

Г.О. Іутинська, Л.В. Титова, Н.О. Леонова, І.С. Бровко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, Д 03680 МСП, Україна*

АКТИВНІСТЬ ОСНОВНИХ ФЕРМЕНТІВ АСИМІЛЯЦІЇ АМОНІЮ У *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ЗА ДІЇ РОСЛИННИХ ІНДУКТОРІВ ФЛАВОНОЇДНОЇ ПРИРОДИ

Досліджено активність ключових ферментів асиміляції амонію в безклітинних екстрактах ризобій сої, що різняться за своєю ефективністю в симбіозі. Встановлено, що у високоефективного штаму *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 найактивнішими ланками в системі реакцій засвоєння амонію є глутаматсинтаза (глутамат-оксоглутарат-аміотрансфераза, ГОГАТ) та глутаматдегідрогеназа (ГДГ), а у малоефективного штаму *B. japonicum* 21110 – глутамінсинтетаза (ГС) та ГДГ. За дії специфічного для соєво-ризобіального симбіозу флавоноїду геністеїну (0,01 нМ) у високоефективного мікосимбіонта значно зростала активність ГС (у 60,9 рази), яка перевищувала таку у малоефективного штаму більше, ніж у 2 рази. ГДГ зазнавала активації в присутності геністеїну у обох досліджуваних штамів. Неспецифічний флавоноїд нарінгенін не стимулював ГС-активність високоефективних ризобій, але сприяв активізації ГДГ-шляху.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, флавоноїди, ферменти асиміляції амонію, глутамінсинтетаза, глутаматсинтаза, глутаматдегідрогеназа.

Симбіотрофні азотфіксувальні мікроорганізми відіграють важливу роль у формуванні азотного балансу ґрунтів та продуктивних агроєкосистем. Активність ризобій у цих процесах та їх вплив на функціонування симбіозу залежать від специфічності взаємодії, спряженості метаболічних систем, а також перерозподілу біохімічних функцій між симбіопартнерами.

Вирішальною умовою, необхідною для активного синтезу білка в рослинних і мікробних клітинах, є їх забезпечення амонієм, який утворюється внаслідок азотфіксації, відновлення нітратів та темного дихання рослин. Асиміляція амонію відбувається завдяки ферментам глутамінсинтетазі (ГС) та глутаматсинтазі (глутамат-оксоглутарат-аміотрансферазі, ГОГАТ), функціонуючим у тандемі, а також завдяки глутаматдегідрогеназі (ГДГ) – ключовому ферменту альтернативного шляху асиміляції амонію [5, 12-14, 19]. Ферментативні процеси асиміляції амонію відіграють важливу роль у функціонуванні симбіосистем.

ГС-ГОГАТ-шлях функціонує при зниженні концентрації амонію в середовищі. Коли концентрація амонію в клітинах різко збільшена, активується ГДГ-шлях асиміляції амонію [1, 5, 7, 13, 19]. Реакції, що каталізуються ГС-ГОГАТ, очевидно, є основним шляхом асиміляції амонію у ризобій, а ГДГ – альтернативним [5].

На активність і спряженість систем асиміляції амонію впливають фізіологічно активні сполуки, до яких слід віднести флавоноїди.

Як відомо, з ексудатами бобових рослин у кореневу зону постійно виділяються фенольні сполуки флавоноїдної природи, серед яких лише деякі є специфічними молекулярними сигналами – індукторами транскрипції ризобіальних генів нодуляції (*nod*, *noe* і *nol*) [6, 9, 11], а також катаболітних генів у ризобій [16]. Для ризобій люцерни найбільш активним індуктором *nod*-генів є лютеолін, для ризобій гороху – нарінгенін, а для ризобій сої – даїдзеїн та геністеїн [10, 15].

Дослідження особливостей азотного метаболізму, зокрема координації альтернативних шляхів асиміляції амонію та впливу речовин флавоноїдної природи на азотний обмін діатрофів, важливі як з теоретичного, так і з практичного аспектів з огляду на необхідність розробки екобіотехнологій для рослинництва.

