

<https://doi.org/10.15407/frg2019.05.436>

УДК: 581.142:579.22:633.34

ВПЛИВ ПОЛІСАХАРИДІВ РИЗОБІЙ НА ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ СОЇ ТА БУЛЬБОЧКОУТВОРЕННЯ ПРИ ФОРМУВАННІ СОЄВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ

Н.М. МЕЛЬНИКОВА

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

У лабораторних і вегетаційних умовах досліджували енергію проростання насіння сої, масу проростків, а також особливості бульбочкоутворення при формуванні соєво-ризобіального симбіозу в період вегетативного росту рослин за дії екзополісахаридів (ЕПС) бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 634б (мікросимбіонт сої), *Bradyrhizobium japonicum* 631 (мікросимбіонт сої і люпину) та *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 359а, 400 (штами ризобій люпину, які відрізняються за активністю). Показано, що ЕПС мікроорганізмів істотно не стимулювали проростання насіння та розвиток проростків сої. Тенденція до збільшення енергії проростання і маси сухої речовини проростків спостерігалась за використання препарату ЕПС400 концентрацією 0,100 мг/мл, що може бути зумовлено властивостями цього біополімеру. Зменшення кількості екстрацелюлярних полісахаридів в інкубаційному розчині до 0,025 мг/мл викликало недостовірне зниження маси проростків сої. Досліджувані ЕПС за попередньої обробки ними проростків сої з наступною інокуляцією *B. japonicum* 634б стимулювали бульбочкоутворення на коренях рослин у фазу двох трійчастих листків (V2). У фазу трьох трійчастих листків (V3), а також за інокуляції інкубованих з ЕПС проростків бактеріями *B. japonicum* 631 спостерігалась тенденція до збільшення кількості кореневих бульбочок. Препарати ЕПС634 і ЕПС631 у поєднанні зі штамми-інокулянтами відповідно *B. japonicum* 634б і *B. japonicum* 631 сприяли більш ранньому початку формування симбіотичного апарату в рослин сої. В ході досліджень не виявлено чіткої залежності характеру впливу (специфічності) екзополісахаридів ризобій на проростання насіння, розвиток проростків і формування соєво-ризобіального симбіозу від симбіотичних властивостей штамів, з яких вони були виділені. Однак певна відмінність у спрямованості дії вуглеводних біополімерів спостерігалась.

Ключові слова: бульбочкові бактерії, соя, екзополісахариди, проростання насіння, симбіоз, бульбочкоутворення.

Функціонування бобово-ризобіальних симбіотичних систем як потужного джерела біологічного азоту є важливим елементом забезпечення стабільності біо- та агроценозів, оскільки цей мінеральний елемент має вкрай важливе значення для підтримання життєдіяль-

ності живих організмів та підвищення їх продуктивності. Симбіоз між бобовими рослинами і бульбочковими бактеріями формується в кілька етапів за участю низки речовин із різною функціональною активністю [1], серед яких особливе місце посідають полісахариди ризобій, зокрема екзополісахариди, які можуть бути задіяні на ранніх етапах взаємодії між партнерами симбіозу, пов'язаними з розвитком інфекційної нитки, формуванням пулу ризобій у ній і регуляцією захисної відповіді макросимбіонта [2, 3].

За будовою екзополісахариди — це полімери, які складаються з моносахаридів і можуть містити у своєму складі групи неуглеводної природи [2, 3]. Значна кількість мікроорганізмів здатна синтезувати ЕПС та секретувати їх у навколишнє середовище і тим самим сприяти акумуляції біомолекул поза мікробною клітиною. ЕПС різних видів мікроорганізмів, зокрема бульбочкових бактерій, відрізняються між собою за складом, будовою та ефекторною дією [2, 4].

Експериментальні дані вказують на важливу роль у розвитку симбіозу ЕПС ризобій (*Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum*) — мікросимбіонтів бобових рослин, які формують недетерміновані кореневі бульбочки [5—7]. Досліджені меншою мірою вуглеводні біополімери бульбочкових бактерій (*Sinorhizobium fredii*, *Mezorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*) — мікросимбіонтів рослин, для яких характерний детермінований тип бульбочкоутворення, також можуть бути задіяні у низці процесів, що супроводжують нодуляцію [8, 9]. Водночас питання, пов'язане із функціонуванням екстрацелюлярних полісахаридів бульбочкових бактерій при формуванні бобово-ризобіального симбіозу, залишається остаточно не з'ясованим.

