

<https://doi.org/10.15407/frg2023.01.046>

УДК 579: 581.1: 631.86: 631.847.211: 632.952

ВПЛИВ 24-ЕПІБРАСИНОЛІДУ НА *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* У ЧИСТІЙ КУЛЬТУРІ ТА СИМБІОЗІ З РОСЛИНАМИ СОЇ

Л.І. РИБАЧЕНКО, С.Я. КОПЬ, К.П. КУКОЛ, П.П. ПУХТАЄВИЧ,
О.Р. РИБАЧЕНКО, Л.А. КУДРЯВЧЕНКО

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

Брасиностероїди (БС) — група рослинних стероїдних гормонів, які регулюють широкий спектр фізіологічних реакцій, зокрема, подовження клітин, фотоморфогенез, диференціювання ксилеми, проростання насіння тощо. Вони сприяють формуванню бобово-ризобіальних симбіотичних систем. Прикладні дослідження вказують на потенційно складну роль цих гормонів в утворенні бульбочок із позитивними і негативними ефектами. Саме тому дослідження, спрямовані на вивчення їх участі у процесах формування та функціонування симбіозу, актуальні. Мета нашої роботи полягала у тому, щоб з'ясувати, як впливає 24-епібрасинолід (24-ЕБЛ) на ріст *Bradyrhizobium japonicum* у чистій культурі та реалізацію азотфіксувального потенціалу в симбіозі з рослинами сої. Виявлено, що штам *B. japonicum* PC08 не мав вираженої реакції на застосування 24-епібрасиноліду в досліджуваних концентраціях $5 \cdot 10^{-4}$ і $1 \cdot 10^{-5}$ г/л. Як позитивний, так і негативний вплив досліджуваної речовини на ріст ризобій цього штаму був незначним або повністю відсутнім. Додавання фітогормону у середовище вирощування бульбочкових бактерій штаму *B. japonicum* T21-2 стимулювало наростання маси ризобіальних клітин. У контрольованих умовах вегетаційного дослідження встановлено, що 24-епібрасинолід забезпечував збільшення кількості корневих бульбочок незалежно від концентрації та способу його застосування. Відмічено істотний вплив залученого в роботу фітогормону в концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ г/л на ріст кореневої системи рослин сої. Отже, у результаті наших досліджень виявлено зміни ростової активності ризобій за впливу 24-епібрасиноліду. При цьому ефект від його застосування значною мірою визначав штам *B. japonicum*, який ми використовували. Зроблено припущення, що реакція на застосування 24-епібрасиноліду залежить від властивостей і походження штаму. Підтверджено позитивний вплив 24-епібрасиноліду на кількість утворених корневих бульбочок на пізніх етапах формування симбіотичного апарату. Виявлені нами зміни азотфіксувальної активності симбіотичних систем за впливу 24-епібрасиноліду свідчать на користь гіпотези про те, що брасиностероїди впливають на функціонування корневих бульбочок.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, регулятори росту, 24-епібрасинолід, нодуляційна активність, азотфіксація, соя.

Цитування: Рибаченко Л.І., Копь С.Я., Кукол К.П., Пухтаєвич П.П., Рибаченко О.Р., Кудрявченко Л.А. Вплив 24-епібрасиноліду на *Bradyrhizobium japonicum* у чистій культурі та симбіозі з рослинами сої. *Фізіологія рослин і генетика*. 2023. 55, № 1. С. 46–57. <https://doi.org/10.15407/frg2023.01.046>

На сьогодні ефективне функціонування агропромислового комплексу ґрунтується не лише на досягненні високої продуктивності культурних рослин, а й екологічній безпеці отриманого урожаю. Тобто, основою конкурентоздатної сільськогосподарської продукції на світовому ринку є як економічні критерії її вартості, так і суворий контроль якості та безпеки [1, 2].

Важливе економічне та екологічне значення під час вирощування бобових культур має процес симбіотичної азотфіксації. Залучення бобово-ризобіального симбіозу в сільськогосподарське виробництво є альтернативним шляхом забезпечення культурних рослин біологічно чистим азотом, що допомагає отримувати високі врожаї екологічно безпечної продукції рослинництва [3]. Одним із важливих чинників підвищення ефективності азотфіксації може бути використання регуляторів росту рослин разом з інокуляцією насіння.

Дослідники встановили, що крім регуляції фізіологічних процесів у рослинному організмі ці сполуки позитивно впливають також на розвиток і функціонування мікрофлори ґрунту [4]. Передусім вони активізують мікробіологічні процеси в зоні кореневої системи. Разом з цим здатні стимулювати органогенез корневих бульбочок і забезпечувати формування потужного симбіотичного апарату. Їх участь у нодуляційному процесі може бути прямою чи опосередкованою, зокрема на біохімічному рівні, коли вони виступають аналогами фітогормонів. При цьому ефект від застосування регуляторів росту визначається природою речовин у їх складі, генотипом макросимбіонта, ступенем комплементарності сортів із гомологічними ризобіями [5].