Метою роботи було вивчення особливостей азотного метаболізму у ризобій сої за дії флавоноїдів геністеїну (специфічного) і нарінгеніну (не специфічного для соєво-ризобіального симбіозу).

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були два штами бульбочкових бактерій сої, що відрізняються за активністю азотфіксації в умовах симбіозу: високоефективний вироб-

ничий штам *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035, який формує на коренях сої активний азотфіксувальний апарат і сприяє підвищенню урожаю та збільшенню вмісту протеїну в насінні сої (з колекції відділу загальної і ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, депонований в Українській колекції мікроорганізмів); малоефективний штам *B. japonicum* 21110, який формує на коренях сої бульбочки з низькою азотфіксувальною активністю і мало впливає на урожай та його якість (одержаний із колекції Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології Російської академії сільськогосподарських наук (Санкт-Петербург, Пушкін).

У роботі використовували флавоноїди: *геністеїн* – представник підгрупи ізофлавоноїдів та класу ізофлавонів, є одним із основних флавоноїдних компонентів кореневих ексудатів рослин сої та сигнальною молекулою соєво-ризобіального симбіозу; *нарінгенін* – відноситься до підгрупи еуфлавоноїдів та класу флаванонів, є сигнальною молекулою з пулу кореневих ексудатів не комплементарного для *B. japonicum* макросимбіонта – гороху [8, 9, 11, 15, 16].

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл на качалці (220 об/хв) за температури 26–28 °С впродовж 72–96 год на рідкому поживному середовищі Ісварана [4] наступного складу (г/л): маніт – 10,0; дріжджовий екстракт – 2,0; глюкозат кальцію – 1,5; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,1; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 0,01; рН 7,2. Як посівний матеріал використовували культуру *B. japonicum* у експоненційній фазі росту (92–96 год), вирощену на середовищі Ісварана. Кількість посівного матеріалу становила 5 % об'єму середовища. У деяких варіантах вносили в поживне середовище досліджувані флавоноїди в концентраціях 0,01, 10 та 1000 нМ, при яких встановлено найбільший приріст біомаси у *B. japonicum* УКМ В-6035 і *B. japonicum* 21110.

Для отримання безклітинних екстрактів використовували клітини ризобій, що знаходились у експоненційній фазі росту (92–96 год культивування). Культуральну рідину, отриману після культивування штамів *B. japonicum* УКМ В-6035 і *B. japonicum* 21110 на рідкому живильному середовищі, центрифугували впродовж 30 хв при 15000–18000 г та температурі +4°С. Клітини бактерій три рази відмивали 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,7) та осаджували впродовж 15 хв при 5000 г та температурі +4°С. Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М калій-фосфатному буфері (рН 7,7) та проводили ультразвукову дезінтеграцію клітин на УЗДН-2Т (Росія) при 22 кГц, тривалість обробки – три цикли по 20 с з інтервалом 1 хв при температурі 0°С. Після ультразвукової обробки фрагменти клітин осаджували при 12000 г, +4°С, 30 хв, супернатанти використовували як безклітинні екстракти. Концентрацію білка в екстрактах визначали за Bradford.

Активність глутамінсинтети (КФ 6.3.1.2) та глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2) у безклітинних екстрактах ризобій визначали, як описано нами раніше [2, 3].

Активність НАДН-залежної глутаматсинтази (КФ 1.4.1.14) у безклітинних екстрактах ризобій визначали за окисненням НАДН у присутності 2-оксоглутарату і L-глутаміну та реєстрували при 340 нм на фотоелектрокалориметрі КФК 3-01 [17].

За одиницю активності приймали кількість ферменту, що каталізує окиснення 1 нмоля НАДН за 1 хвилину на 1 мг білка.

При вивченні ферментативної активності бульбочкових бактерій сої усі досліді проведені в 3–5 повторностях, одержані результати оброблені статистично за допомогою пакета програм *Microsoft Excel 2002*.