Окрім участі у розвитку симбіотичних азотфіксувальних систем ЕПС відіграють важливу роль у формуванні біоплівки та адгезії мікроорганізмів [2, 3, 7, 10], у захисті мікробних клітин за дії стресових чинників і забезпеченні їх поживними речовинами [2, 3, 10], у структуруванні ґрунту [11] та ін. На особливу увагу заслуговує здатність мікробних екзополісахаридів, зокрема ЕПС бульбочкових бактерій, утримувати вологу, чим вони сприяють зростанню біологічної активності ґрунту прикореневої зони, активізації ростових процесів у рослин, що особливо важливо за недостатнього водозабезпечення [12, 13]. Бобові культури, наприклад соя, потребують достатньої кількості вологи, особливо в період проростання насіння і розвитку проростків [14]. Зазначені вище властивості ЕПС мікроорганізмів зумовлюють необхідність поглибленого вивчення цих біомолекул з метою їх широкого використання у різних галузях виробництва.

Метою роботи було з'ясування особливостей проростання насіння сої та бульбочкоутворення протягом ранніх етапів розвитку симбіотичних взаємовідносин між рослинами сої і *B. japonicum* за дії ЕПС гомологічних і гетерологічних ризобій.

Методика

У роботі використано штами бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* 634б і *Bradyrhizobium japonicum* 631 (зберігаються у Всеросійській колекції непатогенних мікроорганізмів сільськогоспо-

дарського призначення ДНУ Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології РАСН (С.-Петербург, Росія) та насіння сої *Glycine max* (L.) Merr. сорту Київська-27 спільної селекції Селекційно-генетичного інституту—Національного центру насіннезнавства та сортовивчення НААН України та Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Ліофільно висушені препарати екзополісахаридів бульбочкових бактерій (табл. 1) люб'язно надала кандидат біологічних наук С.М. Маліченко.

Бульбочкові бактерії вирощували на агаризованому манітно-дріжджовому середовищі до початку стаціонарної фази росту за температури 28 °С. Для приготування інокуляційних суспензій бактеріальні культури змивали фізіологічним розчином і суспендували. У дослідях використовували інокулюми ризобій із титром 10⁸ мікробних клітин в 1 мл, який встановлювали за допомогою калібрувальної кривої. Оптичну густина бактеріальних суспензій визначали на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО, ССРС) за довжини хвилі 590 нм.

Досліджували вплив ЕПС бульбочкових бактерій на проростання насіння сої у чашках Петрі. Насіння сої стерилізували 70 %-м етанолом, промивали водою, обробляли протягом 4 год розчинами екзополісахаридів ризобій з концентраціями 0,025 і 0,100 мг/мл, пророщували на змоченому фільтрувальному папері у темряві протягом 7 діб за температури 20—22 °С. Оцінювали енергію проростання насіння, а також масу сухої речовини проростків. У контрольному варіанті ЕПС не використовували. Було виконано два експерименти з чотириразовою повторністю.

Моделльні досліди проводили у вегетаційному будиночку в керамічних посудинах в умовах піщаної культури з додаванням поживної суміші Гельригеля [17], збідненої на азот (0,2 норми). Насіння стерилізували 15 %-м розчином перексиду водню, після чого його ретельно промивали водою і пророщували. Для вивчення впливу полісахаридів ризобій на формування бобово-ризобіального симбіозу тридобові проростки сої обробляли протягом 4 год препаратами ЕПС, які містили 0,025 мг/мл вуглеводного полімеру. Після цього проростки відмивали від полісахариду, інокулювали бактеріальними суспензіями і висаджували. Рослини контрольного варіанта не обробляли ЕПС. Бульбочкоутворення на коренях сої визначали у фази примордіальних листків (CV), двох трійчастих (V2) і трьох трійчастих листків (V3). Було проведено два досліди з чотириразовою повторністю.

Експериментальні дані оброблено статистично з використанням пакета програм Microsoft Excel. Достовірність відмінностей між варі-

ТАБЛИЦЯ 1. Штами бульбочкових бактерій та препарати екзополісахаридів, використані у дослідях

Препарат ЕПС	Штам бульбочкових бактерій	Рослина-хазяїн	Симбіотичні властивості бактерій
ЕПС634	<i>B. japonicum</i> 6346	Соя	Активний, вірулентний [15]
ЕПС631	<i>B. japonicum</i> 631	Соя, люпин	Активний, вірулентний [15]
ЕПС359	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>) 359a	Люпин	Активний, вірулентний [15]
ЕПС400	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>) 400	Люпин	Неактивний, вірулентний [16]

антами оцінювали за t -критерієм Стьюдента за $p \leq 0,05$. На рисунках і в табл. 2 наведено середньоарифметичні значення та похибки середньоарифметичного.