Особливу увагу слід звернути на брасиностероїди (БС). Це група полігідроксильованих стероїдних фітогормонів, необхідних для розвитку, росту і формування урожаю рослин. Вони беруть участь у регуляції поділу, подовження та диференціації багатьох типів клітин протягом усього життєвого циклу рослини [6]. До цієї групи фітогормонів входить понад 70 представників, серед яких найактивнішим є 24-епібрасинолід. БС відіграють ключову роль у підтриманні нормального росту рослин як за оптимальних умов, так і під впливом несприятливих чинників середовища. Вони зв'язуються зі специфічними рецепторами та опосередковують їх дію через каскад сигнальної трансдукції, що в кінцевому підсумку веде до зміни експресії тисяч ядерних генів, залучених до регуляції різноманітних функцій рослинного організму. Крім специфічних білків у трансдукції беруть участь універсальні сигнальні медіатори небілкової природи, такі як іони кальцію, активні форми кисню, оксид азоту (NO), сірководень (H₂S), а також компоненти ліпідного сигналу [7].

Встановлено, що екзогенні брасиностероїди, зокрема епібрасинолід і епікастастерон, зв'язуються з рослиною специфічними рецепторними кіназами BRI-1 на поверхні плазматичної мембрани, що приводить до запуску брасиностероїдспецифічних сигнальних реакцій та модифікації метаболічних і фізіологічних процесів. Активація BRI-1-рецепторів сприяє стимуляції входу Ca²⁺ крізь плазматичну мембрану в клітину та зростанню цитоплазматичної активності Ca²⁺ [8].

Відомо, що обробка брасиностероїдами впливає на нодуляційні процеси та активність фіксації азоту в *Arachis hypogaea* L., *Glycine max* (L.) Merr., *Pisum sativum* L. [9, 10]. Проте літературні дані щодо впливу цих сполук на ризобії та подальше утворення симбіозу досить суперечливі. Зокрема, доведено, що екзогенні брасиностероїди здатні посилювати процеси нодуляції, а обробка ними рослин під час вегетації підвищує також азотфіксуючу активність [11]. Водночас встановлено, що у гіпернодулювального мутанта сої обробка брасиностероїдами листків, навпаки, пригнічувала формування корневих бульбочок та азотфіксуючу активність залежно від дози нанесеного препарату. Однак на рослини дикого типу БС не діяли. За обробки листків рослин дикого типу брасиназолом — інгібітором біосинтезу брасиностероїдів — кількість бульбочок збільшувалась і значно сповільнювалось подовження стебла.

Ендогенні брасиностероїди також впливають на формування корневих бульбочок. Так, встановлено, що у брасиностероїдефіцитних мутантів гороху утворювалось значно менше бульбочок, ніж у рослин дикого типу [12, 13].

З вищеописаних результатів досліджень чітко видно, що брасиностероїди активно залучаються у процеси нодуляції й азотфіксації. Проте, на жаль, залишається ще багато невивчених запитань, зокрема, підбір максимально ефективних сполук, їх концентрацій і способів застосування. Тому ми поставили собі за мету з'ясувати вплив 24-епібрасиноліду на ріст *B. japonicum* у чистій культурі та реалізацію їх азотфіксуючого потенціалу в симбіозі з рослинами сої.

Методика

У дослідженнях використано 2 штами бульбочкових бактерій із музейної колекції азотфіксуючих мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ НАН України): *Bradyrhizobium japonicum* T21-2 і PC08. Перший штам отриманий шляхом міжвидової кон'югації *B. japonicum* 646 і *Escherichia coli* S17-1. У геномі клітин бульбочкових бактерій цього штаму наявний фрагмент гену неоміцинофосфотрансферази транспозону Tn5 завдовжки 517 пн, що відрізняє його від вихідного штаму і забезпечує стійкість до канаміцину сульфату в концентрації 200 мг/мл. Штам T21-2 характеризується підвищеною продукцією екзополісахаридів, непатогенний, з високою екологічною пластичністю та конкурентоздатністю. Штам *B. japonicum* PC08 виділений із бульбочок сої сорту Київська 27, що росла на темно-сірому опідзоленому ґрунті. Він висококонкурентоздатний і має велику технологічність [14].

Бактерії культивували за 26–28 °С на манітно-дріжджовому середовищі такого складу, г/л: KH_2PO_4 — 0,5; MgSO_4 — 0,2; NaCl — 0,1; дріжджовий екстракт — 1,0; маніт — 10,0 [15]. Перед висівом ризобій у відповідних варіантах у середовище вирощування вносили 24-епібрасинолід у концентраціях $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ г/л. Контроль — культивування ризобій без застосування епібрасиноліду (T21-2 — контроль 1; PC08 — контроль 2). Посівний матеріал у колби вносили у концентрації 2 % об'єму поживного середовища, чисельність ри-

зобій у суспензії становила 10^8 кл/мл. Культуру вирощували методом періодичного інкубування на кругових качалках у колбах Ерленмейера, що містили 200 мл поживного середовища. Чистоту культури перевіряли шляхом її висівання на м'ясо-пептонний агар, на якому ризобії не ростуть. Приріст біомаси мікроорганізмів контролювали на 3-тю та 4-ту доби культивування за показником оптичної густини, яку вимірювали спектрофотометром Shimadzu UV-1900 (Японія) за довжини хвилі 600 нм. Чисельність мікроорганізмів у бактеріальній суспензії визначали методом послідовних розбавлень.