У роботі були використані реактиви: флавоноїди геністеїн, нарінгенін («Sigma», Німеччина), 2-оксоглутарат, метаарсеніт натрію («Fluka», Швейцарія), АДФ, НАД та НАДН («Reanal», Угорщина), L-глутамін («Serva», Німеччина), інші реактиви вітчизняного виробництва високої чистоти.

Результати та їх обговорення. В умовах лабораторних дослідів *in vitro* в безклітинних екстрактах досліджуваних штамів ризобій сої виявлена активність ферментів ГС, ГОГАТ і ГДГ, що свідчить про існування у них обох шляхів асиміляції аміачного азоту, проте співвідношення активностей цих ферментів у промислового штаму *B. japonicum* УКМ В-6035 і малоефективного штаму *B. japonicum* 21110 були різними (рис. 1).

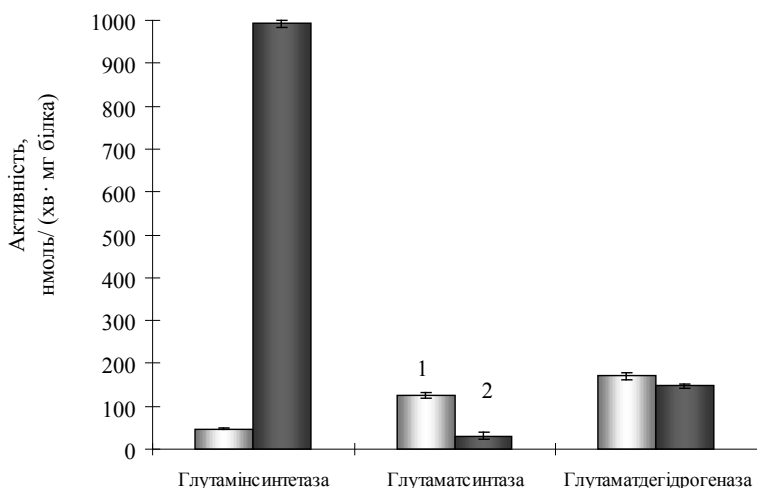


Рис. 1. Активність основних ферментів азотного обміну у ризобій сої:

1 – *B. japonicum* УКМ В-6035; 2 – *B. japonicum* 21110

Встановлено, що активність ГС у малоефективного штаму була у 20 разів вищою, ніж у високоефективного. ГОГАТ- активність цього штаму поступалась перед такою високоефективного у 4 рази. При цьому за рівнем функціонування ГДГ-шляху обидва досліджуваних штами майже не відрізнялись.

При аналізі співвідношення активностей ферментів у високоефективних ризобій сої активність ГС виявилась нижчою порівняно з ГОГАТ у 2,6 рази, порівняно з ГДГ – у 3 рази; у малоефективного штаму 21110, навпаки, ГС-активність була значно вищою (в 6,7 і 32 рази), ніж, відповідно, ГДГ і ГОГАТ.

Різні співвідношення активності ГС і ГОГАТ, які розглядаються в літературі як система ферментів, що займає ключову позицію в засвоєнні мікроорганізмами (зокрема, ризобіями) відновленого азоту, очевидно, свідчить про відмінності азотного метаболізму у досліджуваних штамів мікосимбіонтів сої. Адже ця послідовність реакцій є частиною тих численних спряжених із ГС реакцій, які відбуваються у клітині. Відомо, що амідний азот глутаміну використовується в синтезі ряду важливих азотвмісних сполук клітини: пуринових і піримідинових нуклеотидів, карбамоїлфосфату, глюкозо-амін-6-фосфату, ряду амінокислот, вітаміну B₁₂ та ін.[1, 5, 13, 18].

Оскільки в літературі відсутні дані про вплив речовин флавоноїдної природи на ферменти азотного обміну в чистих культурах бульбочкових бактерій, наступним етапом роботи було дослідження активності ГС, ГОГАТ та ГДГ у ризобій сої. Звертали увагу на дію цих речовин як на окремі ланки асиміляції амонію, так і на співвідношення ферментів, що впливають на різні шляхи азотного метаболізму.