Результати та обговорення

Низкою досліджень показано, що ЕПС мікроорганізмів мають значний потенціал поліпшення росту і розвитку рослин протягом онтогенезу [10, 18, 19]. Так, за використання культуральної рідини азотобактера, яка містила велику кількість екзополісахариду левану, для обробки насіння пшениці було відзначено збільшення водовбирної здатності насіння та енергії проростання [18]. ЕПС бульбочкових бактерій гороху різних штамів стимулювали ризогенез у рослини-хазяїна [19]. Експериментальні дані, отримані в ході виконання цієї роботи, показали (табл. 2, рис. 1), що обробка насіння сої ЕПС гомологічних і гетерологічних ризобій у досліджуваних концентраціях (0,025 і 0,100 мг/мл) істотно не стимулювала проростання насіння сої сорту Київська-27 та розвиток проростків. Однак було помічено тенденцію до збільшення енергії проростання насіння і маси проростків (див. табл. 2) у разі його інкубування з препаратом ЕПС400 у концентрації 0,100 мг/мл, продуцентом якого є неактивний штам — облигатний симбіонт люпину (див. табл. 1). ЕПС штаму *V. japonicum* 631 (формує бульбочки з рослинами сої і люпину) в зазначеній вище кількості також позитивно впливав на розвиток проростків (див. табл. 2). Зниження концентрації ЕПС до 0,025 мг/мл не впливало на проростання насіння сої, але дещо сповільнювало ростові процеси у проростках, про що свідчить недостовірне зменшення їх маси, особливо за використання препарату ЕПС634, який був виділений з культури бульбочкових бактерій сої *V. japonicum* 634б (див. рис. 1). Отже, можна припустити, що в разі збільшення кількості ЕПС ризобій сої і люпину в інкубаційному розчині стимулювальний вплив вуглеводних полімерів на проростання насіння і формування проростків буде більш вираженим. Відмінність досліджуваних ЕПС щодо ефекторної дії може бути пов'язана з будовою цих біомолекул, яка визначає їх властивості.

Вивчення впливу ЕПС ризобій сої і люпину на бульбочкоутворення при формуванні соєво-ризобіального симбіозу показало, що лише ЕПС штамів бактерій, які використовували для інокуляції, стимулювали нодуляційний процес (рис. 2). При цьому всі проаналізовані рослини мали кореневі бульбочки вже у фазу примордіальних

ТАБЛИЦЯ 2. Вплив екзополісахаридів бульбочкових бактерій сої і люпину в концентрації 0,100 мг/мл на енергію проростання насіння та масу проростків сої

Варіант обробки	Енергія проростання насіння, %	Маса сухої речовини проростка, мг
Контроль	62,4±6,7	19,9±1,8
ЕПС634	62,9±2,8	19,8±0,6
ЕПС631	70,6±6,4	23,3±1,5
ЕПС359	72,1±8,1	21,4±2,1
ЕПС400	78,1±5,8	24,2±2,1

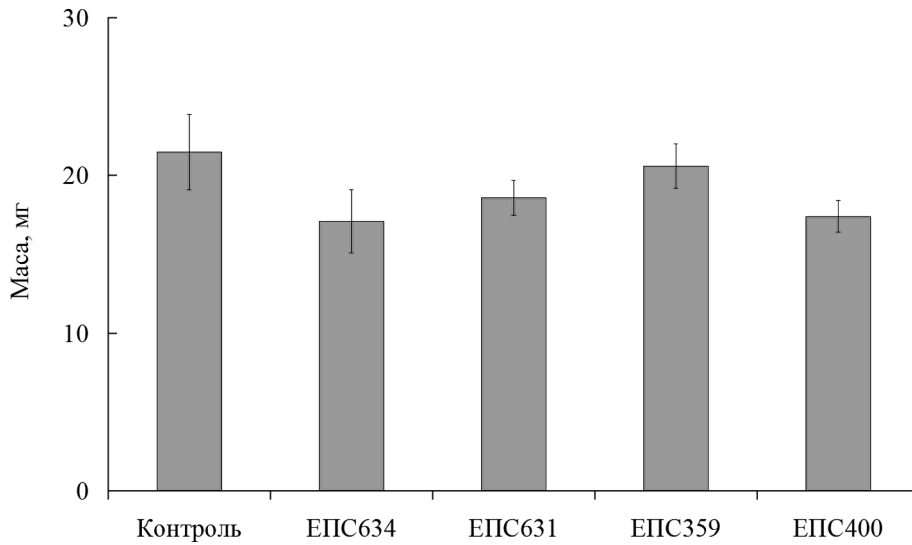


Рис. 1. Маса сухої речовини проростків сої за обробки насіння екзополісахаридами ризобій сої та люпину в концентрації 0,025 мг/мл

листіків. Водночас за попередньої обробки проростків сої екзополісахаридами інших ризобій на ранніх етапах розвитку симбіозу бульбочкоутворення порівняно з контролем істотно не активізувалось (див. рис. 2). У цих варіантах показник нодуляції досягав 100 % лише у фазу двох трійчастих листків.