Вегетаційні досліди проводили на базі ІФРГ НАН України. У відповідних варіантах насіння сої сорту Алмаз перед посівом інкубували у розчинах 24-ЕБЛ (1 год) та інокулювали (1 год) бульбочковими бактеріями штаму T21-2 (чистими або з додаванням відповідних концентрацій 24-ЕБЛ) за такою схемою:

- 1) *B. japonicum* T21-2 + насіння (контроль);
- 2) [*B. japonicum* T21-2 + 24-ЕБЛ ($1 \cdot 10^{-5}$ г/л)] + насіння;
- 3) [*B. japonicum* T21-2 + 24-ЕБЛ ($5 \cdot 10^{-4}$ г/л)] + насіння;
- 4) [насіння + 24-ЕБЛ ($1 \cdot 10^{-5}$ г/л)] + *B. japonicum* T21-2;
- 5) [насіння + 24-ЕБЛ ($5 \cdot 10^{-4}$ г/л)] + *B. japonicum* T21-2.

Сою вирощували по 6 рослин у 4-кілограмових посудинах, за природних освітлення і температури, оптимального водозабезпечення (60 % повної вологоємності (ПВ)). Як субстрат використовували промитий річковий пісок. Джерелом мінерального живлення слугувала поживна суміш Гельригеля, збагачена мікроелементами: молібденом, бором, марганцем і міддю, збіднена на азот — 0,25 норми (1 норма азоту відповідає $708 \text{ мг Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ на 1 кг субстрату).

Відбір зразків для аналізу процесів формування і функціонування симбіотичного апарату, а також оцінювання показників вегетативної маси проводили у фазі трьох справжніх листків, бутонізації та цвітіння.

Нодуляційну активність ризобій визначали підрахуванням кількості бульбочок на коренях рослин і вимірюванням їх маси. Азотфіксувальну активність симбіотичних систем визначали ацетиленовим методом [16]. Газову суміш аналізували на хроматографі Agilent GC System 6850 (США). Азотфіксувальну активність виражали в мікромолях утвореного етилену за 1 годину (мкмоль C_2H_4 /год) на рослину.

Морфометричні показники визначали зважуванням надземної і кореневої маси рослин.

Результати у таблицях наведено у вигляді середніх арифметичних значень та їх стандартних похибок ($x \pm \text{SE}$). Достовірність відмінностей між вибірками оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), за якого відмінності вважаються значущими, якщо $p < 0,05$ (з поправкою Бонферроні).

Результати та обговорення

Аналіз результатів досліджень показав, що додавання до середовища вирощування ризобій 24-ЕБЛ у концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ г/л мало вираженіший стимулювальний ефект на чисельність ризобіальних клітин

штаму T21-2 порівняно із концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ г/л (табл. 1). Зокрема зафіксовано зростання досліджуваного показника відносно контролю 1 на 3-тю добу культивування на 10 %, на 4-ту — на 20 %. Концентрація 24-ЕБЛ $5 \cdot 10^{-4}$ г/л також чинила стимулювальний ефект на приріст біомаси ризобіальних клітин цього штаму. Так, на 3-тю добу вирощування бактерій спостерігалася лише тенденція до зростання досліджуваного показника, тоді як на 4-ту добу зафіксовано достовірне збільшення чисельності мікробних клітин відносно контролю 1 на 19 %.

Показано, що штам PC08 не мав вираженої реакції на застосування 24-ЕБЛ. Жодна із досліджуваних нами концентрацій цього регулятора росту не викликала істотних змін у динаміці росту бактеріальної культури PC08. Винятком була 3-тя доба культивування ризобій, коли зафіксовано незначне зниження досліджуваного показника відносно контролю 2 на 7 і 8 % у варіантах із концентрацією 24-ЕБЛ $5 \cdot 10^{-4}$ та $1 \cdot 10^{-5}$ г/л відповідно (див. табл. 1).

Можливо, виявлена нами різниця у реакції обраних штамів на застосування епібрасиноліду пов'язана із методом їх одержання. Як вище зазначено, штам T21-2 отриманий методом транспозонового мутагенезу, а отже, є стійкішим до впливу несприятливих чинників різного походження та дії елементів хімічної природи. Крім цього, він характеризується підвищеною продукцією екзополісахаридів, що надає йому додаткової стійкості до впливу різних штучно синтезованих речовин [14].

Отже, ми встановили, що ефект від застосування 24-ЕБЛ значною мірою залежить від штаму ризобій, який ми використовували. Штам бульбочкових бактерій PC08 не мав вираженої реакції на застосування досліджуваних концентрацій 24-ЕБЛ. Як позитивний, так і негативний вплив досліджуваної речовини на ріст ризобій цього штаму був незначним або повністю відсутнім. В той самий час

ТАБЛИЦЯ 1. Чисельність ризобіальних клітин (кл/мл, $\times 10^8$) за впливу різних концентрацій 24-епібрасиноліду ($\bar{x} \pm SE$, $n = 9$)

