.N., Mostajeran A. Rhizobial strain involvement in symbiosis efficiency of chickpea-rhizobia under drought stress: plant growth, nitrogen fixation and antioxidant enzyme activities. *Acta Physiol. Plant.* 2010. **33**. P. 1075—1083. doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0635-2>
11. Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. Содержание пероксида водорода и активность каталазы при инокуляции клубеньковыми бактериями проростков го-

- роха с разной способностью к нодуляции. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2005. **41**, № 6. С. 621–625.
12. Дрозденко Г.М., Маменко П.М., Коць С.Я. Активність гваякол- і аскорбатпероксидази та білковий склад коренів сої у період формування і на початку функціонування симбіотичних систем *Glucine max*—*Bradyrhizobium japonicum*. *Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту*. Сер. Біологія. 2013. Вип. 1. С. 18–26.
  13. Мельникова Н.Н., Ковальчук Н.В., Коць С.Я., Мусатенко Л.И. Влияние лектинов семян сои на формирование и функционирование бобово-ризобиального симбиоза. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2009. **41**, № 5. С. 439–446.
  14. Лубянова А.Р., Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Шакирова Ф.М. Ростстимулирующий и защитный эффекты фитогемагглютина на растения фасоли. *Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту*. Сер. Біологія. 2009. Вип. 2 (17). С. 40–46.
  15. Петербургский А.В. Практикум по агрономической химии. Москва: Колос, 1963. 592 с.
  16. 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.
  17. Esfahani M.N., Mostajeran A. Rhizobial strain involvement in symbiosis efficiency of chickpea-rhizobia under drought stress: plant growth, nitrogen fixation and antioxidant enzyme activity. *Acta Physiol. Plant.* 2011. **33**. P. 1075–1083.
  18. Egley G.H., Paul R.N., Vaughn R.C., Duke S.O. Role of peroxidase in the development of water impermeable seed coats in *Sida sprinosa* L. *Planta*. 1983. **157**, N 1. P. 224–232. doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0635-2>
  19. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонова Н.Н. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие. Казань: Изд-во Казанского (Приволжского) федерального ун-та, 2011. 61 с.
  20. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. **22**. P. 867–880. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
  21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. **72**. P. 248–254. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
  22. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
  23. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. Санкт-Петербург: Наука, 1998. 194 с.
  24. Zahran H.H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. **63**. P. 968–989.
  25. Василюк В.М., Маменко П.М., Береговенко С.К. Дослідження симбіотичних властивостей Tn5-мутантів бульбочкових бактерій сої. *С.-г. мікробіологія*. Міжвід. темат. наук. зб. Чернівці, 2007. Вип. 6. С. 39–50.
  26. Семенова Е.А. Влияние водного стресса на активность и электрофоретические спектры антиоксидантных ферментов в семенах сои. *Современные наукоемкие технологии: Биологические науки*. 2012. № 7. С. 33–35.
  27. Iturbe-Ormaetxe I., Matamoros M.A., Rubio M.C., Dalton D.A., Becana M. The antioxidants of legume nodule mitochondria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2001. **14**, N 10. P. 1189–1196.
  28. Николаева М.К., Маевская С.Н., Шугаев А.Г., Бухов Н.Г. Влияние засухи на содержание хлорофилла и активность ферментов антиоксидантной системы в листьях трех сортов пшеницы, различающихся по продуктивности. *Физиология растений*. 2010. **57**, № 1. С. 94–102.
  29. Worrall V.S., Roughley R.J. The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii* Dang. *J. Exp. Bot.* 1976. **27**. P. 1233–1241.
  30. Layzell D.B., Del Castillo L.D., Hunt S., Kuzma M., Cauwenbergh O. van, Oresnik I. The regulation of oxygen and its role in regulation nodule metabolism. New Horizons in Nitrogen Fixation: Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation (Cancun, Mexico, 6–12 December, 1992). Cancun, 1992. P. 393–398.
  31. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессов. Киев: Основа, 2010. 352 с.