Досліджувані ЕПС істотно не впливали на загальну кількість кореневих бульбочок, сформованих ризобіями у фази примордіальних листків і трьох трійчастих листків у разі інокуляції сої *B. japonicum*

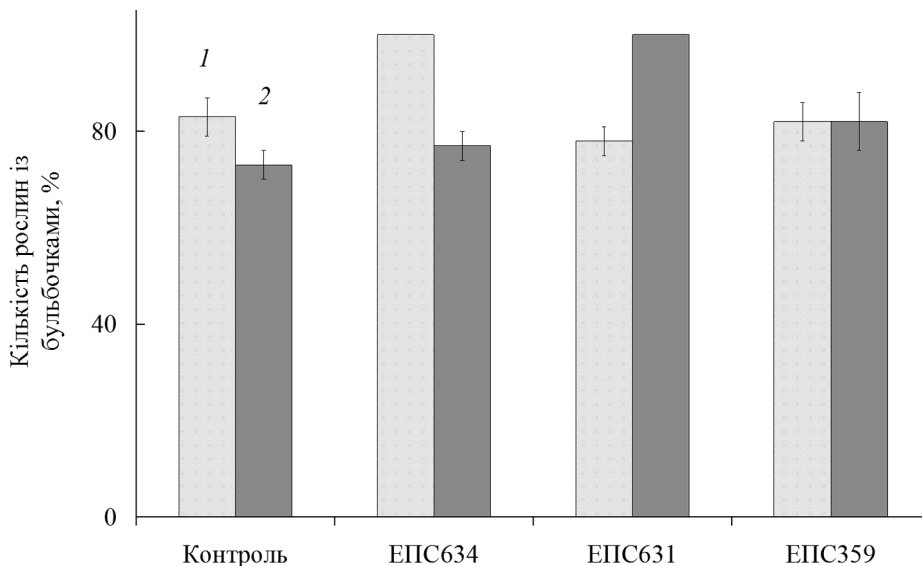


Рис. 2. Активність бульбочкоутворення за обробки проростків сої екзополісахаридами гомологічних і гетерологічного штамів ризобій:

1 — інокуляція рослин бульбочковими бактеріями *B. japonicum* 634б; 2 — інокуляція рослин бульбочковими бактеріями *B. japonicum* 631

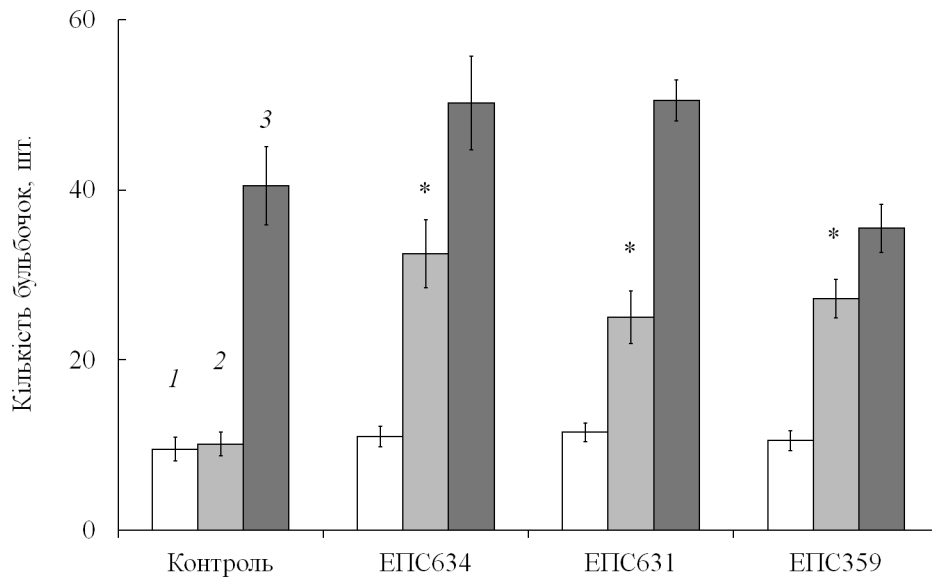


Рис. 3. Формування бульбочок бактеріями *B. japonicum* 6346 на коренях сої за дії екзополісахаридів гомологічних і гетерологічного штамів ризобій. Тут і на рис. 4:

1 — фаза примордіальних листків (CV); 2 — фаза двох трійчастих листків (V2); 3 — фаза трьох трійчастих листків (V3); *статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

6346 (рис. 3). Водночас у фазу трьох трійчастих листків спостерігалась тенденція до зростання цього показника за використання екстрацелюлярних полісахаридів ризобій сої. У фазу двох трійчастих листків ЕПС поліпшували нодуляційну активність, на що вказує достовірне збільшення числа бульбочок на коренях рослини-хазяїна (див. рис. 3). Найбільш вираженою була стимулювальна дія гомологічного до штаму-інокулянта екзополісахариду.