Варіант	Термін культивування ризобій, доба	
	3-тя доба	4-та доба
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> T21-2		
Контроль 1	7,75 \pm 0,20 ^a	7,23 \pm 0,27 ^a
24-ЕБЛ $1 \cdot 10^{-5}$ г/л	8,54 \pm 0,10 ^b	8,73 \pm 0,36 ^b
24-ЕБЛ $5 \cdot 10^{-4}$ г/л	7,91 \pm 0,14 ^a	8,63 \pm 0,23 ^b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> PC08		
Контроль 2	8,47 \pm 0,10 ^d	6,72 \pm 0,25 ^c
24-ЕБЛ $1 \cdot 10^{-5}$ г/л	7,78 \pm 0,28 ^c	6,55 \pm 0,39 ^c
24-ЕБЛ $5 \cdot 10^{-4}$ г/л	7,88 \pm 0,16 ^c	7,12 \pm 0,41 ^c

П р и м і т к а. Різні літери верхніх індексів ^{a, b, c, d} у стовпчиках вказують на значення, які істотно різняться між варіантами, що визначено порівнянням за допомогою тесту Тукі ($p < 0,05$) з поправкою Бонферроні (^{a, b} — вірогідно між варіантами у стовпчику для штаму T21-2; ^{c, d} — вірогідно між варіантами у стовпчику для штаму PC08).

додавання фітогормону у середовище вирощування ризобій штаму T21-2 привело до стимуляції наростання маси ризобіальних клітин.

Біологічною особливістю сої як бобової культури є здатність утворювати високоефективні азотфіксувальні симбіози з бульбочковими бактеріями, у результаті діяльності яких ґрунти збагачуються доступними для рослин формами азоту [17].

Встановлено, що вирощування ризобій на середовищі з додаванням 24-ЕБЛ у концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ г/л сприяло зростанню відносно контрольних рослин не лише кількості й маси корневих бульбочок на 39 і 38 % відповідно, а й їх азотфіксувальної активності (АФА) на 59 % у фазу трьох справжніх листків. Аналогічну ситуацію ми спостерігали і у фазу цвітіння, коли досліджувані показники зростали на 63, 22 та 47 % відповідно. У фазу бутонізації виявлено підвищення лише показників АФА на 15 %, кількість і маса корневих бульбочок залишалися на рівні контрольних рослин (табл. 2).

Концентрація 24-ЕБЛ $5 \cdot 10^{-4}$ г/л приводила до збільшення кількості бульбочок відносно контролю у фазу трьох справжніх листків на 61 %, бутонізації — на 19 %, цвітіння — на 23 %. При цьому їхня маса була на рівні контрольних рослин у фази трьох справжніх листків і цвітіння, лише у фазу бутонізації перевищувала його на 29 %. АФА бульбочок, сформованих на коренях рослин цього варіанта, підвищувалась у процесі вегетації сої, починаючи з показника $1,56$ мкмоль C_2H_4 /(рослину \cdot год) у фазу трьох справжніх листків, який на 38 % був нижчим від показника контрольних рослин, до $9,23$ мкмоль C_2H_4 /(рослину \cdot год) у фазу цвітіння, що на 73 % перевищував контрольні рослини.

Виявлено, що ефект від застосування епібрасиноліду для обробки насіння значною мірою залежав від фази розвитку рослин і концентрації препарату (табл. 2). Так, 24-ЕБЛ у концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ г/л не впливав на АФА симбіотичних систем у рослин цього варіанта. Показник був на рівні контрольних рослин, за винятком фази бутонізації, коли зафіксовано його збільшення на 14 %. Аналіз нодуляційної активності ризобій показав істотне зростання кількості та маси бульбочок (90 і 115 % відповідно) на коренях рослин цього варіанта у фазу трьох справжніх листків. У фази бутонізації та цвітіння зміни виявлено лише у кількості бульбочок, яка збільшувалася відносно контролю на 30 і 108 % відповідно.

Обробка насіння 24-ЕБЛ у концентрації $5 \cdot 10^{-4}$ г/л, як і у випадку з концентрацією $1 \cdot 10^{-5}$ г/л, сприяла зростанню кількості корневих бульбочок відносно контрольних рослин у всі досліджувані нами фази розвитку сої, а саме: на 51 % — фаза трьох справжніх листків, на 52 % — фаза бутонізації, на 47 % — фаза цвітіння. За АФА симбіотичні системи цього варіанта перевищували контрольні у фазу трьох справжніх листків на 52 %, тоді як у фазу бутонізації на 25 % були нижчими від нього (див. табл. 2).

Чітке розуміння впливу брасиностероїдів на процеси формування і функціонування симбіотичних структур на сьогодні відсутнє. Це пов'язано з тим, що більшість ранніх досліджень ролі цих сполук у формуванні бульбочок ґрунтувались на застосуванні синтетичних БС та інгібіторів біосинтезу БС, тому дали неоднозначні результати,

Таблиця 2. Формування та функціонування симбіотичної системи соя—*Bradyrhizobium japonicum* T21-2 за впливу 24-епібрасіноїду (кількість (шт./рослину), маса (г/рослину), АФА (мкмоль C₂H₄/ (рослину · год)) кореневих бульбочок) (x±SE, n = 12)