Попередньо визначали концентрації флавоноїдів в інтервалі 0,01–10000 нМ, які сприяли найбільшому приросту біомаси ризобій сої. Встановлено, що за концентрації геністеїну 0,01 та 1000 нМ, а нарингеніну – 0,01 та 10 нМ спостерігали найбільші показники приросту біомаси у *B. japonicum* УКМ В-6035 та *B. japonicum* 21110. Ці концентрації флавоноїдів застосовували при вивченні активності основних ферментів асиміляції амонію у ризобій сої.

Ізофлавоноїд геністеїн є одним з основних компонентів ексудатів сої і специфічним індуктором нодуляції для соєво-ризобіального симбіозу [11, 15, 16]. При дослідженні його впливу на активність ферментів ГС-ГОГАТ шляху у *B. japonicum* УКМ В-6035 встановлено, що рівень ГС активності в присутності цього флавоноїду суттєво зростав (рис. 2) і перевищував показники контролю у 36,7 та 60,9 рази за концентрації 0,01 та 1000 нМ, відповідно. ГОГАТ виявилась менш чутливою до дії геністеїну. За його сигнальної концентрації (0,01 нМ) відбувалось стимулювання глутаматсинтазної активності ефективного мікосимбіонта сої, а за концентрації 1000 нМ – інгібування активності цього ферменту на 48 %. Отже, найбільш

чутливою до дії геністеїну у промислового штаму виявилась ГС, активність якої при цьому перевищувала таку у малоефективного штаму в 1,4 та 2,1 рази.

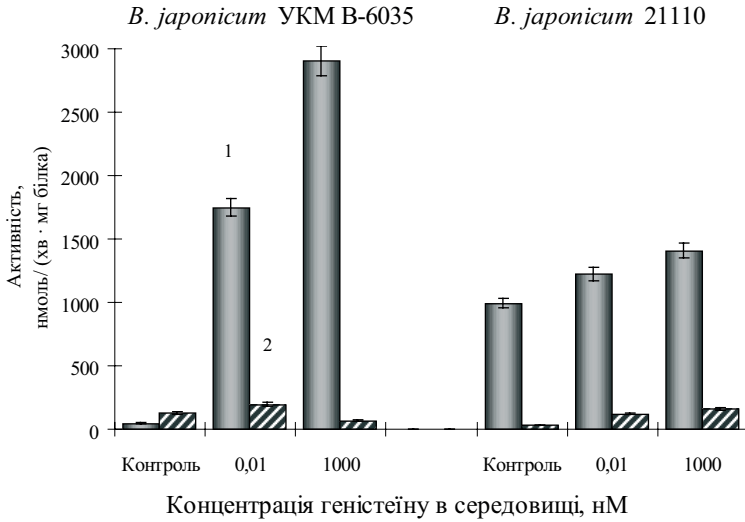


Рис. 2. Активність ферментів ГС-ГОГАТ-шляху у *B. japonicum* за дії геністеїну:
1 – глутамінсинтетаза, 2 – глутаматсинтаза

Проведені дослідження показали позитивний вплив геністеїну на ГС малоефективного штаму *B. japonicum* 21110 (рис. 2). За присутності флавоноїду у концентрації 0,01 нМ та 1000 нМ активність цього ферменту у безклітинних екстрактах бактеріального симбіонта збільшувалась порівняно з контролем на 23,3 % та 41,9 % відповідно. ГОГАТ-активність при цьому зазнавала більш суттєвого стимулювання і перевищувала контрольні показники у 3,9 та 5,2 рази. Отже, найбільш чутливою до дії геністеїну у малоефективного штаму виявилась глутаматсинтаза, про що свідчать показники приросту її активності.

Подальші дослідження були спрямовані на з'ясування впливу неспецифічного для мікросимбіонтів сої флавоноїду – нарінгеніну на ГС-ГОГАТ-шлях асиміляції амонію у вискоєфективних ризобій (рис. 3). Слід відзначити, що цей флавоноїд не підвищував ГС-активність *B. japonicum* UKM B-6035, однак пригнічував активність ГОГАТ (у 2,5 рази) за концентрації 0,01 нМ і стимулював її (у 3 рази) за концентрації 10 нМ.