Попередня обробка проростків сої ЕПС із наступною інокуляцією їх *B. japonicum* 631 (мікросимбіонт сої і люпину) не чинила значного стимулювального впливу на нодуляцію порівняно з контролем протягом усього періоду вирощування рослин (рис. 4). Проте у варіантах із використанням ЕПС ризобій люпину було помічено тенденцію до збільшення кількості бульбочок у фазу двох трійчастих листків.

Слід зазначити, що екстрацелюлярні полімери бульбочкових бактерій сої і люпину впливали також на динаміку формування симбіотичного апарату на коренях сої (див. рис. 3, 4).

Отже, у ході проведення досліджень не виявлено істотної стимулювальної дії ЕПС ризобій сої і люпину на проростання насіння та розвиток проростків сої, хоча за використання ЕПС штаму *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 400 у концентрації 0,100 мг/мл спостерігали тенденцію до збільшення енергії проростання і маси сухої речовини проростків, що може бути зумовлено властивостями цього біополімеру. Важливо зазначити, що зменшення кількості екстрацелюлярних полісахаридів в інкубаційній суспензії до 0,025 мг/мл призвело до незначного сповільнення розвитку проростків сої, на що вказує недовірне зменшення їх маси. Екзополісахариди ризобій сої і люпину за попередньої обробки ними проростків сої з наступною іноку-

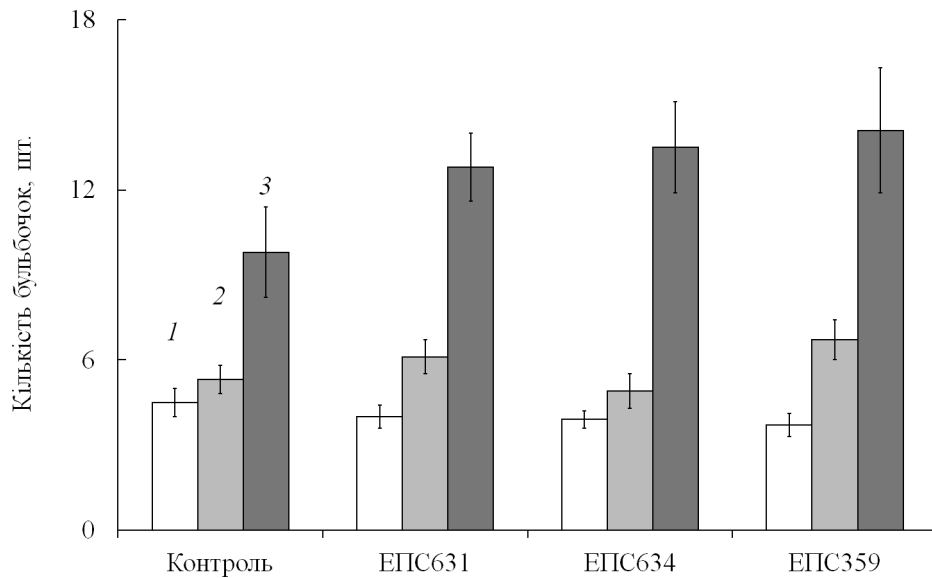


Рис. 4. Вплив екзополісахаридів ризобій сої і люпину на бульбочкоутворення протягом вегетативних фаз розвитку сої за інокуляції *V. japonicum* 631

ляцією загалом позитивно впливали на формування симбіотичного апарату у фазу двох трійчастих листків. Однак збільшення кількості бульбочок на коренях рослини-хазяїна було достовірним лише за інокуляції бактеріями *V. japonicum* 634б. Препарати ЕПС634 і ЕПС631 у поєднанні зі штамми-інокулянтами відповідно *V. japonicum* 634б і *V. japonicum* 631 сприяли більш ранньому формуванню симбіотичного апарату на коренях сої.