Варіант	Фаза розвитку рослини									
	Три справжні листки			Бутонізація			Цвітіння			
	Кількість бульбочок	Маса бульбочок	АФА	Кількість бульбочок	Маса бульбочок	АФА	Кількість бульбочок	Маса бульбочок	АФА	
<i>V. japonicum</i> + насіння (контроль)	16,33±1,27 ^b	0,19±0,04 ^a	2,53±0,31 ^b	22,33±1,03 ^a	0,41±0,04 ^a	6,18±0,19 ^b	17,00±1,55 ^a	0,79±0,09 ^b	5,31±0,50 ^a	
[<i>V. japonicum</i> + 24-ЕБЛ 1 · 10 ⁻⁵ г/л] + насіння	22,66±1,37 ^b	0,26±0,02 ^b	4,03±0,19 ^c	20,00±1,24 ^a	0,39±0,06 ^a	7,12±0,55 ^c	27,66±2,08 ^c	0,62±0,01 ^a	7,83±0,23 ^b	
[<i>V. japonicum</i> + 24-ЕБЛ 5 · 10 ⁻⁴ г/л] + насіння	26,33±3,21 ^b	0,17±0,04 ^a	1,56±0,52 ^a	26,66±1,50 ^b	0,53±0,05 ^b	6,57±0,45 ^{bc}	21,00±2,38 ^b	0,68±0,03 ^{ab}	9,23±0,13 ^c	
[Насіння + 24-ЕБЛ 1 · 10 ⁻⁵ г/л] + <i>V. japonicum</i>	31,00±1,35 ^c	0,41±0,03 ^c	2,40±0,22 ^b	29,00±1,73 ^b	0,47±0,06 ^a	7,05±0,36 ^c	35,30±1,02 ^d	0,75±0,01 ^b	5,25±0,42 ^a	
[Насіння + 24-ЕБЛ 5 · 10 ⁻⁴ г/л] + <i>V. japonicum</i>	24,66±1,50 ^b	0,20±0,05 ^{ab}	3,86±0,14 ^c	34,00±1,54 ^c	0,42±0,05 ^a	4,67±0,33 ^a	25,00±1,08 ^c	0,57±0,09 ^a	4,78±0,38 ^a	

Примітка. Тут і у табл. 3: різні літери верхніх індексів ^{a, b, c, d} у стовпчиках вказують на значення, які істотно різняться між варіантами, що визначено порівнянням за допомогою тесту Тукі ($p < 0,05$) з поправкою Бонферроні (^{a, b, c, d} — вірогідно між варіантами у стовпчику).

Таблиця 3. Вплив 24-епібрасіноїду на показники вегетативної маси рослин сої (г/рослину), іноккульованої штамом *Bradyrhizobium japonicum* T21-2 (x±SE, n = 15)

Варіант	Фаза розвитку рослини					
	Три справжні листки		Бутонізація		Цвітіння	
	Надземна маса	Маса кореня	Надземна маса	Маса кореня	Надземна маса	Маса кореня
<i>V. japonicum</i> + насіння (контроль)	2,61±0,19 ^a	2,96±0,11 ^b	4,81±0,27 ^b	4,48±0,11 ^a	6,25±0,09 ^a	5,68±0,32 ^a
[<i>V. japonicum</i> + 24-ЕБЛ 1 · 10 ⁻⁵ г/л] + насіння	2,99±0,08 ^b	3,30±0,12 ^c	4,58±0,23 ^{ab}	5,03±0,15 ^b	6,23±0,24 ^a	6,22±0,18 ^b
[<i>V. japonicum</i> + 24-ЕБЛ 5 · 10 ⁻⁴ г/л] + насіння	2,67±0,17 ^a	2,79±0,22 ^b	4,27±0,23 ^a	4,25±0,27 ^a	6,14±0,20 ^a	5,87±0,13 ^a
[Насіння + 24-ЕБЛ 1 · 10 ⁻⁵ г/л] + <i>V. japonicum</i>	2,97±0,27 ^{ab}	2,45±0,09 ^a	5,28±0,12 ^c	4,99±0,26 ^b	6,35±0,28 ^a	5,66±0,20 ^a
[Насіння + 24-ЕБЛ 5 · 10 ⁻⁴ г/л] + <i>V. japonicum</i>	2,65±0,14 ^a	3,97±0,12 ^d	4,97±0,20 ^{bc}	4,55±0,12 ^a	6,07±0,13 ^a	5,61±0,06 ^a

включаючи як позитивні, так і негативні ефекти цих сполук на утворення бульбочок у деяких бобових культур [18].

Відомо, що встановлення бобово-ризобіальних систем — це складний процес, який вимагає точної координації двох окремих програм: інфекції в епідермісі та органогенезу бульбочок у корі. Координація інфекції та органогенезу бульбочок вимагає суворого просторового й часового контролю. Гормони рослин є унікальними регуляторами процесу нодуляції. Цитокініни, стриголактони та локальні накопичення ауксину стимулюють розвиток бульбочок. Етилен, жасмонова, абсцизова і гіберелова кислоти є інгібіторами утворення інфекційних ниток і розвитку бульбочок. Саліцилова кислота і БС можуть по-різному впливати на формування корневих бульбочок. Вони діють як промоутери ініціації бульбочок через етилензалежний і незалежний шляхи. Тобто, одним зі шляхів впливу цих гормонів на утворення корневих бульбочок може бути інгібування біосинтезу етилену. Також доведено, що БС інгібують ранні стадії утворення бульбочок, зокрема накопичення ауксину, деформацію кореневого волоска та утворення інфекційної нитки. При цьому утворення інфекційної нитки регулюється БС незалежним від етилену способом [19].