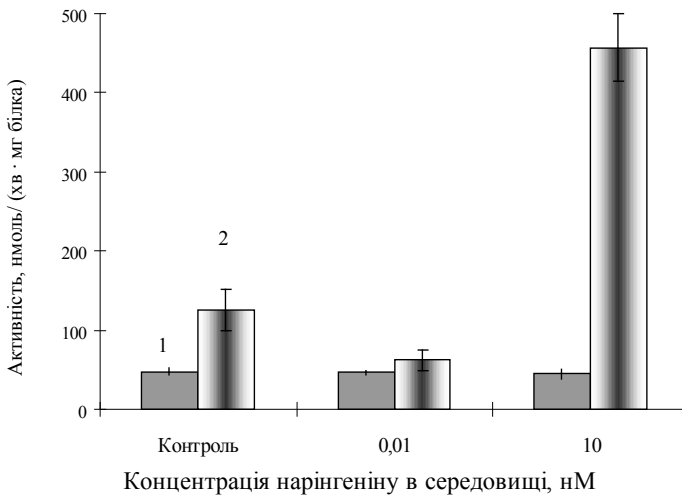


Рис. 3. Активність ГС-ГОГАТ-шляху у вискоєфективного штаму *B. japonicum* UKM B-6035 за дії нарінгеніну: 1 – глутамінсинтетаза; 2 – глутаматсинтаза

Вивчення активності ферменту альтернативного шляху асиміляції амонію – глутаматдегідрогенази у ризобій сої за дії флавоноїдів показало, що специфічний флавоноїд геністеїн проявляв стимулюючу дію на функціонування ГДГ *B. japonicum* УКМ В-6035 за сигнальної концентрації (0,01 нМ), а у штаму 21110 – за максимальної концентрації 1000 нМ (таблиця). Нарінгенін сприяв підвищенню ГДГ-активності вискоєфективного штаму за обох досліджуваних концентрацій в 1,4 та 1,6 рази відповідно. Отже, досліджувані флавоноїди здатні стимулювати ГДГ-активність обох мікросимбіонтів сої.

Таблиця

Глутаматдегідрогеназна активність у безклітинних екстрактах ризобій сої за дії флавоноїдів

Концентрація флавоноїдів, нМ	Глутаматдегідрогеназна активність, нмоль/ (хв · мг білка)	
	<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	<i>B. japonicum</i> 21110
Контроль (без флавоноїду)	172,1 ± 8,9	147,4 ± 9,6
Геністеїн, 0,01	196,3 ± 12,5	154,1 ± 11,7
Геністеїн, 1000	170,7 ± 9,8	512,7 ± 38,4
Нарінгенін, 0,01	254,8 ± 20,4	–
Нарінгенін, 10	299,3 ± 28,4	–

Примітка: « – » – не визначали.

Таким чином, нами встановлено, що асиміляція амонійного азоту у вискоєфективного та малоефективного штамів ризобій сої відбувалась двома альтернативними шляхами: за рахунок функціонування ГС-ГОГАТ-шляху та активності ГДГ. При цьому слід підкреслити низьку активність ГОГАТ у малоефективного штаму *B. japonicum* 21110, що може свідчити про зменшення реалізації у нього потенціалу ГС-ГОГАТ-системи. Показано суттєву долю ГДГ в асиміляції аміаку у обох штамів.

Раніше нами були отримані дані щодо активності ферментів асиміляції амонію ризобій сої за дії специфічного флавоноїду даїдзеїну і неспецифічного кверцетину [2, 3]. Узагальнюючи отримані дані, слід відзначити, що як специфічні флавоноїди геністеїн і даїдзеїн, так і неспецифічні для ризобій сої флавоноїди нарінгенін і кверцетин здатні впливати на активність основних ферментів асиміляції амонію у досліджуваних штамів. Це може супроводжуватися зміною спрямованості процесів метаболізму у бік синтезу біомаси.