Результати досліджень, наведені в таблицях і на рисунках, не вказують на чітку кореляційну залежність між природою і походженням ЕПС ризобій та характером їх дії на проростання насіння, розвиток проростків, формування симбіотичних азотфіксувальних систем соя—*V. japonicum* із детермінованим типом розвитку бульбочок. Проте незначні відмінності щодо впливу екстрацелюлярних полімерів мікросимбіонтів сої і люпину (див. табл. 2, рис. 2—4) підтвердили важливість їхніх структурних особливостей. Відсутність вираженої специфічності щодо симбіозу за використання ЕПС бульбочкових бактерій показано низкою досліджень на прикладі різних бобово-ризобіальних асоціацій [19, 20] з недетермінованими бульбочками. Водночас у цих та інших працях наголошено, що ЕПС відіграють важливу роль у формуванні симбіотичних систем, їх застосування може поліпшувати нодуляційний процес, азотфіксувальну здатність нітрогеназного комплексу бульбочок і розвиток бобових рослин, а структура цих біополімерів може мати певне значення у розвитку симбіозу [6, 19—22]. Одним із чинників, які можуть визначати спрямованість впливу ЕПС, є концентрація екстрацелюлярних біополімерів [18, 22]. Це припущення підтверджується експериментальними даними, наведеними в табл. 2 та на рис. 1, і вказує на необхідність урахування концентраційної залежності дії полісахаридів при створенні за їх участю препаратів для практичного застосування.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Brewin N.J. Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991. 7. P. 191—226.
2. Ghosh P.K., Maiti T.K. Structure of extracellular exopolysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume-bacteria symbiosis:-a review. *Achievements in the Life Sciences.* 2016. 10. P. 136—143.
3. Marczak M., Mazur A., Koper P., Zebracki K., Skorupska A. Synthesis of rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. *Genes.* 2017. 8. P. 360.
4. Mort A.J., Bauer W.D. Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*. *Plant Physiol.* 1980. 66, N 1. P. 158—163.
5. Leigh J., Singner E.R., Walker G.C. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. 82. P. 6231—6235.
6. van Workum W.A.T., van Slageren S., van Brussel A.A.N., Kijne, J.W. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1998. 11, N 12. P. 1233—1241.
7. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Kryl J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial. Cell Factories.* 2006. 5. P. 7.
8. Kelly S.J., Muszynski A., Kawaharada Y., Hubber A.M., Sullivan J.T., Sandal N., Carlson R.W., Stougaard J., Ronson C.W. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mezorhizobium*—*Lotus* symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2013. 26. P. 319—329.
9. Lopez-Baena F.J., Ruiz-Sainz J.E., Rodriguez-Carvajal M.A., Vinardell J.M. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016. 17. P. 755.
10. Qurashi A.W., Sabri A.N. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz. J. Microbiol.* 2012. 43, N 3. P. 1183—1191.
11. Alami Y., Achouak W., Marol C., Heulin T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. 66, N 8. P. 3393—3398.
12. Naseem H., Bano A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *J. Plant Interact.* 2014. 9, N 1. P. 689—701.
13. Vanderlinde E.M., Harrison J.J., Muszynski A., Carlson R.W., Turner R.J., Yost C.K. Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2010. 71, N 3. P. 327—340.
14. Лещенко А.К., Сичкарь В.И., Михайлов В.Г., Марьюшкин В.Ф. Соя. Киев: Наук. думка, 1987. 256 с.
15. Коць С.Я., Береговенко С.К., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов. Киев: Наук. думка, 2007. 315 с.
16. Мельникова Н.М., Маліченко С.М., Даценко В.К. Визначення конкурентоспроможності бульбочкових бактерій люпину при інокуляції активним і неактивним штамами. *Фізіологія і біохімія культ. растений.* 1998. 30, № 1. С. 49—53.
17. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наук. думка, 1964. 388 с.
18. Фомкина М.М., Ибрагимова С.А. Использование микробных полисахаридов для обработки семян. *Огарев-online, Биологические науки.* 2016. 24. URL: <http://journal.mrsu.ru/arts/ispolzovanie-mikrobnux-polisaxaridov-dlya-obrabotki-semyan>
19. Косенко Л.В., Хайлова Г.Ф., Карелов В.Е. Влияние экзополисахаридов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на нодуляцию и ризогенез растений гороха. *Физиология и биохимия культ. растений.* 2001. 33, № 4. С. 347—354.
20. Laus M.C., van Brussel A.A., Kijne J.W. Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005. 18. P. 1123—1129.

21. Rodrigues A.C., Vendruscolo C.T., da Silveira Moreira A., Santana M.V.S, de Paula Oliveira J.P., Bonifacio A., Figueiredo M.A.D.V.B. Rhizobium tropici exopolysaccharides as carriers improve the symbiosis of cowpea-Bradyrhizobium-Paenibacillus. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2015. **9**. P. 2037–2050.
22. Skorupska A., Derylo M., Lorkiewicz Z. Role of noncarbohydrate substitutions of Rhizobium exopolysaccharide in nodulation process. *Arch. Microbiol.* 1985. **143**, N 3. P. 307–331.