32. Puppo A., Rigaud J., Job D. Role of superoxide anion in leghemoglobin autoxidation. *Plant Sci. Lett.* 1981. 22. P. 353–360.
33. Серова А.Т., Цыганов В.Е. Старение симбиотического клубенька у бобовых растений; молекулярно-генетические и клеточные аспекты. *С.-х. биология.* 2014. № 5. С. 3–15.

Отримано 27.09.2018

REFERENCES

1. Marino, D., Frendo, P., Ladrera, R. Zabalza, A., Puppo, A., Argese-Igor, C. & González, E.M. (2008). Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? *Plant Physiol*, 143, pp. 1968-1974. doi: [https://doi: 10.1104/pp. 106.097139](https://doi.org/10.1104/pp.106.097139)
2. Kots, S.Ya., Morgun, V.V., Patyka, V.P., Malichenko, S.M., Mamenko, P.M., Kiriziy, D.A., Mykhalkiv, L.M., Beregovenko, S.K. & Melnykova, N.M. (2011). Biological nitrogen fixation: legume-rhizobium symbiosis. Vol. 2. Kyiv: Logos [in Russian].
3. Spayk, G., Kondoroshi, A. & Hukas, P. (2002). The Rhizobiaceae. Molecular biology of plant-associated bacteria. Sankt-Peterburg [in Russian].
4. Krutylo, D.V. (2008). Nodule bacteria — heterotrophic and symbiotrophic ways of life. *Silskohospodarska mikrobiologhiia*. Chernihiv, iss. 7, pp. 147-161 [in Ukrainian].
5. Sellstedt, A., Staahl, L., Mattsson, M., Jonsson, K. & Hoegberg, P. (1993). Can the <sup>15</sup>N dilution technique be used to study N<sub>2</sub> fixation in tropical tree symbioses as affected by water deficit? *J. Exp Bot.*, 44, pp. 1749-1755.
6. Williams, P.M. & De Mallorca, M.S. (1984) Effect of osmotically induced leaf moisture stress on nodulation and nitrogenase activity of *Glycine max* L. *Plant Soil*, 80, pp. 267-283.
7. Pena-Cabriaes, J.J. & Castellanos, J.Z. (1993). Effect of water stress on N<sub>2</sub> fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 152, pp. 151-155.
8. Glyanko, A.K. & Vasileva, G.G. (2010). Active forms of oxygen and nitrogen in legume-rhizobial symbiosis. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiol.*, 46(1), pp. 21-28 [in Russian].
9. Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, pp. 373-399. doi: [https://doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701)
10. Esfahani, M.N. & Mostajeran, A. (2010). Rhizobial strain involvement in symbiosis efficiency of chickpea-rhizobia under drought stress: plant growth, nitrogen fixation and antioxidant enzyme activities. *Acta Physiol. Plant*, 33, pp. 1075-1083. doi: [https://doi: 10.1007/s11738-010-0635-2](https://doi.org/10.1007/s11738-010-0635-2)
11. Vasileva, G.G., Glyanko, A.K. & Mironova, N.V. (2005). The content of hydrogen peroxide and the activity of catalase during inoculation with nodule bacteria of pea seedlings with different capacity for nodulation. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiol.*, 41(5), pp. 21-28 [in Russian].
12. Drozdenko, H.M., Mamenko, P.M., Kots, S.Ya. (2013). The activity of guaiacol and ascorbate peroxidase and protein composition of soybean roots during the formation and the early functioning of symbiotic system *Glycine max*—*Bradyrhizobium japonicum*. *Visn. Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho un-tu: Serii Biologhiia*, iss. 1, pp. 18-26 [in Ukrainian].
13. Melnikova, N.N., Kovalchuk, N.V., Kots, S.Ya. & Musatenko, L.I. (2009). Influence of soybean seeds lectins on the legume-rhizobium symbiosis formation and functioning. *Fiziologiya i biokhimiya kulturnykh rasteniy*, 41(5), pp. 439-446 [in Ukrainian].
14. Lubyanova, A.R., Bezrukova, M.V., Fathutdinova, R.A. & Shakirova, F.M. (2009). Growthstimulating and protective effects of phytohemagglutinin on plants of common bean. *Visn. Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho un-tu: Serii Biologhiia*, iss. 2(17), pp. 40-46 [in Russian].
15. Peterburgskiy, A.V. (1963). Workshop on Agronomic Chemistry. Moskva: Kolos [in Russian].
16. Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation: laboratoty and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43, No. 8, pp. 1185-1207.
17. Esfahani, M.N. & Mostajeran, A. (2011). Rhizobial strain involvement in symbiosis efficiency of chickpea-rhizobia under drought stress: plant growth, nitrogen fixation and antioxidant enzyme activity. *Acta Physiol. Plant*, 33, pp. 1075-1083.