Геністеїн у концентрації 0,01 нМ підвищував активність обох шляхів асиміляції амонію у *B. japonicum* УКМ В-6035, очевидно, сприяючи їх координації, при цьому значну роль відіграла ГС, – її активність суттєво зростала. У малоефективного штаму *B. japonicum* 21110 активізувались обидва шляхи за дії більшої концентрації цього флавоноїду, але ГС-активність залишалась нижчою, ніж у *B. japonicum* УКМ В-6035, а ГОГАТ зазнавала більшої активації. За присутності нарінгеніну ГС-активність промислового штаму не змінювалась, в той час як зміни відбувались у другій ланці ГС-ГОГАТ-шляху. Функціонування ГДГ-шляху асиміляції амонію у виробничого штаму стимулювали обидва досліджувані флавоноїди, а також даїдзеїн і кверцетин, як показано нами раніше [3].

Таким чином, досліджені особливості азотного метаболізму ризобій за дії фіторегуляторних речовин флавоноїдної природи мають важливе значення для розшифровки механізмів формування симбіотичних систем, а також для створення комплексу заходів щодо підвищення ефективності технологій вирощування зернобобових культур.

Розробка прийомів активації ключових ферментів азотного метаболізму дасть змогу спрямовано покращувати умови засвоєння азоту мікросимбіонтами і підвищувати азотний обмін в агрофітоценозах. Крім того, такі дослідження можуть слугувати основою для селекційного відбору штамів азотфіксувальних мікроорганізмів з високою інтенсивністю ключових ланок азотного обміну.

**АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ ФЕРМЕНТОВ АССИМИЛЯЦИИ АММОНИЯ
У *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ПОД ВЛИЯНИЕМ РАСТИТЕЛЬНЫХ
ИНДУКТОРОВ ФЛАВОНОИДНОЙ ПРИРОДЫ**

Резюме

Исследована активность ключевых ферментов ассимиляции аммония в бесклеточных экстрактах ризобий сои, отличающихся эффективностью в симбиозе. Установлено, что у высокоэффективного штамма *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 самыми активными звеньями в системе реакций усвоения аммония являются глутаматсинтаза (глутамат-оксоглутарат-аминотрансфераза, ГОГАТ) и глутаматдегидрогеназа (ГДГ), а у малоэффективного штамма *B. japonicum* 21110 – глутаминсинтетазы (ГС) и ГДГ. Под влиянием специфического для соево-ризобияльного симбиоза флавоноида генистеина (0,01 нМ) у высокоэффективного микросимбионта значительно возрастала активность ГС (в 60,9 раз), которая превышала такую у малоэффективного штамма более чем в 2 раза. ГДГ активизировалась в присутствии генистеина у обоих исследуемых штаммов. Неспецифический флавоноид нарингенин не стимулировал ГС-активность у высокоэффективных ризобий, однако способствовал активизации ГДГ-пути.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, флавоноиды, ферменты ассимиляции аммония, глутаминсинтаза, глутаматсинтаза, глутаматдегидрогеназа.

G.O. Iutynska, L.V. Tytova, N.O. Leonova, I.S. Brovko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

**ACTIVITY OF MAIN ENZYMES OF AMMONIUM ASSIMILATION
IN *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* UNDER THE INFLUENCE
OF PLANT FLAVONOID INDUCTORS**

Summary

The activity of key enzymes of ammonium assimilation in cell-free extracts of soybean rhizobia characterized with different effectiveness in symbiosis, has been researched. It has been found out that at highly efficient strain *Bradyrhizobium japonicum* UKM B-6035 the most active links in the system of ammonium assimilation reactions are glutamate synthase (glutamate-oxoglutarate-aminotransferase, GOGAT) and glutamate dehydrogenase (GDH). Whereas the most active links at the ineffective strain *B. japonicum* 21110 are glutamine synthetase (GS) and GDH. Under the influence of specific for soybean-rhizobia symbiosis flavonoid genistein (0.01 nm) GS-activity of the highly efficient strain has considerably increased (60.9 times), and this activity has exceeded the one of the ineffective strain more than twice. GDH has been activated in the presence of genistein in both researched strains. The nonspecific flavonoid naringenin has not stimulated GS-activity of the highly efficient rhizobia, but has stimulated the activity of GDH-way.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у о р д с : *Bradyrhizobium japonicum*, флавоноиды, аммонийная ассимиляция ферменты, глутаминсинтетазы, глутаматсинтаза, глутаматдегидрогеназа.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s : Iutynska G.A., Acad. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine; 154 Zabolotny St., Kyiv, MSP D 03680, Ukraine.