Отримано 09.09.2019

REFERENCES

1. Brewin, N.J. (1991). Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, pp. 191-226. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.07.110191.001203>
2. Ghosh, P.K. & Maiti, T.K. (2016). Structure of extracellular exopolysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume-bacteria symbiosis: a review. *Achievements in the Life Sciences*, 10, pp. 136-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.als.2016.11.003>
3. Marczak, M., Mazur, A., Koper, P., Zebracki, K. & Skorupska, A. (2017). Synthesis of rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. *Genes*, 8(12), p. 360. <https://doi.org/10.3390/genes8120360>
4. Mort, A.J. & Bauer, W.D. (1980). Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of Rhizobium japonicum. *Plant Physiol.*, 66, No. 1, pp. 158-163. <https://doi.org/10.1104/pp.66.1.158>
5. Leigh, J., Singner, E.R. & Walker, G.C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of Rhizobium meliloti that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, pp. 6231-6235. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.18.6231>
6. van Workum, W.A.T., van Slageren, S., van Brussel, A.A.N. & Kijne, J.W. (1998). Role of exopolysaccharides of Rhizobium leguminosarum bv. viciae as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of Vicia sativa. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 11, No. 12, pp. 1233-1241.
7. Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A. & Kryl, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial. Cell Factories*, 5, p.7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-7>
8. Kelly, S.J., Muszynski, A., Kawaharada, Y., Hubber, A.M., Sullivan, J.T., Sandal, N., Carlson, R.W., Stougaard, J. & Ronson, C.W. (2013). Conditional requirement for exopolysaccharide in the Mezorhizobium-Lotus symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 26, pp. 319-329. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0227-R>
9. Lopez-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Rodriguez-Carvajal, M.A. & Vinardell, J.M. (2016). Bacterial molecular signals in the Sinorhizobium fredii-soybean symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 755 p. <https://doi.org/10.3390/ijms17050755>
10. Qurashi, A.W. & Sabri, A.N. (2012). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz. J. Microbiol.*, 43, No. 3, pp. 1183-1191. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000300046>
11. Alami, Y., Achouak, W., Marol, C. & Heulin, T. (2000). Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing Rhizobium sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, No. 8, pp. 3393-3398. <https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3393-3398.2000>
12. Naseem, H. & Bano, A. (2014). Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *J. Plant Interact.*, 9, No. 1, pp. 689-701. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.902125>
13. Vanderlinde, E.M., Harrison, J.J., Muszynski, A., Carlson, R.W., Turner, R.J. & Yost, C.K. (2010). Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 71, No. 3, pp. 327-340. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00824.x>
14. Leschenko, A.K., Sichkar, V.I., Mikhailov, B.G. & Mar'yushkin, V.F. (1987). Soya. Kyiv: Naukova dumka [in Russian].
15. Kots, S.Ya., Beregoenko, S.K., Kirichenko, E.V. & Melnykova, N.N. (2007). Features of interaction between plants and nitrogen-fixing microorganisms. Kyiv: Naukova dumka [in Russian].

16. Melnykova, N.M., Malichenko, S.M. & Datsenko, V.K. (1998). Study of competitiveness of lupine nodule bacteria under the inoculation by active and inactive strains. *Fiziologiya i Biokhimiya Kult. Rastanii*, 30, No. 1. pp. 49-53 [in Ukrainian].
17. Grodzinskiy, A.M. & Grodzinskiy, D.M. (1964). Quick reference guide for plant physiology. Kyiv: Naukova dumka [in Russian].
18. Fomkina, M.M. & Ibragimova, S.A. (2016). Using of microbial polysaccharides for seed treatment. *Ogarev-online. Biological Sci.* 24. URL: <http://journal.mrsu.ru/arts/ispolzovanie-mikrobnых-polisaxaridov-dlya-obrabotki-semyan> [in Russian].
19. Kosenko, L.V., Khailova, G.F. & Korelov, V.E. (2001). Effect exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* on nodulation and rhizogenesis of pea plants. *Fiziologiya i Biokhimiya Kult. Rastanii*, 33, No. 4, pp. 347-354 [in Russian].
20. Laus, M.C., van Brussel, A.A. & Kijne, J.W. (2005). Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, pp. 1123-1129. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1123>
21. Rodrigues, A.C., Vendruscolo, C.T., da Silveira Moreira, A., Santana, M.V.S, de Paula Oliveira, J.P., Bonifacio, A. & Figueiredo, M.A.D.V.B. (2015). *Rhizobium tropici* exopolysaccharides as carriers improve the symbiosis of cowpea-*Bradyrhizobium-Paenibacillus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 9, pp. 2037-2050. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7592>
22. Skorupska, A., Derylo, M. & Lorkiewicz, Z. (1985). Role of noncarbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Arch. Microbiol.*, 143, No. 3, pp. 307-331. <https://doi.org/10.1007/BF00411255>