18. Egley, G.H., Paul, R.N., Vaughn, R.C. & Duke, S.O. (1983). Role of peroxidase in the development of water impermeable seed coats in *Sida sprinosa* L. *Planta*, 157, No. 1, pp. 224-232. doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0635-2>
19. Sibgatullina, G.V., Haertdinova, L.R., Gumerova, E.A., Akulov, A.N., Kostyukova, Yu.A. & Nikonova, N.I. (2011). Methods for determining the redox status of cultured plant cells: a teaching aid. Kazan: Kazanskiy Federalnyiy universitet [in Russian].
20. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, pp. 867-880. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
21. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising: the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, pp. 248-254. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
22. Dosphehov, B.A. (1985). Methodology of field experiment. Moskva: Agropromizdat [in Russian].
23. Tihonovich, I.A. & Provorov, N.A. (1998). Genetics of symbiotic nitrogen fixation with the basics of selection. Sankt-Peterburg: Nauka [in Russian].
24. Zahran, H.H. (1999). Rhizobium legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, pp. 968-989.
25. Vasilyuk, V.M., Mamenko, P.M. & Beregovenko, S.K. (2007). Investigation of the symbiotic properties of Tn5-mutants of soybean nodule bacteria. *Silskohospodarska mikrobiologiya*, 6, pp. 39-50 [in Ukrainian].
26. Semenova, E.A. (2012). Effect of water stress on the activity and electrophoretic spectra of antioxidant enzymes in soybean seeds. *Sovremennyye naukoemkie tehnologii: Biologicheskie nauki*, 7, pp. 33-35 [in Russian].
27. Iturbe-Ormaetxea, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Dalton, D.A. & Becana, M. (2001). The antioxidants of legume nodule mitochondria. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14, No. 10, pp. 1189-1196.
28. Nikolaeva, M.K., Maevskaya, S.N., Shugaev, A.G. & Buhov, N.G. (2010). The effect of drought on the chlorophyll content and enzyme activity of the antioxidant system in the leaves of three wheat varieties, differing in productivity. *Fiziologiya rasteniy*, 57(1), pp. 94-102 [in Russian].
29. Worrall, V.S. & Roughley, R.J. (1976). The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii* Dang. *J. Exp Bot.*, 27, pp. 1233-1241.
30. Layzell, D.B., Del Castillo, L.D., Hunt, S., Kuzma, M., Cauwenberghe, O. van, & Oresnik, I. (1992). The regulation of oxygen and its role in regulation nodule metabolism. *New Horizons in Nitrogen Fixation: Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation (Cancun, Mexico, 6-12 December, 1992)* (pp. 393-398). Cancun.
31. Kolupaev, Yu.E. & Karpets, Yu.V. (2010). Formation of adaptive reactions of plants to the action of abiotic stresses. Kyiv: Osnova [in Russian].
32. Puppo, A., Rigaud, J. & Job, D. (1981). Role of superoxide anion in leghemoglobin autoxidation. *Plant Sci. Lett.*, 22, pp. 353-360.
33. Cerova, A.T. & Tsyganov, V.E. (2014). Aging of the symbiotic nodule in legumes; molecular-genetic and cellular aspects. *Celskohosyastvenna biologiya*, 5, pp. 3-15 [in Russian].