БС пригнічують формування корневих бульбочок на ранніх стадіях, але все ж доведено їх позитивний вплив на кінцеву кількість утворених бульбочок. Водночас дефіцит цих сполук не впливає на структуру бульбочок або здатність фіксувати азот. Такі результати засвідчують, що БС є інгібіторами процесу інфікування і стимуляторами процесу ініціації бульбочок. Крім того, вони не є вкрай необхідними для органогенезу або функціонування корневих бульбочок [20, 21].

Ми зосередили дослідження на пізніших етапах формування та функціонування симбіотичного апарату сої. Виявлене нами збільшення кількості корневих бульбочок незалежно від способу використання 24-ЕБЛ, його концентрації та обраних фаз розвитку рослин підтверджує той факт, що незважаючи на інгібування БС ранніх стадій формування бульбочок, вони позитивно впливають на кінцеву їх кількість. При цьому зафіксовані нами зміни АФА симбіотичних систем за впливу 24-ЕБЛ, які, навпаки, істотно залежали від способу використання фітогормона та його концентрації, суперечать твердженням багатьох авторів, що ці гормони не впливають на функціонування корневих бульбочок.

Отже, дослідження процесів формування і функціонування соєво-ризобіальних симбіотичних систем показало, що ефект від застосування 24-ЕБЛ залежить від концентрації препарату, способу його застосування, а також фази розвитку рослин. Встановлено, що використання 24-ЕБЛ як компонента середовища вирощування ризобій було ефективнішим для стимуляції функціонування симбіотичного апарату рослин сої, ніж обробка ним насіння. При цьому концентрація $1 \cdot 10^{-5}$ г/л чинила вираженішу позитивну дію.

24-ЕБЛ, незалежно від способу його використання, не істотно впливав на накопичення надземної маси рослинами сої протягом усього їх онтогенезу (табл. 3). Винятком були рослини, вирощені з на-

сіння, проінокульованого суспензією ризобій із додаванням 24-ЕБЛ у концентрації $5 \cdot 10^{-4}$ г/л, у яких зафіксовано зниження на 11 % цього показника відносно контролю у фазу бутонізації. Під час цієї фази розвитку сої рослини, вирощені з насіння, обробленого 24-ЕБЛ у концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ г/л, перевищували контрольні на 10 %.

Ми виявили істотний вплив 24-ЕБЛ у концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ г/л на ріст кореневої системи рослин сої (див. табл. 3). Застосування цього фітогормона у такій концентрації як компонента інокуляційної суспензії сприяло збільшенню кореневої маси сої на 11 % відносно контрольних рослин у фазу трьох справжніх листків. Разом з тим обробка насіння такою самою концентрацією привела до значного зниження (на 17 %) цього показника відносно контролю. У фазу бутонізації коренева маса сої обох зазначених варіантів збільшилась відносно контролю на 12 і 11 % відповідно. У фазу цвітіння зафіксовано зростання маси кореня на 9 % лише за концентрації 24-ЕБЛ $1 \cdot 10^{-5}$ г/л як компонента інокуляційної суспензії.

Проаналізувавши показники нодуляційної активності ризобій і виявлене нами зростання кореневої маси за впливу 24-ЕБЛ, можна припустити, що формування потужнішого симбіотичного апарату у рослин сої за дії цього регулятора росту відбулось, зокрема, за рахунок збільшення кореневої системи.

24-ЕБЛ у концентрації $5 \cdot 10^{-4}$ г/л істотно не впливав на ріст кореневої маси сої, крім варіанта з обробкою ним насіння, що забезпечувало зростання маси кореня рослин сої лише у фазу трьох справжніх листків на 34 % відносно контрольних (табл. 3).

Таким чином, у результаті наших досліджень було проаналізовано динаміку росту бактеріальних культур за впливу 24-епібрасиноліду. Виявлено, що ефект від його застосування значною мірою визначав штам *V. japonicum*, який ми використовували. Зроблено припущення, що реакція на застосування 24-епібрасиноліду залежить від властивостей і походження штаму. Встановлено, що незалежно від концентрації та способу використання 24-епібрасинолід сприяв збільшенню кількості корневих бульбочок під час усіх досліджуваних нами фаз розвитку рослин. При цьому виявлені нами зміни АФА симбіотичних систем за дії 24-епібрасиноліду, навпаки, істотно залежать від способу використання препарату та свідчать на користь гіпотези, що брасиностероїди впливають на функціонування корневих бульбочок. Встановлено значний вплив 24-епібрасиноліду у концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ г/л на ріст кореневої системи рослин сої.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Гуторов А.О., Гуторов О.І., Грошев С.В. Управління ефективністю використання земельних ресурсів фермерських господарств: теорія та практика сталого землекористування. Харків: Мадрид, 2020. 224 с.
2. Dankevych E., Dankevych V., Chaikin O. Ukraine agricultural and market formation preconditions. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2017. **65**. P. 259–271. <https://doi.org/10.11118/actaun201765010259>
3. Sonali R., Liu W., Nandeti R.S., Crook A., Mysore K.S., Pislariu C.I., Frugoli J., Dickstein R., Udvardi M.K. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodule formation and symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*. 2020. **32**, N 1. P. 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>