Received 09.09.2019

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ РИЗОБИЙ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН СОИ И КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЕ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СОЕВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

Н.Н. Мельникова

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

В лабораторных и вегетационных условиях исследовали энергию прорастания семян сои, массу проростков, а также особенности клубенькообразования при формировании соево-ризобиального симбиоза в период вегетативного роста растений под влиянием экзополисахаридов (ЭПС) клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* 634б (микросимбионт сои), *Bradyrhizobium japonicum* 631 (микросимбионт сои и люпина) и *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 359а, 400 (штаммы ризобий люпина, которые отличаются по активности). Показано, что ЭПС микроорганизмов существенно не стимулировали прорастание семян и развитие проростков сои. Тенденция к увеличению энергии прорастания и массы сухого вещества проростков наблюдалась при использовании препарата ЭПС400 в концентрации 0,100 мг/мл, что может быть обусловлено свойствами этого биополимера. Уменьшение количества экстрацеллюлярных полисахаридов в инкубационном растворе до 0,025 мг/мл вызвало недостоверное снижение массы проростков сои. Исследуемые ЭПС в случае предварительной обработки ими проростков сои с последующей инокуляцией *B. japonicum* 634б стимулировали клубенькообразование на корнях растений в фазу двух тройчатых листьев (V2). В фазу трех тройчатых листьев (V3), а также при инокуляции инкубированных с ЭПС проростков бактериями *B. japonicum* 631 наблюдалась тенденция к увеличению количества корневых клубеньков. Препараты ЭПС634 и ЭПС631 в сочетании со штаммами-инокулянтами соответственно *B. japonicum* 634б и *B. japonicum* 631 способствовали более раннему началу формирования симбиотического аппарата у растений сои. В ходе исследований не обнаружено четкой зависимости характера влияния (специфичности) экзополисахаридов ризобий на прорастание семян, развитие проростков и формирование соево-ризобиального симбиоза от симбиотических свойств штаммов,

из которых они были выделены. Однако определенное отличие в направленности действия углеводных биополимеров наблюдалось.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, соя, экзополисахариды, прорастание семян, симбиоз, клубенькообразование.

EFFECT OF RHIZOBIAL EXOPOLYSACCHARIDES ON SOYBEAN SEED GERMINATION AND NODULE DEVELOPMENT IN THE SOYBEAN-RHIZOBIA SYMBIOSIS

N.M. Melnykova

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

The germination vigor of soybean seeds, seedlings weight, and nodulation activity during the development of soybean-rhizobia symbiosis at the vegetative stages of plant growth under the influence of the exopolysaccharides (EPS) of nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* 634b (microsymbiont of soybean), *Bradyrhizobium japonicum* 631 (microsymbiont of both soybean and lupine) and *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 359a, 400 (microsymbionts of lupine, with different nitrogen-fixing activities) were evaluated in laboratory and pot experiments. It was shown that microbe EPS had no significant stimulative effect on soybean seed germination and seedling development. The tendency of increasing germination vigor and seedling dry weight was observed while the EPS400 at concentration of 0.100 mg/ml was used. This may be due to carbohydrate biopolymer properties. The decrease in the amount of the extracellular polysaccharides to 0.025 mg/ml resulted in a reduction in the soybean seedling weight but it was not reliable. Rhizobial EPS stimulated nodulation of soybean at the two trifoliolate leaf stage (V2) when they were applied to seedlings before inoculation with *B. japonicum* 634b. There was a tendency towards an increasing the number of root nodules at the three trifoliolate leaf stage (V3) and also when the soybean seedlings were incubated with EPS and then inoculated with *B. japonicum* 631. Early root nodule formation was observed when soybean plants were treated by the EPS634 and EPS631 and then inoculated respectively with *B. japonicum* 634b and *B. japonicum* 631. There was no clear relationship between the specificity of rhizobial polysaccharides action on seed germination, seedlings development, nodule formation in the soybean—*B. japonicum* symbiosis and symbiotic properties of the strains, from what the EPS were obtained. However, there was some difference between the carbohydrate biopolymers in their action.

Key words: nodule bacteria, soybean, exopolysaccharides, seed germination, symbiosis, nodulation.