Received 27.09.2018

РЕАКЦИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОИ РАЗЛИЧНОЙ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ НА ЗАСУХУ И ПРИМЕНЕНИЕ ЭКЗОГЕННОГО  
ЛЕКТИНА КАК ПРОТЕКТОРА ЕЕ НЕГАТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Л.И. Рыбаченко, С.Я. Коць, В.М. Мельник, А.Р. Рыбаченко

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины,  
Киев

Изучена реакция симбиотических систем сои, созданных контрастными по эффектив-  
тивности штаммами и Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* на действие недоста-

точного водообеспечения, исследована возможность применения экзогенного лектина как протектора негативного воздействия засухи на симбиотический аппарат сои. Обнаружено, что недостаточное водообеспечение негативно влияет на процессы формирования и функционирования симбиотических систем соя—*B. japonicum* всех исследованных штаммов ризобий и Tn5-мутантов. Установлено, что применение штамма *B. japonicum* T21-2 для инокуляции семян сои обеспечило формирование более эффективных симбиотических систем в условиях оптимального и недостаточного водообеспечения растений по сравнению с инокуляцией ризобиями штамма 646. Кроме этого выяснено, что в условиях недостаточного увлажнения субстрата симбиотические системы, созданные с участием штамма T21-2, формировали меньшее количество, но более активных клубеньков по сравнению с другими исследованными штаммами. Доказано, что применение экзогенного лектина для обработки семян сои в концентрации 100 мкг/мл независимо от уровня водообеспечения активизирует деятельность симбиотического аппарата, повышает активность аскорбат- и гваяколпероксидазы в корнях и клубеньках растений. Такие изменения в системах соя—*B. japonicum* вероятно указывают на их более высокую стрессоустойчивость в неблагоприятных условиях, в частности при недостаточном водообеспечении, и дают основание рассматривать лектин семян сои как протектор негативного влияния засухи.

*Ключевые слова:* *Bradyrhizobium japonicum*, гваяколпероксидаза, аскорбатпероксидаза, азотфиксирующая активность, бобово-ризобийный симбиоз, экзогенный лектин, соя.

RESPONSE OF DIFFERENT EFFICIENCY SYMBIOTIC SYSTEMS ON DROUGHT AND USE OF THE EXOGENOUS LECTIN AS AN PROTECTOR OF ITS NEGATIVE ACTION

*L.I. Rybachenko, S.Ya. Kots, V.M. Melnik, O.R. Rybachenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine  
e-mail: veselika@ukr.net

The response of symbiotic soybean systems created by contrasting strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* on the effect of insufficient water supply was studied, and the possibility of using exogenous lectin as a drought protector on a symbiotic apparatus of soybean plant has been researched. It was revealed that insufficient water supply had a negative influence on the processes of formation and functioning of soybean—*B. japonicum* symbiotic systems for all investigated rhizobium strains and Tn5-mutants. It was found that the use of *B. japonicum* T21-2 strain for inoculation of soybean seeds allowed to form more effective symbiotic systems under optimal and insufficient water supply of plants compared with inoculation by rhizobia of strain 646. In addition, it was found that under conditions of insufficient moisture of the substrate symbiotic systems created with the T21-2 strain formed a smaller number, however, more active nitrogen-fixing root nodules than other studied strains. It is shown that the use of exogenous lectin at concentration of 100 µg/ml for treatment of soybean seeds activates the functioning of the symbiotic apparatus, increases the activity of ascorbate and guaiacol peroxidase in the roots and nodules of plants irrespective of the level of water supply. Such changes in soybean—*B. japonicum* systems are likely to indicate their higher stress tolerance to adverse conditions, in particular to insufficient water supply, and allow to considerate of soybean seeds lectin as protector of the adverse effects of drought.

*Key words:* *Bradyrhizobium japonicum*, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, nitrogen-fixing activity, legume-rhizobial symbiosis, exogenous lectin, soybean.