4. Hayat S., Hasan S.A., Yusuf M., Hayat Q., Ahmad A. Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environmental and Environmental Botany*. 2010. **69**, N 2. P. 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.03.004>
5. Yang J., Lan L., Jin Y., Yu N., Wang D., Wang E. Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2021. **64**, N 2. P. 244–267. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>
6. Wei Z., Li J. Brassinosteroids regulate root growth, development, and symbiosis. *Molecular Plant*. 2016. **9**, N 1. P. 86–100 <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.003>
7. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Поляков О.К. Індукування стійкості рослин до дії абіотичних стресорів екзогенними брасиностероїдами. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*. 2020. **51**, № 3. P. 6–36. <https://doi.org/10.35550/vbio2020.03.006>
8. Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., Sosan A., Kolbanov D., Sokolik A., Demidchik V. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plant. *Steroids*. 2015. **97**, N 5. P. 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.10.008>
9. Shahid M.A., Pervez M.A., Balal R.M., Mattson N.S., Rashid A., Ahmad R., Ayyub C.M., Abbas T. Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.). *Australian Journal of Crop Science*. 2011. **5**, N 5. P. 500–510.
10. Terakado J., Fujihara S., Goto S., Kuratani R., Suzuki Y., Yoshida S., Yoneyama T. Systemic effect of a brassinosteroid on root nodule formation in soybean as revealed by the application of brassinolide and brassinazole. *Soil Science and Plant Nutrition*. 2005. **51**. P. 389–395. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2005.tb00044.x>
11. Vardhini B.V., Rao S.S.R. Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regulation*. 1999. **28**. P. 165–167.
12. Ferguson B.J., Ross J.J., Reid J.B. Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology*. 2005. **138**, N 4. P. 2396–2405. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062414>
13. Коць С.Я., Гришук О.О. Фітогормони у формуванні та функціонуванні симбіотичних взаємовідносин бобових рослин і бульбочкових бактерій. *Фізіологія рослин і генетика*. 2015. **47**, № 3. С. 187–206.
14. Коць С.Я., Воробей Н.А., Кириченко О.В., Мельникова Н.М., Михалків Л.М., Пухтаєвич П.П. Мікробіологічні препарати для сільського господарства. Київ: Логос, 2016. 48 с.
15. Child J.J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. association with nonleguminous plant cell cultures. *Nature*. 1975. **253**. P. 350–351.
16. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene — ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 1968. **43**. P. 1185–1207.
17. Kshnikatkina A., Galiullin A., Kshnikatkin S., Alenin P. Legume-rhizobial symbiosis of the pannonian clover variety anik using complex microelements and growth regulators. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*. 2020. **64**, N 1. P. 659–664.
18. Yusuf M., Fariduddin Q., Ahmad A. 24-Epibrassinolide modulates growth, nodulation, antioxidant system, and osmolyte in tolerant and sensitive varieties of *Vigna radiata* under different levels of nickel: a shotgun approach. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012. **57**. P. 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.004>
19. Liu H., Zhang C., Yang J., Yu N., Wang E. Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2018. **60**, N 8. P. 632–648. <https://doi.org/10.1111/jipb.12653>
20. Velandia K., Reid J.B., Foo E. Right time, right place: The dynamic role of hormones in rhizobial infection and nodulation of legumes. *Plant Communications*. 2022. **3**, N 5. P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100327>
21. McGuinness P.N., Reid J.B., Foo E. Brassinosteroids play multiple roles in nodulation of pea via interactions with ethylene and auxin. *Planta*. 2020. **252**, N 4. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03478-z>