1. Евстигнеева З.Г. Глутаминсинтетазы: роль в азотном метаболизме растений, регуляция и структура: 41-е Баховское чтение. – Москва: Наука, 1988. – 64 с.
2. Леонова Н.О., Титова Л.В., Танцюренко О.В., Антипчук А.Ф. Глутаматдегидрогеназная активность ризобий сои (*Bradyrhizobium japonicum*) за дії фіторегулювальних речовин // Мікробіол. журн. – 2006. – 68, № 4. – С. 21-27.
3. Леонова Н.О., Титова Л.В., Танцюренко О.В., Антипчук А.Ф. Фізіологічна активність бульбочкових бактерій сої (*Bradyrhizobium japonicum*) за дії флавоноїдів // Наук. вісник ЧНУ, Серія: Біологія. – 2005. – 252. – С. 132-139.
4. Пат. 3324 UA, МКІ' С1 С05 F 11/08, С 12 N 1/20. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для одержання добрив під сою / Н.М. Скочинська, А.Ф. Антипчук, В.М. Рангелова, Р.М. Канцелярук, О.В. Танцюренко. – Опублік. 27.12.1994, Бюл. № 6-1.

5. Спайнк Г., Кондородиш А., Хукас П. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями/ Под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. – Санкт-Петербург: ИПК «Бионт», 2002. – 568 с.
6. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агроэcosystem будущего. – Санкт-Петербург: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2009. – 210 с.
7. Шатилов В.П. Глутаматдегидрогеназы / Итоги науки и техники. Биологическая химия, 1987. – 24. – С. 4-104.
8. Christie S., Walker A.F., Lewith G.T. Flavonoids – a new direction the treatment of fluid retention // *Phyther. Res.* – 2001. – **15**, N 6. – P.467–475.
9. Gonzalez J.E., Marketon M.M. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – **67**, N 4. – P. 574–592.
10. Hartwig U.A., Maxwell C.A., Yoseph C.M., Phillips D.A. Chryseoriol and luteolin released from alfalfa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti* // *Plant Physiol.* – 1990. – **92**. – P. 116–122.
11. Long S.R. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Plant Physiol.* – 2001. – **125**, N 1. – P. 69–72.
12. Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants/ Eds. Amâncio S., Stulen I. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – 298 p.
13. Patriarca E. J., Tatè R., Iaccarino M. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2002. – **66**, N 2. – P. 203–222.
14. *Plant nitrogen*/ Eds. Lea P.J., Morot-Gaudry J.-F. – Berlin: Springer, 2001. – XIV. – 407 p.
15. Pueppke S.G., Bolaños-Vásquez M.C., Werner D., Bec-Ferté M.-P., Promé J.-C., Krishnan H.B. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii* // *Plant Physiol.* – 1998. – **117**, N 2. – P. 599–606.
16. Rao J. R., Cooper J. E. Soybean nodulating rhizobia modify *nod* gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene inducing activity // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 1995. – **8**, N 6. – P. 855–862.
17. Roon R. J., Even H. L., Larimore F. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Sacharomyces cerevisiae*// *J. Bacteriol.* – 1974. – **118**, N 1. – P. 89–92.
18. Root nodule bacteria and leguminous plants/ Eds. Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. – Madison: Parallel Press, 2002. – 382 p.
19. Turner S.L., Young J. P.W. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications// *Mol. Biol. Evol.* – 2000. – **17**, N 2. – P. 309–319.

Отримано 22.09.2009