Отримано 06.03.2023

REFERENCES

1. Hutorov, A.O., Hutorov, O.I. & Hroshev, S.V. (2020). Upravlinnia efektyvnosti vykorystannia zemelnykh resursiv fermerskykh gospodarstv: teoriia ta praktyka staloho zemlekorystuvannia. Kharkiv: Madryd [in Ukrainian].
2. Dankevych, E., Dankevych, V. & Chaikin, O. (2017). Ukraine agricultural and market formation preconditions. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65, pp. 259-271. <https://doi.org/10.11118/actaun201765010259>
3. Sonali, R., Liu, W., Nandet, R.S., Crook, A., Mysore, K.S., Pislariu, C.I., Frugoli, J., Dickstein, R. & Udvardi, M.K. (2020). Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 32, pp. 15-41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
4. Hayat, S., Hasan, S.A., Yusuf, M., Hayat, Q. & Ahmad, A. (2010). Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environmental and Environmental Botany*, 69, No. 2, pp. 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.03.004>
5. Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D. & Wang, E. (2021). Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64, No. 2, pp. 244-267. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>
6. Wei, Z. & Li, J. (2016). Brassinosteroids regulate root growth, development, and symbiosis. *Molecular Plant*, 9, No. 1, pp. 86-100. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.003>
7. Kolupaev, Yu.E., Karpets, Yu.V. & Polyakov, O.K. (2020). Induction of plants resistance to influence of abiotic stressors by exogenous brassinosteroids. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho agrarnoho universytetu. Seriya Biologiya*, 3, No. 51, pp. 6-36 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.35550/vbio2020.03.006>
8. Straltsova, D., Chykun, P., Subramaniam, S., Sosan, A., Kolbanov, D., Sokolik, A. & Demidchik, V. (2015). Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plant. *Steroids*, 97, No. 5, pp. 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.10.008>
9. Shahid, M.A., Pervez, M.A., Balal, R.M., Mattson, N.S., Rashid, A., Ahmad, R., Ayyub, C.M. & Abbas, T. (2011). Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 5, No. 5, pp. 500-510.
10. Terakado, J., Fujihara, S., Goto, S., Kuratani, R., Suzuki, Y., Yoshida, S. & Yoneyama, T. (2005). Systemic effect of a brassinosteroid on root nodule formation in soybean as revealed by the application of brassinolide and brassinazole. *Soil Science and Plant Nutrition*, 51, pp. 389-395. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2005.tb00044.x>
11. Vardhini, B.V. & Rao, S.S.R. (1999). Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regulation*, 28, pp. 165-167.
12. Ferguson, B.J., Ross, J.J. & Reid, J.B. (2005). Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology*, 138, No. 4, pp. 2396-2405. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062414>
13. Kots, S.Y. & Gryshchuk, O.O. (2015). Phytohormones in the formation and functioning of symbiotic relationships of leguminous plants and nodule bacteria. *Fiziolhyia rastenyi y genetyka*, 47, No. 3, pp. 187-206 [in Ukrainian].
14. Kots, S.Y., Vorobei, N.A., Kyrychenko, O.V., Melnykova, N.M., Mykhalkiv, L.M. & Pukhtaievych, P.P. (2016). Mikrobiolohichni preparaty dlia silskoho gospodarstva. Kyiv: Lohos [in Ukrainian].
15. Child, J.J. (1975). Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. Association with nonleguminous plant cell cultures. *Nature*, 253, pp. 350-351.
16. Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. (1968). The acetylene — ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43, pp. 1185-1207.
17. Kshnikatkina, A., Galiullin, A., Kshnikatkin, S. & Alenin, P. (2020). Legume-rhizobial symbiosis of the pannonian clover variety anik using complex microelements and growth regulators. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, 64, No. 1, pp. 659-664.
18. Yusuf, M., Fariduddin, Q. & Ahmad, A. (2012). 24-Epibrassinolide modulates growth, nodulation, antioxidant system, and osmolyte in tolerant and sensitive varieties of *Vigna*

- radiata under different levels of nickel: a shotgun approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, pp. 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.004>
19. Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N. & Wang, E. (2018). Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60, No. 8, pp. 632-648. <https://doi.org/10.1111/jipb.12653>
20. Velandia, K., Reid, J.B. & Foo, E. (2022). Right time, right place: The dynamic role of hormones in rhizobial infection and nodulation of legumes. *Plant Communications*, 3, No. 5, pp. 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100327>
21. McGuinness, P.N., Reid, J.B. & Foo, E. (2020). Brassinosteroids play multiple roles in nodulation of pea via interactions with ethylene and auxin. *Planta*, 252, No. 4. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03478-z>

Received 06.03.2023

EFFECT OF 24-EPIBRASSINOLIDE ON *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* IN PURE CULTURE AND IN SYMBIOSIS WITH *GLYCINE MAX*

L.I. Rybachenko, S.Ya. Kots, K.P. Kukul, P.P. Pukhtaievych, O.R. Rybachenko,
L.A. Kudryavchenko

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

Brassinosteroids are a group of plant steroid hormones that regulate a wide range of physiological responses, including cell elongation, photomorphogenesis, xylem differentiation, seed germination, etc. It has been proven that these hormones contribute to the formation of legume-rhizobia symbiotic systems. Applied research indicates the potentially complex role of brassinosteroids in the formation of nodules with both positive and negative effects. Therefore, research aimed at studying their role in the processes of symbiosis formation and functioning remains relevant. The aim of the study was to investigate the effect of 24-epibrassinolide on growth indices of *Bradyrhizobium japonicum* in pure culture and realization of their nitrogen-fixing potential in symbiosis with soybean plants. It was found that the *B. japonicum* PC08 strain did not show a pronounced response to the application of concentrations $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ g/L of 24-epibrassinolide. Both positive and negative effects of the tested substance on the growth dynamics of this strain were weakly expressed or completely absent. The addition of this phytohormone to the growth medium of the rhizobial strain *B. japonicum* T21-2 led to stimulation of the growth of rhizobial cells. It was found that 24-epibrassinolide provided an increase in the number of root nodules, regardless of its concentration and the method of application. It had a significant effect on the growth of the root system of soybean plants, while its use as a component of the inoculation suspension in concentration $1 \cdot 10^{-5}$ g/L was more effective. As a result of our research, changes in the dynamics of rhizobia growth under the influence of 24-epibrassinolide were revealed. The effect of its application was largely determined by the strain of *B. japonicum* that we used. We believe that the reaction to the use of 24-epibrassinolide depends on the properties and origin of the strain. The positive effect of 24-epibrassinolide on the number of formed root nodules at the late stages of the formation of the symbiotic apparatus was confirmed. Recorded changes in nitrogen-fixing activity of symbiotic systems under the influence of 24-epibrassinolide indicate that brassinosteroids effect on the functioning of root nodules.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, growth regulators, 24-epibrassinolide, nodulation activity, nitrogen fixation, soybean.